

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193263** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.17

(22) Дата подачи заявки
2020.06.05

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА Т-КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОЙ СОРТИРОВКИ И ИХ КОМПОЗИЦИИ

(31) **62/858,167; 10 2019 129 341.3**

(32) **2019.06.06; 2019.10.30**

(33) **US; DE**

(86) **PCT/US2020/036398**

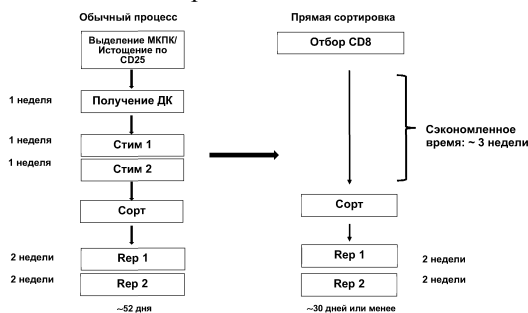
(87) **WO 2020/247802 2020.12.10**

(71) Заявитель:
**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE); ИММАТИКС ИЮС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Алперт Амир (US), Маурер Доминик
(DE), Смит Анастасия (US), Вагнер
Клаудиа (DE), Мохамед Али (US)**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.
(RU)**

(57) В настоящем документе описаны способы получения Т-клеток, включающие выделение CD8⁺ Т-клеток из образца крови, полученного у пациента или донора, культивирование выделенных CD8⁺ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина, контактирование культивированных CD8⁺ Т-клеток с мультимером, содержащим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, и по меньшей мере одним связывающим элементом, который связывается с молекулой поверхности Т-клетки, где мультимер является меченым первым поддающимся обнаружению элементом, а связывающий элемент является меченым вторым поддающимся обнаружению элементом, сортировку CD8⁺ Т-клеток после контактирования, чтобы собрать отобранные CD8⁺ Т-клетки, которые дают положительный результат при обнаружении первого и второго поддающихся обнаружению элементов, и экспансию собранных CD8⁺ Т-клеток.



A1

202193263

202193263

A1

СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА Т-КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОЙ СОРТИРОВКИ И ИХ КОМПОЗИЦИИ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Данное изобретение относится к способам получения Т-клеток для адоптивной иммунотерапии. В раскрытии, кроме того, предложены способы применения Т-клеток и популяций этих Т-клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Адоптивная Т-клеточная терапия (АСТ) генерирует продуктивный иммунный ответ у хозяина. Т-клетки могут быть получены из крови или опухолевой ткани пациента, затем простимулированы для роста и экспансированы в культуральной системе *in vitro*. После достаточной экспансии *in vitro*, эти клетки могут быть повторно введены хозяевам, где они в идеальном случае будут опосредовать разрушение опухоли. Таким образом, данный процесс применим к подавляющему большинству пациентов, больных раком, у которых, по-видимому, отсутствует продуктивный противоопухолевый ответ до вмешательства.

[0003] Как было показано, способы *in vitro*, в которых используются различные формы антигенных и стимулирующих клеток, таких как антиген-презентирующие клетки (АПК), являются эффективными для экспансии Т-клеток памяти *ex vivo*, например, вирус-специфических клеток, которые были примированы в организме хозяина за счет предварительного воздействия антигена *in vivo*.

[0004] В работе Ho et al. (*J Immunol Methods* 2006;31040–52) поясняется, что клоны опухолеспецифических CD8+ Т-клеток могут быть получены *in vitro* за счет повторной антиген-специфической стимуляции полученных у пациента (аутологичных) или донора (аллогенных) Т-клеток с помощью полученных из моноцитов дендритных клеток (ДК), и что успешная экспансия CD8+ Т-клеток, специфичных к пептиду антигена опухоли Вильмса 1 (WT1), возможно, находится в большей зависимости от условий клеточной культуры. В работе Ho et al., тем не менее, не раскрыт способ получения клонов опухолеспецифических CD8+ Т-клеток за счет экспансии Т-клеток, которые не были активированы или простимулированы до экспансии.

[0005] В работе Chapuis et al. (*Sci Transl Med* 2013;5:174ra27) раскрыто применение аллогенных CD8⁺ Т-клеток, обладающих активностью в отношении WT1 у пациентов с лейкозом, у которых наблюдался рецидив после трансплантации аллогенных гематопозитических стволовых клеток. Клоны могут быть получены за счет лейкафереза донорских клеток, совпадающих по типу человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) и повторной стимуляции нагруженными пептидом, аутологичными АПК, например, дендритными клетками в течение нескольких месяцев. Лимфоциты после адоптивного переноса можно было обнаружить в крови пациента в течение долгого периода времени, а транзиторные ответы наблюдались у 2 из 11 этих пациентов высокого риска рецидивирования, стабильное течение заболевания наблюдалось у 3 других. В работе Chapuis et al., тем не менее, не раскрыт способ получения WT1-специфических клонов CD8⁺ Т-клеток за счет экспансии Т-клеток, которые не были активированы или простимулированы до экспансии.

[0006] Существует необходимость в простых, эффективных и экономически выгодных способах производства Т-клеток для АСТ. Решение данной технической проблемы предложено в настоящем документе.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном аспекте настоящее раскрытие сущности относится к способам получения Т-клеток, в том числе выделению CD8⁺ Т-клеток из пробы крови, полученной у пациента или донора, культивированию выделенных CD8⁺ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина, контактированию культивированных CD8⁺ Т-клеток с мультимером, содержащим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС и по меньшей мере с одним связующим элементом, который связывается с молекулой поверхности Т-клетки, где мультимер имеет метку в виде первого поддающегося обнаружению элемента, а связующий элемент имеет метку в виде второго поддающегося обнаружению элемента, причем первый поддающийся обнаружению элемент имеет отличие в обнаружении от второго поддающегося обнаружению элемента, сортировке CD8⁺ Т-клеток после контактирования в целях сбора отобранных CD8⁺ Т-клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого и второго поддающихся обнаружению элементов, и экспансии собранных CD8⁺ Т-клеток.

[0008] В другом аспекте мультимер может быть комплексом HLA, молекулой или пептидной последовательностью, содержащей исследуемый пептид-мишень в моновалентном или поливалентном виде.

[0009] В другом аспекте контактирование может осуществляться в присутствии мультимера, содержащего несоответствующий пептид в комплексе с молекулой МНС.

[0010] В другом аспекте культивирование выделенных CD8+ Т-клеток может производиться в отсутствие агента, активирующего Т-клетки, так что выделенные CD8+ Т-клетки являются неактивированными.

[0011] В другом аспекте контактирование культивированных CD8+ Т-клеток может производиться в присутствии мультимеров и в отсутствие связующих элементов.

[0012] В другом аспекте по меньшей мере один связующий элемент может быть антителом.

[0013] В другом аспекте связующий элемент может быть мультимером, например, декстрамером.

[0014] В другом аспекте способ может, кроме того, включать сортировку собранных CD8+ Т-клеток, чтобы получить собранные CD8+ Т-клетки, которые дают положительный результат при обнаружении первого и второго поддающихся обнаружению элементов до экспансии.

[0015] В другом аспекте проба крови может представлять собой моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) или продукт лейкофереза.

[0016] В другом аспекте проба крови может быть получена у пациента.

[0017] В другом аспекте проба крови может быть получена у донора.

[0018] В другом аспекте по меньшей мере один цитокин может быть выбран из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-23.

[0019] В другом аспекте мультимер может быть тетрамером.

[0020] В другом аспекте молекула МНС может быть молекулой МНС I класса.

[0021] В другом аспекте первый и второй поддающийся обнаружению элемент, каждый из них, может включать флуоресцентное соединение.

[0022] В другом аспекте молекула поверхности Т-клетки может включать маркер клеточной поверхности наивной Т клетки.

[0023] В другом аспекте маркер клеточной поверхности наивной Т клетки может быть выбран из CD45, CD197, CD28, CD27, рецептора ИЛ-7 (ИЛ-7R α), CD57, CD95, CD127 и CD62L.

[0024] В другом аспекте сортировка может осуществляться при использовании любых клеточных сортеров, например, сортера BD FACS®.

[0025] В другом аспекте экспансия может производиться в присутствии по меньшей мере одного цитокина.

[0026] В другом аспекте сортировка, сбор и экспансия могут производиться в закрытой системе.

[0027] В другом аспекте закрытая система может включать биореакторы CliniMACS, ProdigyTTM, WAVE (XURITM), WAVE (XURITM) в сочетании с BioSafe SepaxTM II, закрытая система G-Rex/GatheRexTM или закрытая система G-Rex/GatheRexTM в сочетании с BioSafe SepaxTM II.

[0028] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения Т-клеток, включающим выделение CD8⁺ Т-клеток из образца крови, полученного у пациента или донора, культивирование выделенных CD8⁺ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина, контактирование культивированных CD8⁺ Т-клеток с первым мультимером, содержащим пептид в комплексе с молекулой МНС, с первым связующим элементом, который связывается с молекулой поверхности Т-клетки, вторым мультимером, содержащим несоответствующий пептид, который отличается от пептида, содержащегося в первом мультимере, в комплексе с молекулой МНС, и вторым связующим элементом, который связывается с первым мультимером, где первый мультимер может быть меченым первым поддающимся обнаружению элементом, а первый связующий элемент может быть меченым вторым поддающимся обнаружению элементом, где второй мультимер может быть меченым третьим поддающимся обнаружению элементом, где первый, второй и третий поддающиеся обнаружению элементы могут быть поддающимися

обнаружению элементами, имеющими отличие друг от друга в обнаружении, сортировку CD8+ Т-клеток после контактирования, чтобы собрать отобранные CD8+ Т-клетки, которые дают положительный результат при обнаружении первого и второго поддающихся обнаружению элементов и отрицательный результат при обнаружении третьего поддающегося обнаружению элемента, и экспансию собранных CD8+ Т-клеток.

[0029] В другом аспекте второй связывающий элемент связывается с первым поддающимся обнаружению элементом.

[0030] В другом аспекте первый поддающийся обнаружению элемент включает по меньшей мере два флуорофора.

[0031] В другом аспекте контактирование может производиться в присутствии ингибитора протеинкиназы (ИПК).

[0032] В другом аспекте ИПК может быть выбран из следующего: афатиниб, акситиниб, босутиниб, цетуксимаб, кобиметиниб, кризотиниб, кабозантиниб, дазатиниб, энтректиниб, эрдафитиниб, эрлотиниб, фостаматиниб, гефитиниб, ибрутиниб, иматиниб, лапатиниб, ленватиниб, мубритиниб, nilотиниб, пазопаниб, пегаптаниб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, SU6656, вандетаниб или вемурафениб.

[0033] В другом аспекте исключение элемента активации Т-клеток может включать исключение антигенпрезентирующей клетки.

[0034] В другом аспекте исключение элемента активации Т-клеток может включать исключение антитела к CD3 и антитела к CD28.

[0035] В одном аспекте настоящее раскрытие сущности относится к композициям, содержащим пептид-специфические Т-клетки, полученным с помощью способа настоящего изобретения.

[0036] В другом аспекте композиции могут дополнительно включать адъювант.

[0037] В другом аспекте адъювант может быть выбран из следующего: антитело к CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG олигонуклеотиды, поли-(I:C), РНК, силденафил, составы из твердых микрочастиц на основе поли(лактид когликолида) (PLG), виросомы, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-21 и ИЛ-23.

[0038] В одном аспекте настоящее описание относится к способам лечения пациента, имеющего раковое заболевание, включающим введение указанному пациенту композиции по настоящему изобретению, где указанное раковое заболевание может быть выбрано из гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечноклеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПрЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы (РМЖ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП) и рака матки (РЭМ).

[0039] В другом аспекте контактирование может быть осуществлено в присутствии ИПК при концентрации от примерно 1 нМ до примерно 1000 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 900 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 800 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 700 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 600 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 500 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 400 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 300 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 200 нМ, от примерно 1 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 5 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 10 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 20 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 30 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 40 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 50 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 60 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 70 нМ до примерно 100 нМ, от примерно 10 нМ до примерно 250 нМ, примерно 20 нМ до примерно 200 нМ, примерно 30 нМ до примерно 150 нМ, или примерно 50 нМ до примерно 120 нМ.

[0040] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения Т-клеток, включающим выделение CD8⁺ Т-клеток из образца крови, полученного у пациента или донора, культивирование выделенных CD8⁺ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина, контактирование культивированных CD8⁺ Т-клеток с первым мультимером, включающим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, и вторым мультимером, включающим несоответствующий пептид в комплексе с молекулой МНС, где первый мультимер

является меченным первым поддающимся обнаружению элементом, а второй мультимер является меченным вторым поддающимся обнаружению элементом, где первый поддающийся обнаружению элемент имеет отличие от второго поддающегося обнаружению элемента в обнаружении, сортировку CD8+ Т-клеток после контактирования, чтобы собрать отобранные CD8+ Т-клетки, которые дают положительный результат при обнаружении первого поддающегося обнаружению элемента и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента, и экспансию собранных CD8+ Т-клеток.

[0041] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения Т-клеток, включающим культивирование CD8+ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина, контактирование культивированных CD8+ Т-клеток с мультимером, содержащим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, и по меньшей мере одним связывающим элементом, который связывается с молекулой поверхности Т-клетки, где мультимер является меченным первым поддающимся обнаружению элементом, а связывающий элемент является меченным вторым поддающимся обнаружению элементом, где первый поддающийся обнаружению элемент имеет отличие от второго поддающегося обнаружению элемента в обнаружении, сортировку CD8+ Т-клеток после контактирования, чтобы собрать отобранные CD8+ Т-клетки, которые дают положительный результат при обнаружении первого и второго поддающихся обнаружению элементов, и экспансию собранных CD8+ Т-клеток.

[0042] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения Т-клеток, контактированию образца крови с первым мультимером, включающим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, где первый мультимер является меченным первым поддающимся обнаружению элементом, и вторым мультимером, включающим несоответствующий пептид, отличающимся от пептида-мишени, в комплексе с молекулой МНС, где второй мультимер является меченным вторым поддающимся обнаружению элементом, где первый и второй поддающиеся обнаружению элементы имеют отличие друг от друга в обнаружении, сортировке клеток после контактирования со сбором отсортированных клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого поддающегося обнаружению элемента и отрицательный

результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента, и экспансию собранных Т-клеток.

[0043] В другом аспекте контактирование может производиться в присутствии первого связывающего элемента, связывающегося с первым поддающимся обнаружению элементом и/или второго связывающего элемента, связывающегося со вторым поддающимся обнаружению элементом.

[0044] В другом аспекте первый связывающий элемент и второй связывающий элемент могут быть антителами.

[0045] В другом аспекте контактирование может осуществляться при примерно 4°C, комнатной температуре, примерно 37°C, от примерно 2°C до примерно 8°C, от примерно 18 °C до примерно 26 °C, или от примерно 32 °C до примерно 38°C.

[0046] В другом аспекте несоответствующий пептид может быть по меньшей мере одним пептидом, выбранным из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 1–161.

[0047] В другом аспекте контактирование может быть осуществлено в присутствии третьего мультимера, содержащего пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, где третий мультимер является меченным третьим поддающимся обнаружению элементом, где третий поддающийся обнаружению элемент может отличаться от первого и второго поддающегося обнаружению элемента в обнаружении, и где сортировка включает сбор отсортированных CD8+ Т-клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого и третьего поддающихся обнаружению элементов и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента.

[0048] В другом аспекте мультимеры могут быть профильтрованы через фильтр до использования в этапе контактирования.

[0049] В другом аспекте образец крови может содержать клетки при концентрации от примерно $0,1 \times 10^6$ клеток/мл до примерно 1000×10^6 клеток/мл, от примерно 1×10^6 клеток/мл до примерно 900×10^6 клеток/мл, от примерно 5×10^6 клеток/мл до примерно 800×10^6 клеток/мл, от примерно 10×10^6 клеток/мл до примерно 700×10^6 клеток/мл, от примерно 20×10^6 клеток/мл до примерно 600×10^6 клеток/мл, от примерно 25×10^6 клеток/мл до примерно 500×10^6 клеток/мл, от примерно 30×10^6 клеток/мл до примерно 400×10^6 клеток/мл, от примерно $35 \times$

10⁶ клеток/мл до примерно 300 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 40 x 10⁶ клеток/мл до примерно 200 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 45 x 10⁶ клеток/мл до примерно 150 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 50 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 55 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 60 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 65 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 70 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 75 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 80 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 85 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл, от примерно 90 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл или от примерно 95 x 10⁶ клеток/мл до примерно 100 x 10⁶ клеток/мл.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

[0050] На ФИГ. 1 показано сравнение обычного производственного процесса получения Т-клеток с получением Т-клеток с прямой сортировкой в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего раскрытия сущности.

[0051] На ФИГ. 2A-2D показано выделение CD8⁺ клеток для сортировки по пептиду MLA.

[0052] На ФИГ. 3 показана первая сортировка по MLA

[0053] На ФИГ. 4 показана вторая сортировка по MLA

[0054] На ФИГ. 5 представлены результаты сортировки по MLA в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0055] На ФИГ. 6A представлены данные о фенотипе памяти Т-клеток в исходных материалах в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0056] На ФИГ. 6B представлены данные о фенотипе памяти Т-клеток после проведения прямой сортировки по MLA в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0057] На ФИГ. 7 представлены данные о фенотипе памяти после проведения прямой сортировки, где большая доля тетрамер-положительных предшественников являются наивными Т-клетками.

[0058] На ФИГ. 8 представлены данные о фенотипе памяти после проведения прямой сортировки, где большая доля тетрамер-положительных предшественников являются наивными Т-клетками, экспрессирующими CD27 и CD62L.

[0059] На ФИГ. 9A–9D показано выделение CD8+ клеток для сортировки по MAGEA1.

[0060] На ФИГ. 10 показана сортировка по MAGEA1 в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0061] На ФИГ. 11 показана сортировка по MAGEA1 в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0062] На ФИГ. 12 показана сортировка по MAGEA1 в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0063] На ФИГ. 13 показана сортировка по MAGEA1 в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0064] На ФИГ. 14 показана сортировка по MAGEA1 в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0065] На ФИГ. 15A показаны данные после REP1 по подсчету клеток, жизнеспособности и кратности экспансии отсортированных напрямую Т-клеток, специфичных к MLA и MAGEA1.

[0066] На ФИГ. 15B показаны данные после REP2 по подсчету клеток, жизнеспособности и кратности экспансии отсортированных напрямую Т-клеток, специфичных к MLA и MAGEA1.

[0067] На ФИГ. 16A и 16B показаны данные для CD3+CD8+ клеток из отсортированных напрямую Т-клеток, специфичных к MLA и MAGEA1, после REP1 и после REP2, соответственно.

[0068] На ФИГ. 17A и 17B показаны данные для Tet+CD8+ клеток из отсортированных напрямую Т-клеток, специфичных к MLA и MAGEA1, после REP1 и после REP2, соответственно.

[0069] На ФИГ. 18A показаны данные проточного цитометрического анализа для MLA после REP1 на ФИГ. 16A и 17A.

- [0070] На ФИГ. 18В показаны данные проточного цитометрического анализа для MLA после REP2 на ФИГ. 16В и 17В.
- [0071] На ФИГ. 19А показаны данные проточного цитометрического анализа для Ag001-002 после REP1.
- [0072] На ФИГ. 19В показаны данные проточного цитометрического анализа для Ag001-002 после REP2.
- [0073] На ФИГ. 20А показан анализ количественной оценке гибели клеток T2 для отсортированных напрямую Т-клеток, специфичных к MLA.
- [0074] На ФИГ. 20В показан анализ количественной оценки гибели клеток T2 для отсортированных напрямую Т-клеток, специфичных к MAGEA1.
- [0075] На ФИГ. 21А показана сортировка клеток в присутствии дазатиниба при 37°C.
- [0076] На ФИГ. 21В показана сортировка клеток в отсутствие дазатиниба при комнатной температуре.
- [0077] На ФИГ. 22А показаны данные проточного цитометрического анализа по окрашиванию Т-клеток α Col6A3 в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.
- [0078] На ФИГ. 22В показаны данные проточного цитометрического анализа по окрашиванию Т-клеток, специфичных к α MLA, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.
- [0079] На ФИГ. 22С показаны данные проточного цитометрического анализа для смеси окрашенных α Col6A3 Т-клеток и окрашенных α MLA Т-клеток в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.
- [0080] На ФИГ. 23А показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.
- [0081] На ФИГ. 23В показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании одного окрашивания тетрамерами в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.
- [0082] На ФИГ. 23С показаны значения R-квадрата для двойного окрашивания тетрамерами и одного окрашивания тетрамерами в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0083] На ФИГ. 24А показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0084] На ФИГ. 24В показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании одного окрашивания тетрамерами в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0085] На ФИГ. 24С показаны значения R-квадрата для двойного окрашивания тетрамерами и одного окрашивания тетрамерами в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0086] На ФИГ. 24D показаны значения R-квадрата для двойного окрашивания тетрамерами и одного окрашивания тетрамерами в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0087] На ФИГ. 25А показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании одного окрашивания тетрамерами и антител, меченных флуорофором, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0088] На ФИГ. 25В показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании одного окрашивания тетрамерами и антител, меченных флуорофором, в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0089] На ФИГ. 25С показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами и антител, меченных флуорофором, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0090] На ФИГ. 25D показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами и антителом к флуорофору в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0091] На ФИГ. 25Е показаны данные проточного цитометрического анализа для контрольных клеток, окрашенных с помощью двойного окрашивания тетрамерами и антителами к флуорофору.

[0092] На ФИГ. 26 показаны данные проточного цитометрического анализа для образцов с добавками заданных концентраций в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0093] На ФИГ. 27 показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами и блокирующего вещества в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0094] На ФИГ. 28А показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами и тетрамером с несоответствующим пептидом при комнатной температуре (КТ) в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0095] На ФИГ. 28В показаны данные проточного цитометрического анализа при использовании двойного окрашивания тетрамерами и тетрамером с несоответствующим пептидом при 37°C в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0096] На ФИГ. 28С показано воздействие тетрамера с несоответствующим пептидом на окрашивание в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0097] На ФИГ. 29 показано воздействие дазатиниба (DAS) на окрашивание в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0098] На ФИГ. 30 показано воздействие температур на окрашивание в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0099] На ФИГ. 31А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные из условий окрашивания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00100] На ФИГ. 31В показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные из условий окрашивания в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00101] На ФИГ. 32 показаны индексы окраски для условий окрашивания в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00102] На ФИГ. 33А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00103] На ФИГ. 33В показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00104] На ФИГ. 34А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00105] На ФИГ. 34В показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00106] На ФИГ. 34С показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00107] На ФИГ. 35А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00108] На ФИГ. 35В показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00109] На ФИГ. 35С показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00110] На ФИГ. 36А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00111] На ФИГ. 36В показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00112] На ФИГ. 36С показаны столбчатые диаграммы для данных, показанных на ФИГ. 36А и 36В.

[00113] На ФИГ. 37А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00114] На ФИГ. 37В показано сравнение данных с обработкой DAS и без нее при окрашивании клеток в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00115] На ФИГ. 37С показано сравнение данных с обработкой DAS и без нее, выраженное в среднем значении интенсивности флуоресценции (MFI) в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00116] На ФИГ. 38 показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00117] На ФИГ. 39 показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00118] На ФИГ. 40А показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00119] На ФИГ. 40В показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условиях окрашивания, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00120] На ФИГ. 40С показано сравнение данных с обработкой DAS и без нее, выраженное в частоте встречаемости специфических Т-клеток, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00121] На ФИГ. 40D показано сравнение данных с обработкой DAS и без нее, выраженное в среднем значении интенсивности флуоресценции (MFI) в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00122] На ФИГ. 40Е показано воздействие отфильтрованных тетрамеров на окрашивание в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00123] На ФИГ. 41 показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00124] На ФИГ. 42 показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные при условии окрашивания в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00125] На ФИГ. 43 показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные из стратегии сортировки в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения.

[00126] На ФИГ. 44 представлена диаграмма эксплуатационных характеристик сортировки для ФИГ. 43.

[00127] На ФИГ. 45 показаны данные проточного цитометрического анализа, полученные из стратегии сортировки в соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00128] Адоптивная клеточная терапия (АКТ) – это перенос клеток пациенту, и она является персонализированным многоцелевым подходом АКТ, в котором Т-клеточные продукты могут производиться адресно, против соответствующих пептидов-мишеней опухолевых антигенов для пациентов, опухоли которых являются положительными по отношению по меньшей мере к одной мишени, выбранной из ряда опухолевых антигенов, ассоциирующихся с конкретным видом опухоли и/или индивидуальным опухолевым профилем пациента. См., например, Таблицу 1 настоящего документа.

[00129] АКТ для лечения или предупреждения заболевания может осуществляться за счет введения клеток, которые были отобраны, подвергнуты манипуляциям или изменены вне организма. Так как все больше продуктов для клеточной терапии поступают на клинические исследования и в реализацию на рынке, сложности представляет собой разработка биопроцессов, соответствующих действующим правилам надлежащей производственной практики (сGMP). Это может быть связано с тем, что конечные продукты не являются традиционными биологическими (секретируемыми) молекулами, такими как моноклональные антитела, а скорее самими клетками. В силу этого одним из акцентов разработки является выделение клеток в связи со значимостью их чистоты и специальные аспекты, связанные с соответствием протокола требованиям сGMP.

[00130] Этапы общего характера обычного процесса производства клеточного продукта, например, Т-клеток, могут включать сбор, уменьшение объема и выделение, манипуляции *ex vivo*, например, активацию, экспансию и/или генетическую модификацию и криоконсервацию. Для получения Т-клеток *in vitro* может быть использован ряд способов. Например, для получения цитотоксических

Т-клеток (ЦТЛ) могут использоваться аутологичные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты. Plebanski и соавт. в своей работе (*Eur. J Immunol* 25 (1995):1783-1787), содержание которой в полном объеме включено в данный документ путем ссылки, для получения Т-клеток используют аутологичные лимфоциты периферической крови (PBL). Кроме того, возможно получение аутологичных Т-клеток посредством нагрузки дендритных клеток пептидом или полипептидом или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом. Для получения аутологичных Т-клеток также можно использовать В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных Т-клеток могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. S. Walter и соавт. в своей работе (*J Immunol* 171 (2003): 4974-4978), содержание которой в полном объеме включено в данный документ путем ссылки, описывают примирование Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК), что является также подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. Например, иАПК могут быть получены прикреплением предварительно полученных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросферы) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система может допустить точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК могут нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система может включать соответствующие растворимые факторы, к примеру, цитокины, такие как интерлейкин-12.

[00131] На ФИГ. 1 (левая блок-схема) показан обычный процесс получения Т-клеток, который может включать выделение МКПК и истощение по CD25, с последующим (1) получением дендритных клеток (ДК) в течение недели, (2) первой стимуляцией (Стим 1) Т-клеток с помощью ДК в течение недели, (3) повторной стимуляцией (Стим 2) Т-клеток после Стим 1 с помощью ДК в течение недели, (4) сортировкой простимулированных клеток, (5) экспансией отсортированных клеток по первому «протоколу быстрой экспансии» (REP1) в течение 2 недель, и (6) экспансией Т-клеток, экспансированных по REP1, в

течение 2 недель (REP2).

[00132] В настоящем раскрытии сущности предложены усовершенствованные способы получения Т-клеточных продуктов. На ФИГ. 1 (правая блок-схема) показан один вариант осуществления прямого процесса получения Т-клеток, который может включать выделение CD8+ Т-клеток, стимуляцию выделенных CD8+ Т-клеток с последующей (1) сортировкой простимулированных клеток, (2) экспансией отсортированных клеток по первому «протоколу быстрой экспансии» (REP1) в течение 2 недель, и (3) экспансией Т-клеток, экспандированных по REP1, в течение 2 недель (REP2). Альтернативно, отсортированные Т-клетки могут быть экспандированы за счет стимуляции Т-клеток агностическими антителами, например, антителом к CD3 и антителом к CD28, или искусственными антигенпрезентирующими клетками.

[00133] В одном аспекте процессы прямой сортировки, описанные в настоящем документе, обеспечивают получение жизнеспособных Т-клеток за существенно меньшие сроки, чем в рамках обычных процессов. Например, на ФИГ. 1 показано, что обычный процесс может быть завершен в течение от примерно 50 дней до примерно 55 дней, например, примерно за 52 дня, тогда как прямая сортировка может быть завершена за 30 дней или менее, например, завершена в течение от примерно 7 дней до примерно 14 дней, от примерно 7 дней до примерно 21 дня, от примерно 7 дней до примерно 28 дней, от примерно 14 дней до примерно 21 дня, от примерно 14 дней до примерно 28 дней, или от примерно 21 дня до примерно 28 дней, примерно за 30 дней или менее, или завершена примерно за 16 дней или менее, например, за всего один цикл REP.

[00134] В другом аспекте процессы прямой сортировки могут включать выделение CD8+ Т-клеток. CD8+ Т-клетки могут быть выделены из нормальных тканей, пораженных заболеванием тканей, например, опухолей, цельной крови, МКПК, продуктов лейкофереза и/или опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), полученных у пациентов, подлежащих лечению, или у здоровых доноров.

[00135] В другом аспекте чистота CD8+ Т-клеток может составлять по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 86 %, по меньшей мере 87 %, по меньшей мере 88 %, по меньшей мере 89 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей

мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 %.

[00136] В другом аспекте процессы прямой сортировки могут выполняться при использовании в качестве исходного сырья МКПК, например, без выделения клеток CD8+.

[00137] В другом аспекте выделенные CD8+ Т-клетки могут проходить стадию покоя в культуре тканей в присутствии или отсутствии цитокинов. В контексте настоящего описания понятие «Т-клетка в стадии покоя» относится к Т-клетке, которая не делится или вырабатывает цитокины. Т-клетки в стадии покоя невелики (приблизительно 6–8 мкм) по размеру в сравнении с активированными Т-клетками (приблизительно 12–15 мкм).

[00138] В одном аспекте выделенные CD8+ Т-клетки, которые предварительно не были активированы *in vitro*, могут находиться в стадии покоя в присутствии или отсутствие цитокинов. Стадия покоя может длиться в течение периода времени от примерно 0,5 часа до примерно 120 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 108 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 96 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 84 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 72 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 60 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 48 часов, от примерно 0,5 часов до примерно 36 часов, от примерно 12 часов до примерно 96 часов, от примерно 24 часов до 72 часов, от примерно 12 часов до примерно 60 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 24 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 18 часов, от примерно 0,5 до примерно 12 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 6 часов, от примерно 1 часа до примерно 24 часов, от примерно 1 часа до примерно 12 часов, от примерно 2 до примерно 8 часов, от примерно 3 часов до примерно 6 часов или от примерно 1 часа до примерно 5 часов.

[00139] В другом аспекте стадия покоя может проходить в отсутствие цитокинов или в присутствии цитокинов, например, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21, или их комбинации, такой как ИЛ-7 + ИЛ-15, в течение от примерно 0,5 часа до примерно 48 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 36 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 24 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 18 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 12 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 6 часов, от примерно 1 часа до примерно 6 часов, от примерно 2 часов до примерно

5 часов, от примерно 3 часов до примерно 5 часов, от примерно 4 часов до примерно 6 часов, от примерно 1 часа до примерно 24 часов, от примерно 2 до примерно 24 часов, от примерно 12 до примерно 48 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 120 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 108 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 96 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 84 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 72 часов или от примерно 0,5 часа до примерно 60 часов, от примерно 4 до примерно 6 часов, от примерно 12 часов до примерно 96 часов, от примерно 24 до 72 часов, от примерно 12 до примерно 60 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 24 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 18 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 12 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 6 часов, от примерно 1 часа до примерно 24 часов, от примерно 1 часа до примерно 12 часов или от примерно 2 до примерно 8 часов.

[00140] В одном аспекте процессы прямой сортировки не включают активацию выделенных CD8+ Т-клеток до сортировки. Например, выделенные CD8+ Т-клетки могут не быть активированы за счет сигнала 1 от ДК, нагруженных пептидом, или пептид-специфических иАПК; и/или сигнала 2 за счет агонистов CD3 (например, антитело к CD3), CD28 (например, или антитело к CD28), OX40 (CD134), ICOS (CD278), и/или 4-1BBL (CD137).

[00141] *Сортировка клеток*

[00142] Настоящее изобретение включает более эффективный способ выделения CD8+ Т-клеток при использовании методик сортировки клеток. Сортировка клеток на основе маркеров клеточной поверхности может выполняться с помощью одной или нескольких технологий, включая, но без ограничения, сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), сортировку клеток с магнитной активацией (MACS), пэннинг, розеткообразование, и тому подобное, в чем обычно используются антитела или другие реактивы, которые специфически распознают и связываются с исследуемыми компонентами поверхности клетки. Сортировка клеток на основании внутриклеточных маркеров может осуществляться при использовании метода FACS с помощью фиксации и пермеабилзации клеток с последующим окрашиванием, например, меченым антителом, специфическим для внутриклеточного маркера. Лимфоциты могут быть отсортированы на исследуемые субпопуляции с помощью метода FACS, например, при использовании имеющихся в продаже приборов и инструкций

производителя и наборов, таких как BD Biosciences FACS Aria III или BD Biosciences Influx (BD Biosciences, Сан Хосе, шт. Калиф.). Сортировка или выделение лимфоцитов на основании специфичности к антигену как Т-клеточных рецепторов, так и В-клеточных рецепторов, может выполняться при использовании метода FACS, или метода FACS в комбинации с другими технологиями, такими как MACS. В клеточных сортерах, таких как FACS Aria (BD), применяют нагнетательные насосы со сложными линиями подачи жидкости, которые не предназначены для одноразового использования в каждом эксперименте. Пользователям этих клеточных сортеров приходится производить этапы тщательной промывки между экспериментами, чтобы избежать перекрестной контаминации.

[00143] Клеточная сортировка может также производиться при использовании микрочипов. Сортировка клеток на микрочипах за счет снижения размера требуемого оборудования обеспечивает многочисленными преимуществами по сравнению с обычными способами, устраняя потенциально биологически опасные аэрозоли и упрощая сложные протоколы, обычно связанные с сортировкой клеток. Кроме того, устройства с микрочипами могут хорошо подходить для параллельного использования, представляя собой полноценные устройства типа «лаборатория на чипе» для выделения клеток, анализа и экспериментальной обработки.

[00144] В одном аспекте выделенные CD8⁺ Т-клетки могут быть мечены мультимером пептид/молекула МНС, например, тетрамером, меченным поддающимися обнаружению веществами, например, флуорофорами, для последующей сортировки с использованием многопараметрового сортирования с помощью клеточных сортеров на основе микрочипов, например, MACSQuant® Tyto® Cell Sorter (Miltenyi Biotec) и On-Chip Sort (On-chip Biotechnologies), в которых для поддержания постоянной скорости потока для сортировки могут использоваться нагнетательные или шприцевые насосы. Клеточные сортеры на основе микрочипов обычно представляют собой простые в применении настольные сортеры, в которых используется полностью закрытая и стерильная система картриджей. Как таковая, сортировка с помощью чипов является очень мягкой по отношению к клеткам, позволяя проводить несколько последовательных сортировок без потери жизнеспособности.

[00145] В одном аспекте процессы прямой сортировки могут приводить к положительным по тетрамеру с пептидом Т-клеткам после сортировки до экспансии с содержанием по меньшей мере 1 %, по меньшей мере 5 %, по меньшей мере 10 %, по меньшей мере 25 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 35 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 45 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 55 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 65 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % предшественников наивных Т-клеток.

[00146] В одном аспекте процессы прямой сортировки могут производить сходную процентную долю предшественников наивных Т-клеток, как и на этапе после сортировки для обеспечения чистоты до экспансии до получения конечного продукта, получаемого с помощью обычных процессов.

[00147] В одном аспекте отсортированные Т-клетки, полученные с помощью метода прямой сортировки, могут быть экспансированы при использовании по меньшей мере одного цикла «протокола быстрой экспансии» (REP). Понятие «протокол быстрой экспансии» (REP), используемое в контексте настоящего описания, относится к клональным популяциям Т-клеток, например, TIL и CD8+ Т-клеток, экспансированным *in vitro* при помощи протокола REP, как было описано ранее в работе Riddell и соавт. (*J. Immunol. Methods* 128, 189; содержание которой в полном объеме включено путем ссылки). Например, приблизительно 5×10^4 CD8+ Т-клеток (или колония отдельной клетки из 96-луночного планшета для клонирования) могут быть добавлены во флакон для культивирования тканей T25, содержащий 25 мл смеси для клонирования, состоящей из среды ЦТЛ с 5×10^6 облученными ТМ-LCL, 25×10^6 облученными аллогенными МКПК, 30 нг/мл ОКТ3 и 50 Ед/мл ИЛ-2. Культуры могут быть собраны и ресуспендированы в равном объеме свежей среды для ЦТЛ с добавлением 50 Ед/мл ИЛ-2 через 4 дня культивирования. Питание культур может осуществляться за счет замены половины объема питательной среды каждые 3–4 дня на свежую питательную среду для ЦТЛ и добавления ИЛ-2 до конечной концентрации 50 Ед/мл. После 12 дней в культуре клетки могут быть собраны для анализа с помощью окрашивания мультимерами или анализа с высвобождением хрома.

[00148] В одном аспекте отсортированные Т-клетки могут быть экспансированы

в присутствии цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15 и/или ИЛ-21.

[00149] В одном аспекте концентрация ИЛ-2 может быть от примерно 10 Ед/мл до примерно 1000 Ед/мл, от примерно 20 Ед/мл до примерно 900 Ед/мл, от примерно 30 Ед/мл до примерно 800 Ед/мл, от примерно 40 Ед/мл до примерно 700 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 600 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 550 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 500 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 450 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 400 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 350 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 300 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 250 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 200 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 150 Ед/мл или от примерно 50 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл.

[00150] В другом аспекте концентрация ИЛ-7 может быть от примерно 1 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 90 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 80 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 70 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 60 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 50 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 40 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 30 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 20 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 15 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 10 нг/мл, от примерно 2 нг/мл до 10 нг/мл, от примерно 4 нг/мл до 10 нг/мл, от примерно 6 нг/мл до 10 нг/мл или от примерно 5 нг/мл до 10 нг/мл.

[00151] В другом аспекте концентрация ИЛ-12 может быть от примерно 1 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 90 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 80 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 70 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 60 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 50 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 40 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 30 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 20 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 15 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 10 нг/мл, от примерно 2 нг/мл до 10 нг/мл, от примерно 4 нг/мл до 10 нг/мл, от примерно 6 нг/мл до 10 нг/мл или от примерно 5 нг/мл до 10 нг/мл.

[00152] В одном аспекте концентрация ИЛ-15 может быть от примерно 5 нг/мл до 500 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 400 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 300 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 200 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 150 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 20 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 30 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 40 нг/мл до 100 нг/мл,

от примерно 50 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 60 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 70 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 80 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 90 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 50 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 50 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до 50 нг/мл или от примерно 20 нг/мл до 50 нг/мл.

[00153] В одном аспекте концентрация ИЛ-21 может быть от примерно 5 нг/мл до 500 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 400 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 300 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 200 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 150 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 20 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 30 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 40 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 50 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 60 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 70 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 80 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 90 нг/мл до 100 нг/мл, от примерно 1 нг/мл до 50 нг/мл, от примерно 5 нг/мл до 50 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до 50 нг/мл или от примерно 20 нг/мл до 50 нг/мл.

[00154] В одном аспекте с помощью процессов прямой сортировки могут быть произведены Т-клетки после этапа экспансии, имеющие по меньшей мере 20 %, по меньшей мере 30 %, по меньшей мере 40 %, по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 55 %, по меньшей мере 60 %, по меньшей мере 65 %, по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 % клеточной жизнеспособности.

[00155] В одном аспекте с помощью процессов прямой сортировки могут быть произведены Т-клетки после этапа экспансии, достигающие по меньшей мере 50-кратную, 100-кратную, 150-кратную, 200-кратную, 500-кратную, 1000-кратную, 2000-кратную, 3000-кратную, 4000-кратную, 5000-кратную, 6000-кратную, 7000-кратную, 8000-кратную, 9000-кратную или 10000-кратную экспансию.

[00156] Преимущества настоящего изобретения могут включать (1) очень мягкое влияние на клетки в связи с основанной на микрочипах сортировкой, позволяющей проводить несколько последовательных циклов сортировки без потери жизнеспособности, (2) высокоскоростные картриджи, способные производить сортировку со скоростью примерно 8 мл/час (примерно в два раз быстрее, чем стандартный картридж), (3) серии сортировки с концентрациями клеток в диапазоне от 2×10^7 клеток/мл до 4×10^7 клеток/мл с последующей быстрой сортировкой для обеспечения чистоты, с получением антиген-специфических Т-

клеток по отношению к нескольким мишеням высокой степени чистоты, (4) быстрая экспансия отсортированных клеток до высокой численности клеток в присутствии цитокинов и питающих клеток с получением антиген-специфических Т-клеток, сходных по фенотипу с клетками, получаемыми с помощью обычной стимуляции АПК, (5) первоначальный отбор CD8+ Т-клеток + сортировка с тетрамерами, минимизирующая экспансию контаминирующих CD4+ Т-клеток, позволяющая сохранить чистоту продукта на всей фазе быстрой экспансии, (6) более короткий процесс по настоящему изобретению, требующий практически на 50% меньше времени для производства Т-клеточных продуктов и не ограничивающийся наличием АПК или числом опухолевых мишеней, для которых может быть получен продукт, (7) процесс, который может быть легко переведен в закрытую систему для производства согласно действующим правилам GMP при использовании автоматического отбора клеток CD8 для клинического применения, полностью закрытого картриджа для сортировки, с последующим выбором любой технологии для экспансии в закрытой системе, и (8) способ получения отобранных для пептида-мишени Т-клеток, обеспечивающий Т-клетками с высокой специфичностью к их желаемому пептиду-мишени со снижением перекрестного реагирования с пептидами, имеющими сходные (но не идентичные) последовательности в сравнении с желаемым пептидом-мишенью.

[00157] В обычных процессах для выделения и отбора опухолеспецифических Т-клеток выделенные клетки подвергаются активации Т-клеток. Применение, например, антител к CD3/CD28, обеспечивает активационным сигналом для популяции Т-клеток. Т-клетки могут требовать, по меньшей мере, два сигнала для активации. Сигнал один (сигнал-1) является антиген-специфическим, и его вызывают комплексы пептид/молекула главного комплекса гистосовместимости (МНС), презентируемые антигенпрезентирующими клетками (АПК), а его прием происходит за счет комплекса Т-клеточный рецептор (ТКР)/CD3. Сигнал два (сигнал-2) (который не является антиген-специфическим) также доставляется антигенпрезентирующими клетками, и одной из молекул-кандидатов для его рецептора является Т-клеточный антиген CD28. Считается, что когда оба, ТКР/CD3 и рецептор CD28 Т-клеток, заняты подходящими лигандами, Т-клетки получают стимуляцию к пролиферации и вырабатывают ИЛ-2 (цитокин, необходимый для пролиферации Т-клеток), тогда как задействование только Т-

клеточного рецептора благоприятствует анергии или апоптозу Т-клетки. В экспериментах *in vitro* было показано, что рост Т-клеток и выработка цитокинов может стимулироваться за счет культивирования Т-клеток с антителами к CD3, которые были иммобилизованы на твердой фазе (например, гранулах или планшетах для культивирования ткани), и добавления растворимых антител CD28. Кроме того, было показано, что одновременная иммобилизация антител к CD3 и CD28 на одной и той же твердой фазе или на различных твердых фазах может также вызывать пролиферацию Т-клеток.

[00158] ТКР представляет собой молекулу, присутствующую на поверхности Т-лимфоцитов (или Т-клеток), которая, как правило, несет ответственность за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Он представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа- и бета-цепи в 95% Т-клеток, тогда как 5% Т-клеток имеют ТКР, состоящие из гамма- и дельта-цепей. Взаимодействие ТКР с антигеном и МНС приводит к активации Т-лимфоцита посредством каскада биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами и специализированными вспомогательными молекулами. В иммунологии антиген CD3 (CD обозначает «кластер дифференциации») представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех различных цепей (CD3-γ, Cd3δ и дважды Cd3ε), у млекопитающих, который ассоциируется с молекулами, известными как Т-клеточный рецептор (ТКР) и ζ-цепь, для генерации сигнала активации в Т-лимфоцитах. ТКР, ζ-цепь и молекулы CD3 в совокупности составляют комплекс ТКР. Цепи CD3-γ, Cd3δ и Cd3ε являются белками клеточной поверхности с высокой степенью родства из семейства иммуноглобулинов, содержащего одиночный внеклеточный домен иммуноглобулина. Трансмембранная область цепей CD3 несет отрицательный заряд, характеристику, которая позволяет этим цепям соединяться с положительно заряженными цепями ТКР (TCRα и TCRβ). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат одиночный консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), который имеет важное значение для способности ТКР передавать сигналы.

[00159] CD28 является одной из молекул, экспрессируемых на Т-клетках, которая обеспечивает костимуляторные сигналы, необходимые для активации Т-

клеток. CD28 является рецептором для B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86). При активации лигандами Toll-подобного рецептора экспрессия B7.1 в антигенпрезентирующих клетках (АПК) повышается. Экспрессия B7.2 на антигенпрезентирующих клетках является конститутивной. CD28 является единственным рецептором B7, который конститутивно экспрессируется на наивных Т-клетках. Стимуляция посредством CD28 в дополнение к ТКР может обеспечить Т-клеткам мощный костимуляторный сигнал к продукции различных интерлейкинов (в частности, ИЛ-2 и ИЛ-6).

[00160] Для получения Т-клеток *in vitro* в обычном процессе используются ряд других способов. Например, для получения ЦТЛ используются аутологичные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты. Например, для получения Т-клеток могут использоваться аутологичные лимфоциты периферической крови (PBL). Кроме того, возможно получение аутологичных Т-клеток посредством нагрузки дендритных клеток (ДК) пептидом или полипептидом или посредством инфицирования рекомбинантным вирусом, если это возможно. Для получения аутологичных Т-клеток также можно использовать В-клетки. Кроме того, для получения аутологичных Т-клеток могут быть использованы макрофаги, нагруженные пептидом или полипептидом или инфицированные рекомбинантным вирусом. Кроме того, примирование Т-клеток *in vitro* с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (иАПК) также может быть подходящим способом получения Т-клеток против выбранного пептида. Например, иАПК могут быть получены прикреплением предварительно полученных комплексов МНС-пептид к поверхности полистироловых частиц (микросферы) с помощью биохимического способа с биотином-стрептавидином. Данная система допускает точный контроль плотности МНС на иАПК, который позволяет селективно вызвать высоко- или низкоавидные антигенспецифические Т-клеточные ответы с высокой эффективностью в образцах крови. Кроме комплексов МНС-пептид, иАПК должны нести другие белки с костимуляторной активностью, такие как антитела к CD28, прикрепленные к их поверхности. Кроме того, такая основанная на иАПК система часто требует добавления соответствующих растворимых факторов, к примеру, цитокинов, таких как интерлейкин-12.

[00161] Однако АКТ солидных раковых заболеваний при использовании эндогенных Т-клеток может быть длительным и сложным процессом, требующим

применения антигенпрезентирующих клеток (АПК). Стимуляция антиген-специфических Т-клеток при использовании АПК может варьироваться и быть трудно осуществимой из-за дополнительных производственных этапов, времени и расходов на производственный процесс. Поэтому варианты осуществления настоящего изобретения включают применение более прямого подхода, например, время и процесс производства могут быть значительно сокращены, если начинать с отбора антиген-специфических предшественников с низкой частотой встречаемости из свежих продуктов лейкофереза или свежих моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), избегая необходимость наличия веществ, активирующих Т-клетки, таких как АПК и/или антитело к CD3 и антитело к CD28.

[00162] *Комплекс пептид/МНС*

[00163] В одном аспекте изобретения процесс прямой сортировки включает этап контактирования CD8⁺ Т-клеток с мультимером, включающим пептид-мишень в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС), и по меньшей мере одним антителом, которое связывается с молекулой на поверхности Т-клетки. Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных антигенов (ТАА) или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами МНС. Антигенами, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть, их эпитопами, могут быть молекулы, образованные из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т. д., которые экспрессируются и обычно имеют, по сравнению с неизмененными клетками того же происхождения, повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

[00164] Существуют два класса молекул МНС, МНС I класса и МНС II класса. Молекулы МНС I класса состоят из альфа-тяжелой цепи и бета-2-микроглобулина, молекулы МНС II класса – из альфа- и бета-цепи. Их трехмерная конформация образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. Молекулы МНС I класса встречаются на большинстве клеток, имеющих ядро. Они презентуют пептиды, образующиеся при протеолитическом расщеплении преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRIP) и более крупных пептидов. Однако

пептиды, образованные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто встречаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации I классом называется кросс-презентацией. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

[00165] Комплексы пептида и молекул МНС I класса распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими подходящий Т-клеточный рецептор (ТКР), тогда как комплексы пептида и молекул МНС II класса распознаются CD4-положительными хелперными Т-клетками, несущими подходящий ТКР. Хорошо известно, что ТКР, пептид и МНС встречаются в стехиометрическом соотношении 1:1:1.

[00166] CD4-положительные хелперные Т-клетки играют важную роль в индуцировании и поддержании эффективных ответов CD8-положительных цитотоксических Т-клеток. Идентификация CD4-положительных Т-клеточных эпитопов, образованных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), может быть чрезвычайно важна для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов. В месте локализации опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) цитокиновое окружение и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, природные киллерные клетки (NK), макрофаги, гранулоциты.

[00167] При отсутствии воспаления экспрессия молекул МНС II класса преимущественно ограничена клетками иммунной системы, в особенности профессиональными антигенпрезентирующими клетками (АПК), например, моноцитами, образованными из моноцитов клетками, макрофагами и дендритными клетками. Было обнаружено, что опухолевые клетки больных раком пациентов экспрессируют молекулы МНС II класса. Удлиненные (более длинные) пептиды согласно описанию могут выполнять функцию активных эпитопов МНС II класса.

[00168] Т-хелперные клетки, активированные эпитопами МНС II класса, играют

важную роль в управлении эффекторной функцией ЦТЛ в противоопухолевом иммунитете. Эпитопы Т-хелперных клеток, инициирующие ответы Т-хелперных клеток типа TH1, поддерживают эффекторные функции CD8-положительных киллерных Т-клеток, которые включают цитотоксические функции, направленные против опухолевых клеток, экспонирующих комплексы опухолеассоциированный пептид/МНС на их клеточной поверхности. Таким образом, опухолеассоциированные пептидные эпитопы Т-хелперных клеток, одни или в комбинации с другими опухолеассоциированными пептидами, могут служить в качестве активных фармацевтических ингредиентов вакцинных композиций, которые стимулируют противоопухолевые иммунные ответы.

[00169] На моделях млекопитающих животных, например, мышах, было показано, что даже при отсутствии CD8-положительных Т-лимфоцитов, CD4-положительных Т-клеток достаточно для ослабления клинических проявлений опухолей посредством ингибирования ангиогенеза при секреции интерферон-гамма (IFN- γ). Существуют доказательства того, что CD4-положительными Т-клетки являются эффекторными клетками прямого противоопухолевого действия.

[00170] Поскольку конститутивная экспрессия молекул HLA II класса обычно ограничена иммунными клетками, ранее не считалось возможным выделить пептиды II класса непосредственно из первичных опухолей. Тем не менее, Dengjel с соавторами удалось идентифицировать ряд эпитопов МНС II класса непосредственно из опухолей (заявки WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1, содержание которых в полном объеме включено путем ссылки).

[00171] Поскольку оба вида ответов, зависящие от клеток CD8 и CD4, вносят свой вклад в противоопухолевый эффект сообща и синергически, то идентификация и определение характеристик опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8+ Т-клетками (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

[00172] Чтобы пептид в комплексе с МНС I класса инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он должен также связаться с молекулой МНС II класса. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и конкретных

полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, обычно имеют длину 8–12 аминокислотных остатков и обычно содержат два консервативных остатка («якоря») в своей последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС имеет «связывающий мотив», определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой.

[00173] В зависящей от МНС I класса иммунной реакции пептиды не только должны быть в состоянии связываться с конкретными молекулами МНС I класса, экспрессируемыми опухолевыми клетками, но они также должны затем распознаваться Т-клетками, несущими специфические Т-клеточные рецепторы (ТКР).

[00174] Для того чтобы белки были распознаны Т-лимфоцитами в качестве опухолеспецифических или опухолеассоциированных антигенов, и чтобы они могли использоваться в терапии, должны выполняться конкретные предварительные условия. Антиген должен экспрессироваться главным образом опухолевыми клетками и не экспрессироваться или экспрессироваться в сравнительно небольших количествах нормальными здоровыми тканями. В предпочтительном варианте осуществления пептид должен избыточно презентироваться опухолевыми клетками по сравнению с нормальными здоровыми тканями. Кроме того, желательно, чтобы соответствующий антиген не только присутствовал в каком-либо виде опухоли, но и также имел высокую концентрацию (т. е. несколько копий соответствующего пептида на клетку). Опухолеспецифические и опухолеассоциированные антигены часто образованы из белков, напрямую задействованных в трансформации нормальной клетки в опухолевую, в связи с их функцией, например, при контроле клеточного цикла или подавлении апоптоза. Кроме того, нисходящие мишени, являющиеся непосредственной причиной трансформации, могут иметь повышенный уровень и, таким образом, могут быть косвенно ассоциированы с опухолью. Такие косвенно опухолеассоциированные антигены могут также быть мишенями вакцинационного подхода. Необходимо, чтобы эпитопы присутствовали в аминокислотной последовательности антигена, чтобы гарантировать, что такой пептид («иммуногенный пептид»), образованный из опухолеассоциированного антигена,

ведет к Т-клеточному ответу *in vitro* или *in vivo*.

[00175] Поэтому антигены ТАА являются отправной точкой для разработки терапии на основе Т-клеток, включающей противоопухолевые вакцины, но не ограничивающейся ими. Способы идентификации и определения характеристик ТАА обычно основаны на использовании Т-клеток, которые могут быть выделены у пациентов или здоровых субъектов, или они основаны на определении различия профилей транскрипции или различия картин экспрессии пептидов в опухолях и нормальных тканях. Однако идентификация генов, избыточно экспрессированных в опухолевых тканях или линиях опухолевых клеток человека, или селективно экспрессированных в таких тканях или клеточных линиях, не предоставляет точную информацию относительно использования антигенов, транскрибируемых из этих генов, в иммунной терапии. Это обусловлено тем, что только отдельная субпопуляция эпитопов этих антигенов подходит для такого применения, так как Т-клетка с соответствующим ТКР должна быть в наличии, и необходимо, чтобы отсутствовала или была минимальной иммунологическая толерантность к этому конкретному эпитопу. Поэтому в наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения важно выбрать только те пептиды, презентируемые в избытке или селективно, против которых может быть обнаружена функциональная и/или пролиферирующая Т-клетка. Такая функциональная Т-клетка определяется как Т-клетка, которая при стимуляции специфическим антигеном может быть распространена посредством клонирования и способна к выполнению эффекторных функций («эффекторная Т-клетка» или T_{EM}).

[00176] В одном аспекте пептиды опухолеассоциированного антигена (ТАА), которые применимы в совокупности со способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают, например, те пептиды ТАА, что описаны в патентной заявке США 20160187351, патентной заявке США 20170165335, патентной заявке США 20170035807, патентной заявке США 20160280759, патентной заявке США 20160287687, патентной заявке США 20160346371, патентной заявке США 20160368965, патентной заявке США 20170022251, патентной заявке США 20170002055, патентной заявке США 20170029486, патентной заявке США 20170037089, патентной заявке США 20170136108, патентной заявке США 20170101473, патентной заявке США 20170096461, патентной заявке США 20170165337, патентной заявке США

20170189505, патентной заявке США 20170173132, патентной заявке США 20170296640, патентной заявке США 20170253633, патентной заявке США 20170260249, патентной заявке США 20180051080, патентной заявке США № 20180164315, патентной заявке США 20180291082, патентной заявке США 20180291083, патентной заявке США 20190255110, патенте США 9 717 774, патенте США 9,895,415, патентной заявке США 20190247433, патентной заявке США 20190292520, патентной заявке США 20200085930, патенте США 10 336 809, патенте США 10 131 703, патенте США 10 081 664, патенте США 10 081 664, патентах США 10 093 715, 10 583 573 и патентной заявке США US20200085930, содержание каждой из этих публикаций, списков последовательностей, описанных в них, включены в данное описание во всей полноте путем ссылки.

[00177] В одном аспекте Т-клетки, описанные здесь, селективно распознают клетки, презентующие пептид ТАА, описанные в одном или более патентов или публикаций, описанных выше.

[00178] В другом аспекте ТАА, которые применимы в совокупности со способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают по меньшей мере одну из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 161. В одном аспекте Т-клетки, селективно распознают клетки, презентующие пептид ТАА, описанные в SEQ ID NO: 1–161 или любым из патентов или заявок на патент, описанных в настоящем контексте.

[00179] Таблица 1. Список ТАА

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
1	YLYDSETKNA	54	LLWGHPRVALA	106	VLLNEILEQV
2	HLMDQPLSV	55	VLDGKVAVV	107	SLLNQPKAV
3	GLLKKINSV	56	GLLGKVTSV	108	KMSELQTYV
4	FLVDGSSAL	57	KMISAIPTL	109	ALLEQTGDMSL
5	FLFDGSANLV	58	GLLETTGLLAT	110	VIKGLEEITV
6	FLYKIIDEL	59	TLNTLDINL	111	KQFEGTVEI
7	FILDSAETTTL	60	VIKGLEEI	112	KLQEEIPVL
8	SVDVSPPKV	61	YLEDGFAYV	113	GLAEFQENV

9	VADKIHVS	62	KIWEELSVLEV	114	NVAEIVIHI
10	IVDDLTINL	63	LLIPFTIFM	115	ALAGIVTNV
11	GLLEELVTV	64	ISLDEVAVSL	116	NLLIDDKGTIKL
12	TLDGAAVNQV	65	KISDFGLATV	117	VLMQDSRLYL
13	SVLEKEIYSI	66	KLIGNIHGNEV	118	KVLEHVVRV
14	LLDPKTIFL	67	ILLSVLHQL	119	LLWGNLPEI
15	YTFSGDVQL	68	LDSEALLTL	120	SLMEKNQSL
16	YLMDDFSSL	69	VLQENSSDYQSNL	121	KLLAVIHEL
17	KVWSDVTPL	70	HLLGEGAFAQV	122	ALGDKFLLRV
18	LLWGHPRVALA	71	SLVENIHVL	123	FLMKNSDLYGA
19	KIWEELSVLEV	72	YTFSGDVQL	124	KLIDHQGLYL
20	LLIPFTIFM	73	SLSEKSPEV	125	GPGIFPPPPQP
21	FLIENLLAA	74	AMFPDTIPRV	126	ALNESLVEC
22	LLWGHPRVALA	75	FLIENLLAA	127	GLAALAVHL
23	FLLEREQLL	76	FTAEFLEKV	128	LLLEAVWHL
24	SLAETIFIV	77	ALYGNVQQV	129	SIIEYLPTL
25	TLLEGISRA	78	LFQSRIAGV	130	TLHDQVHLL
26	ILQDGQFLV	79	ILAEPIYIRV	131	SLLMWITQC
27	VIFEGEPMYL	80	FLLEREQLL	132	FLLDKPQDLSI
28	SLFESLEYL	81	LLLPLELSLA	133	YLLDMPLWYL
29	SLLNQPKAV	82	SLAETIFIV	134	GLLDCPIFL
30	GLAEFQENV	83	AILNVDEKNQV	135	VLIEYNFSI
31	KLLAVIHEL	84	RLFEEVLGV	136	TLYNPERTITV
32	TLHDQVHLL	85	YLDEVAFML	137	AVPPPPSSV
33	TLYNPERTITV	86	KLIDEDEPLFL	138	KLQEELNKV
34	KLQEKIQEL	87	KLFEKSTGL	139	KLMDPGSLPPL
35	SVLEKEIYSI	88	SLLEVNEASSV	140	ALIVSLPYL
36	RVIDDSLWGV	89	GVYDGREHTV	141	FLLDGSANV
37	VLFGELPAL	90	GLYPVTLVGV	142	ALDPSGNQLI
38	GLVDIMVHL	91	ALLSSVAEA	143	ILIKHLVKV
39	FLNAIETAL	92	TLLEGISRA	144	VLLDTILQL

40	ALLQALMEL	93	SLIEESEEL	145	HLIAEIHTA
41	ALSSSQAEV	94	ALYVQAPTV	146	SMNGGVFAV
42	SLITGQDLLSV	95	KLIYKDLVSV	147	MLAEKLLQA
43	QLIEKNWLL	96	ILQDGQFLV	148	YMLDIFHEV
44	LLDPKTIFL	97	SLLDYEVS	149	ALWLPTDSATV
45	RLHDENILL	98	LLGDSSFFL	150	GLASRILDA
46	YTFSGDVQL	99	VIFEGEPMYL	151	ALSVLRLAL
47	GLPSATTTV	100	ALSYILPYL	152	SYVKVLHHL
48	GLLPSAESIKL	101	FLFVDPELV	153	VYLPKIPSW
49	KTASINQNV	102	SEWGSPHAAVP	154	NYEDHFPLL
50	SLLQHLLGL	103	ALSELERVL	155	VYIAELEKI
51	YLMDDFSSL	104	SLFESLEYL	156	VHFEDTGKTLF
52	LMYPYIYHV	105	KVLEYVIKV	157	VLSPFILTL
53	KVWSDVTPL			158	HLLEGSGVG
				159	ALREEEEGV
				160	KEADPTGHSY
				161	TLDEKVAEL

[00180] *Источники Т-клеток*

[00181] Т-клетки могут быть собраны как из опухоли (опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, TIL), так и из периферической крови (лимфоциты периферической крови, МКПК), или из продуктов лейкофереза. TIL могут быть экспансированы неспецифическим образом, поскольку до культивирования они преимущественно являются опухоль-специфическими. Напротив, специфичность к опухоли может быть вызвана у МКПК и продуктов лейкофереза как за счет антиген-специфической экспансии, так и методами генной инженерии.

[00182] До экспансии и генной модификации Т-клеток источник Т-клеток может быть получен у здорового или больного субъекта. В одном аспекте субъект может включать человека. В другом аспекте субъект может включать мышь, например, гуманизированных мышь, крысу, кролика, собаку, кошку и обезьяну. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, в том числе из мононуклеарных клеток

периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани вилочковой железы, ткани из очага инфекции, асцитов, плеврального секрета, ткани селезенки и опухолей. В конкретных вариантах осуществления может быть использовано любое количество линий Т-клеток, известных из области техники. В конкретных вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из единичной дозы крови, отобранной у субъекта с помощью ряда методик, известных опытному специалисту, таких как разделение в системе Ficoll™. В одном предпочтительном варианте осуществления клетки из циркулирующей крови одного индивида могут быть получены с помощью афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие белые кровяные клетки, имеющие ядро, эритроциты и тромбоциты. Клетки, собранные методом афереза, могут быть промыты, чтобы удалить фракцию плазмы и поместить клетки в подходящий буфер или среду для последующих этапов обработки. Клетки могут быть промыты физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) или же раствором для промывки в котором отсутствует кальций, и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все двухвалентные катионы. Первоначальные этапы активации в отсутствие кальция могут привести к усилению активации. Специалисту средней квалификации в данной области будет понятно, что этап промывки может быть произведен с помощью способов, известных из области техники, таких как с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывки клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащем Ca^{2+} , Mg^{2+} , в PlasmaLyte A или других солевых растворах с буфером или без буфера. В качестве альтернативы нежелательные компоненты аферезного образца могут быть удалены, и клетки непосредственно ресуспендированы в культуральной среде.

[00183] В другом варианте осуществления Т-клетки могут быть выделены из лимфоцитов периферической крови за счет лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, с помощью центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или противоточного элютриационного центрифугирования. Специфическая субпопуляция Т-клеток, таких как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45+ и CD45RO+T-

клеток, может быть далее выделена с помощью методик положительного или отрицательного отбора. В протоколе положительного отбора клетки-мишени являются желаемыми клетками. Например, в одном варианте осуществления Т-клетки могут быть выделены посредством инкубации с микрогранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (т. е. 3×28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, для положительного отбора желаемых Т-клеток.

[00184] В протоколе отрицательного отбора желаемые Т-клетки остаются в образце после удаления нежелательных Т-клеток, т. е., клеток, отобранных методом отрицательного отбора. Например, обогащение популяции Т-клеток за счет отрицательного отбора может быть произведено с помощью комбинации антител к поверхностным маркерам, уникальным по отношению к клеткам, полученным методом отрицательного отбора. Один способ может быть сортировкой клеток и/или отбором при помощи отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в котором используется «коктейль» моноклональных антител к маркерам клеточной поверхности, которые присутствуют на клетках, полученных методом отрицательного отбора. Например, для обогащения CD4⁺ клетками за счет отрицательного отбора коктейль из моноклональных антител обычно может содержать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В конкретных вариантах осуществления желательным может быть обогащение или положительный отбор регуляторных Т-клеток, которые обычно могут экспрессировать CD4⁺, CD25⁺, CD62L1, GITR⁺ и FoxP3⁺. В качестве альтернативы в конкретных вариантах осуществления регуляторные Т-клетки могут быть подвергнуты истощению с помощью микрогранул, конъюгированных с антителами к CD25, или другими похожими методами отбора.

[00185] В другом аспекте Т-клетки могут быть получены из опухоле-инфильтрующих лимфоцитов (TIL). Одна из стратегий АКТ охватывает трансплантацию аутологичных TIL, экспансированных *ex vivo*, полученных из фрагментов опухоли или извлеченных ферментативным расщеплением отдельных клеток метастатической ткани опухоли. Т-клеточные инфильтраты в опухолях являются поликлональными по своей природе и совместно распознают множество опухолевых антигенов. См., например, работу Rosenberg и соавт., *N.*

Engl. J. Med. (1988) 319:1676-1680, содержание которой в полном объеме включено в данный документ путем ссылки.

[00186] В примере протокола АКТ на основе TIL опухоли удаляют у пациентов резекцией и разрезают на небольшие (например, 3–5 мм²) фрагменты в стерильных условиях. Такие фрагменты могут быть помещены на планшеты для культивирования или во флаконы с питательной средой и обработаны высокой дозой ИЛ-2. Эта начальная фаза экспансии TIL (также известная под названием фаза «Пред-REP») обычно продолжается от примерно 3 до примерно 5 недель, во время которой может быть получено примерно 5×10^7 или более TIL. Полученные в результате клетки TIL могут быть затем подвергнуты дальнейшей экспансии (например, по протоколу быстрой экспансии (REP)) для получения клеток TIL, пригодных для инфузии субъекту. Клетки TIL стадии «пред-REP» могут быть подвергнуты криоконсервации для более поздней экспансии, или они могут быть подвергнуты экспансии сразу. Клетки TIL стадии «пред-REP» перед экспансией могут быть также подвергнуты скринингу для идентификации культур с высокой противоопухолевой реактивностью. В типичный протокол REP может входить активация TIL с использованием стимулирующего Т-клетки антитела, например, моноклонального антитела к CD3, в присутствии облученных питающих клеток МКПК. Питающие клетки могут быть получены у пациента или здоровых доноров. Для стимуляции быстрого деления клеток TIL в культуру REP может быть добавлен ИЛ-2 в концентрациях, составляющих примерно 6 000 Ед./мл. Экспансия клеток TIL таким способом может занять примерно 2 недели или более, и в результате приводит к пулу объемом 10–150 миллиардов клеток TIL. Экспансированные клетки можно промывать и объединять, и они могут быть пригодны для инфузии пациенту. Обычно пациенты могут получать 1 или 2 инфузии (с интервалом в 1–2 недели), содержащие $10^9 \sim 10^{11}$ клеток. Пациенты проходили терапию на основе введения высоких доз ИЛ-2 (например, $7,2 \times 10^5$ МЕ/кг каждые 8 часов в течение примерно от 2 до примерно 3 дней), чтобы помочь поддержать клетки TIL после инфузии. См., например, работу Rosenberg и соавт., *Nat. Rev. Cancer* (2008) 8:299-308, содержание которой в полном объеме включено в данный документ путем ссылки. Перед инфузией – в необязательном порядке – у пациента может быть произведено истощение лимфоцитов при использовании циклофосфида (Cy) и флударабина (Flu). См., например, работу Dudley и

соавт., *Science* (2003) 298:850-854, содержание которой в полном объеме включено в данный документ путем ссылки. Кроме того, чтобы предотвратить повторное появление эндогенных регуляторных Т-клеток (Treg), используется облучение всего тела (TBI) совместно с истощением лимфоцитов, см., например, Dudley и соавт., *J. Clin. Oncol.* (2008) 26(32):5233-5239, содержание которой в полном объеме включено в данный документ путем ссылки.

[00187] Фенотип Т-клеток

[00188] Во время активации Т-клеток ТКР взаимодействует с антигенами, презентированными в комплексе с МНС антигенпрезентирующей клетки. Распознавание комплекса антиген-МНС с помощью ТКР ведет к стимуляции Т-клетки, что, в свою очередь, ведет к дифференциации как Т-хелперных клеток (CD4+), так и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) в лимфоциты памяти и эффекторы. Затем эти клетки могут подвергаться клональной экспансии, приводя к получению активированной субпопуляции внутри всей популяции Т-клеток, которая способна реагировать с одним конкретным антигеном.

[00189] Т-клетки могут быть наивными (не подвергавшимися воздействию антигена; повышенный уровень экспрессии CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA, и пониженный уровень экспрессии CD45RO в сравнении с T_{см}), Т-клетками памяти (T_м) (имевшими контакт с антигеном и существующими длительный период), и эффекторными клетками (T_е) (имевшими контакт с антигеном, цитотоксическими). Далее T_м-клетки могут подразделяться на субпопуляции Т-клеток центральной памяти (T_{см}, имеющих повышенный уровень экспрессии CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO и CD95 и пониженный уровень экспрессии CD54RA в сравнении с наивными Т-клетками), и эффекторных Т-клеток памяти (T_{ем}, имеющих пониженный уровень экспрессии CD62L, CCR7, CD28, CD45RA, и повышенный уровень экспрессии CD127 в сравнении с наивными Т-клетками или T_{см}). В конкретных вариантах осуществления Т-клетки центральной памяти являются CD4+, CD44Hi и CD62LHi Т-клетками или CD8+, CD44Hi и CD62LHi Т-клетками. В еще других вариантах осуществления Т-клетки включают стволовые Т-клетки памяти (T_{мс}), которые имеют следующий фенотип: CD44Lo CD45RAHi CD62LHi CD95Hi CD122Hi sca-1+, и способны образовывать субпопуляции T_{см} и T_{ем}, сохраняя свои характеристики. Эффекторные Т-клетки (T_е) относятся к CD8+ контактировавшим с антигеном цитотоксическим Т-

лимфоцитам, имеющим пониженный уровень экспрессии CD62L, CCR7, CD28, и они являются положительными по отношению к гранзиму и перфोरину в сравнении с T_{см}. Хелперные Т-клетки (T_н) – CD4+ клетки, которые влияют на активность других иммунных клеток за счет высвобождения цитокинов. CD4+ Т-клетки могут активировать и подавлять адаптивный иммунный ответ, и какое из воздействий будет индуцироваться, зависит от присутствия других клеток и сигналов. Т-клетки также включают γδ Т-клетки, MAIT Т-клетки и клетки Treg. Т-клетки могут быть собраны в соответствии с известными методиками, и различные субпопуляции или их комбинации могут быть обогащены или истощены с помощью известных методик, таких как аффинное связывание с антителами, методика проточной цитометрии или иммуномагнитной сепарации. Например, в конкретных вариантах осуществления, CD8+ или CD4+ Т-клетки могут быть отсортированы на CD62L^{Hi} (наивные и Т-клетки центральной памяти) или CD62L^{Lo} Т-клетки (эффекторные клетки памяти или эффекторные Т-клетки).

[00190] CD8+ Т-клетки или цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), как считается, играют незаменимую роль в уничтожении опухолевых клеток. Данные клетки обычно способны индуцировать апоптоз в раковых клетках, когда раковая клетка экспонирует некоторое количество антигена на своей поверхности, который предварительно презентировался в комплексе с МНС антигенпрезентирующей клеткой. В обычном случае после воздействия на клетки-мишени ЦТЛ могут подвергнуться апоптозу, когда угроза опасности для клеток устранена, при этом сохраняется одна субпопуляция лимфоцитов, которая впоследствии будет дифференцироваться в Т-клетки памяти, чтобы персистировать в случае если организм снова будет находиться под воздействием этого антигена. Пул лимфоцитов памяти может быть высоко гетерогенным. Было идентифицировано два вида Т-клеток памяти: эффекторные Т-клетки памяти (CD45RA-CCR7-, CD62L-) и Т-клетки центральной памяти, которые являются CD45RA-отрицательными клетками, характеризующимися экспрессией CCR7 и CD62L, двух молекул, которые требуются для хоминга в зонах Т-клеток вторичных лимфоидных органов. При стимуляции антигенами Т-клетки центральной памяти вырабатывают низкие уровни эффекторных цитокинов, таких как ИЛ-4 и IFN-γ, но высокие уровни ИЛ-2, который в состоянии поддерживать их быструю и устойчивую пролиферацию. При столкновении с антигеном Т-клетки центральной памяти

подвергаются: 1) пролиферации, приводящей к саморегенерационному процессу, направленному на увеличение их пула, и 2) дифференциации, приводящей к выработке эффекторных Т-клеток памяти, которые характеризуются низким пролиферативным потенциалом, однако способны мигрировать к воспаленным нелимфоидным тканям и опосредовать эффекторную фазу иммунного ответа.

[00191] *Выделение CD8+ Т-клеток*

[00192] В целях выделения интересующей популяции клеток посредством положительного или отрицательного отбора концентрация клеток и поверхности (например, частицы, такие как микрогранулы) могут быть разными. В конкретных вариантах осуществления желательным может быть существенное уменьшение объема, в котором микрогранулы и клетки могут быть смешаны друг с другом (т. е. увеличение концентрации клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и микрогранул. Например, в одном варианте осуществления может быть использована концентрация 2 миллиарда клеток/мл. В другом варианте осуществления может быть использована концентрация 1 миллиард клеток/мл. В другом варианте осуществления могут быть использованы более чем 100 миллионов клеток/мл. В другом варианте осуществления может быть использована концентрация клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном другом варианте осуществления может быть использована концентрация клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В других вариантах осуществления могут быть использованы концентрации клеток 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может привести к повышению уровня выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток. Более того, использование высоких концентраций клеток может позволить более эффективно уловить клетки, которые, возможно, слабо экспрессируют исследуемые антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из проб, в которых присутствует много опухолевых клеток (т. е. кровь при лейкозе, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую значимость и они могли бы быть желательными для получения. Например, использование высокой концентрации клеток может позволить осуществить более эффективный отбор CD8+ Т-клеток, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28. В соотносимом варианте осуществления желательным может быть желательным использование более

низких концентраций клеток. При существенном разведении смеси Т-клеток и поверхности (например, при использовании частиц, таких как микрогранулы) взаимодействие между частицами и клетками может быть сведено к минимуму. Это может привести к отбору клеток, которые экспрессируют большие количества интересующих антигенов для связывания с частицами.

[00193] Варианты осуществления настоящего описания могут включать использование Т-клеток, положительно отобранных по признаку CD8+, выделенных из свежего продукта лейкофереза или свежих МКПК. В одном варианте осуществления популяция клеток может быть обогащена CD8+ Т-клетками. Культура Т-клеток может быть истощена по CD4+ клеткам и обогащена CD8+ клетками при использовании, например, разделения микрогранулами CD8 (например, с помощью системы микрогранул Clini-MACSPplus CD8 (Miltenyi Biotec™). Обогащение CD8+ Т-клетками может улучшить исход АКТ за счет удаления CD4+ регуляторных Т-клеток.

[00194] *Мультимеры пептид/МНС*

[00195] Мультимеры пептид/МНС, например, тетрамеры пептид/МНС (Tet), могут быть образованы со стрептавидином (SA или Sa). Стрептавидин – это тетрамерный белок из бактерий вида *Streptomyces avidinii*. SA обладает исключительной аффинностью и имеет четыре уникальных сайта связывания, организованных тетраэдрально для его природного лиганда – биотина (K_d^{-10-15} моль/л). Молярный показатель способности к связыванию стрептавида с биотином составляет 4:1, биотин:SA, при этом SA не должен специфически связываться с молекулой связывания (например, за счет взаимодействия с биотином). В одном аспекте стрептавидин, молекулы связывания (например, молекулы МНС) могут быть биотинилированы, чтобы обеспечить возможность тетрамерной сборки пары белок-лиганд SA. В некоторых вариантах осуществления молекулы связывания могут быть также соединены с SA за счет ковалентной связи (такой как амидная связь), и, следовательно, необязательно за счет взаимодействия биотин-SA. Специалист будет в состоянии идентифицировать наиболее подходящий вид связывания на основании выбранного плана эксперимента. В нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения SA может быть использован для сборки мономеров пептид/МНС в тетрамеры. Например, цепи МНС могут быть биотинилированы с

помощью фермента BirA и подвергнуты рефолдингу с антигенным пептидом, например, исследуемым ТАА. Биотин является малым белком, который образует сильную связь со стрептавидином. Стрептавидин, меченный флуорофором, может быть добавлен к полученным методами биоинженерии мономерам МНС, и взаимодействия биотина и стрептавидаина приводят к тому, что четыре мономера МНС связываются со стрептавидином и образуют тетрамер. Когда тетрамеры пептид/МНС смешаны с образцом, например, CD8+ Т-клетками, они будут связываться с CD8+ Т-клетками, экспрессирующими подходящий антиген-специфический рецептор, например, ТАА-специфический ТКР, который связывается с комплексом ТАА/МНС. Любые тетрамеры МНС, которые не связаны, вымываются из образца до его анализа методом проточной цитометрии.

[00196] *Анализ методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS)*

[00197] С помощью FACS живых клеток популяцию клеток разделяют на субпопуляции на основании флуоресцентных меток. При сортировке охватываются более сложные механизмы проточной цитометрии, чем при анализе без сортировки. Клетки, окрашенные с помощью меченных флуорофором тетрамеров пептид/МНС и/или конъюгированных с флуорофором антител могут быть отделены друг от друга в зависимости того, каким флуорофором они были окрашены. Например, клетка, экспрессирующая один клеточный маркер, может быть обнаружена с помощью конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) антитела, которое распознает маркер, а другой вид клеток, экспрессирующий другой маркер, мог бы быть обнаружен при помощи антитела, конъюгированного с фикоэритрином (PE), специфического для данного маркера.

[00198] Данные, полученные с помощью FACS, могут быть нанесены на график в одном измерении с получением гистограммы, или представлены в виде точечных диаграмм в двух измерениях, или даже в трех измерениях. Области на данных графиках могут быть последовательно разделены на основании интенсивности флуоресценции с созданием серий выделений субпопуляций, называемых «гейтами». Конкретные виды протоколов гейтирования могут существовать для диагностических и клинических целей, в особенности в связи с гематологией. Например, гейтирование одиночных клеток может позволить отличить отдельные одиночные клетки от дублетов или более высоких агрегатов по их «времени

пролета» (называемом также «шириной импульса») через узко сфокусированный лазерный луч. Гейтирование по каналам сброса (отрицательной селекции) может быть использовано для снижения количества клеток, которые не интересны для анализа. Графики могут быть нанесены в логарифмических координатах. Вследствие того, что происходит перекрывание спектров излучения различных флуоресцентных красителей, сигналы на детекторах необходимо компенсировать электронными и компьютерными средствами. Накопленные данные с проточного цитометра могут быть проанализированы с помощью программного обеспечения. Когда данные собраны, необязательно поддерживать связь с проточным цитометром, и анализ может быть произведен на отдельном компьютере.

[00199] *Способы лечения*

[00200] В одном аспекте адоптивный перенос клеток или терапия (АКТ) может включать метод лечения, в котором производят взятие клеток у донора, культивируют их и/или манипулируют ими *in vitro*, и вводят их пациенту для лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления перенесенные клетки могут быть аутологичными клетками, что означает, что пациент(ка) выступает сам или сама в роли собственного донора. В некоторых вариантах осуществления перенесенные клетки могут быть лимфоцитами, например, Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления перенесенные клетки могут быть генетически модифицированы до введения пациенту. Например, перенесенные клетки могут быть сконструированы для экспрессии Т-клеточного рецептора (ТКР), обладающего специфичностью к интересующему антигену. В одном варианте осуществления перенесенные клетки могут быть сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В конкретных вариантах осуществления перенесенные клетки могут быть сконструированы (например, за счет трансфекции или конъюгации) для экспрессии молекулы, которая усиливает противоопухолевую активность клеток, такой как цитокин (ИЛ-2, ИЛ-12), антиапоптотической молекулы (BCL-2, BCL-X) или хемокина (CXCR2, CCR4, CCR2B). В конкретных вариантах осуществления перенесенные клетки могут быть сконструированы для экспрессии как CAR, так и молекулы, которая усиливает противоопухолевую активность или персистенцию клеток.

[00201] В одном аспекте экспансированные сконструированные Т-клетки, описываемые в настоящем документе, полезны для лечения нарушения,

ассоциирующегося с аномальным апоптозом или процессом дифференциации (например, нарушения пролиферации клеток или нарушения дифференциации клеток, такие как рак). Не ограничивающие примеры раковых заболеваний, которые могут подлежать лечению способами настоящего изобретения, описаны далее ниже.

[00202] Примеры нарушений пролиферации и/или дифференциации клеток включают рак (например, карциному, саркому, метастатические заболевания или неопластические заболевания кроветворной системы, например, лейкозы). Метастатическая опухоль может образоваться из различных видов первичной опухоли, в том числе, но не ограничиваясь ими, предстательной железы, толстой кишки, легких, молочной железы и печени. Соответственно, композиции настоящего раскрытия (например, в минимальной степени экспансированные *ex vivo* сконструированные Т-клетки) могут быть введены пациенту, который болен раком.

[00203] *Введение аутологичных клеток*

[00204] Аутологичные клетки могут вводиться любым подходящим способом, известным из уровня техники. Предпочтительно клетки могут вводиться при помощи внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая продолжается примерно от 30 до примерно 60 минут. Примеры других способов введения могут включать внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический способ.

[00205] Подобным образом может вводиться любая подходящая доза аутологичных клеток. Например, в одном варианте осуществления могут вводиться от примерно $1,0 \times 10^8$ клеток до примерно $1,0 \times 10^{12}$ клеток. В одном варианте осуществления могут вводиться от примерно $1,0 \times 10^{10}$ клеток до примерно $13,7 \times 10^{10}$ Т-клеток, со средним количеством, составляющим примерно $5,0 \times 10^{10}$ Т-клеток. В качестве альтернативы, в другом варианте осуществления могут вводиться от примерно $1,2 \times 10^{10}$ до примерно $4,3 \times 10^{10}$ клеток.

[00206] В одном варианте осуществления аутологичные клетки, используемые для АКТ, могут быть лимфоцитами, например, Т-клетками. В одном варианте осуществления Т-клетки могут быть «молодыми» Т-клетками, к примеру, в возрасте 19–35 дней, как это описано, например, в патенте США № 8 383 099, включенном сюда в полном объеме путем ссылки. Молодые Т-клетки, как

считается, обладают более длинными теломерами, чем старые Т-клетки, и увеличенная длина теломера в некоторых случаях может быть ассоциирована с улучшенным клиническим исходом после АКТ.

[00207] Инфузия экспансированных Tet⁺ CD8⁺ Т-клеток, полученных с помощью прямой сортировки по настоящему изобретению, субъектам, проходящим лечение по схеме АКТ, может способствовать персистенции перенесенных клеток, стимулировать персистенцию, пролиферацию и выживаемость перенесенных клеток, и/или улучшать регрессию опухоли.

[00208] Варианты осуществления настоящего изобретения могут включать экспансию отсортированных CD8⁺ Т-клеток за счет стимуляции ИЛ-2 или другими цитокинами, которые связывают обычную гамма-цепь, например, ИЛ-1, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-23. В одном аспекте отсортированные CD8⁺ Т-клетки могут быть экспансированы по меньшей мере в одном цикле «протокола быстрой экспансии» (REP), по которому Т-клетки могут быть экспансированы с, например, ИЛ-2 или ИЛ-15, ОКТ-3, и облученными аллогенными моноклеарными клетками периферической крови (МКПК) в качестве питающих клеток, включая А-клетки, экспрессирующие Fc-γI-рецептор (FcγRI). Участок Fc антител к иммуноглобулину подкласса (Ig)G2a мыши, включая антитела к ОКТ-3, связывается с FcγRI на питающих клетках человека. Антитело к CD3, связанное с FcγRI, индуцируют более оптимальный сигнал пролиферации/дифференциации для CD8⁺ Т-клеток, чем антитела к CD3/CD28, иммобилизованные на твердой поверхности. Это может отражать двойное преимущество от перекрестной связи Т-клеточного рецептора (ТКР) и антител к CD3 и костимуляции, обеспечиваемой за счет межклеточного взаимодействия между Т-клетками и FcγRI⁺ А-клетками. В другом аспекте отсортированные CD8⁺ Т-клетки могут быть экспансированы в присутствии антител к CD3 и к CD28, иммобилизованных на гранулах, для одновременной доставки сигнала-1 и костимуляторного сигнала-2, чтобы привести к пролиферации Т-клеток, не вызывая анергию или ранний апоптоз.

[00209] Закрытые системы культивирования клеток

[00210] Прямая сортировка по настоящему изобретению с получением продуктов Т-клеток может осуществляться в комбинации с любой закрытой системой для культивирования клеток. Закрытые системы культивирования клеток, могут

включать имеющиеся в продаже системы, например, CliniMACS Prodigy™ (Miltenyi), биореактор WAVE (Xuri™) (GE Biosciences) в отдельности или в комбинации с BioSafe Sepax™ II, и закрытой системе G-Rex/GatheRex™ (Wilson Wolf) в отдельности или в комбинации с BioSafe Sepax™ II. Закрытая система G-Rex™ представляет собой сосуд для экспансии, а GatheRex™ представляет собой насос для концентрирования и сбора.

[00211] CliniMACS Prodigy™ (Miltenyi)

[00212] CliniMACS Prodigy™ с программным обеспечением для процесса TCT (трансдукции Т-клеток) и набором магистралей TS520 может обеспечить обработку в закрытой системе для обогащения, трансдукции, промывки и экспансии клеток. Например, микрогранулы MACS-CD4 и CD8-MicroBeads могут использоваться для обогащения, гранулы TransACT, например, реагенты CD3/CD28 могут использоваться для активации, лентивирусные векторы, экспрессирующие рекомбинантные ТКР, могут использоваться для трансдукции, среда TechMACS-3%-HS-ИЛ2 — для культивирования и физиологический раствор с фосфатным буфером и этилендиаминтетрауксусной кислотой — для промывки. Эта система может производить примерно $4-5 \times 10^9$ клеток, включать протоколы автоматического производства с максимальным объемом заполнения камеры ~300 мл и проводить отбор и активацию (гранулы TransACT), трансдукцию и экспансию во время процесса длительностью 10–14 дней.

[00213] Биореактор WAVE (Xuri™) (GE Biosciences)

[00214] Биореактор WAVE (Xuri™) обеспечивает культивирование Т-клеток в культуральных мешках, например, в Xuri Cellbag, с перфузией или без нее. Мешок среднего размера для обеспечения клеток питательными веществами может представлять собой 5-литровый Hyclone Labtainer. Мешком для отходов может быть Mbag (приобретенный у GE Healthcare). Эта система может производить примерно $15-30 \times 10^9$ клеток, включать программное обеспечение UNICORN, которое обеспечивает контроль и отслеживание культуры, содержит качающийся лоток, который может вместить от примерно 0,3 литра до примерно 25 литров, и осуществлять функцию перфузии для поддержания объема культуры, при этом обеспечивая обмен газов и введение свежей среды и цитокинов к клеточной культуре.

[00215] Биореактор WAVE (Xuri™) может включать мешки Xuri Bag для экспансии, мешки VueLife от Saint Gobain для размораживания и стадии покоя и мешки VueLife AC для активации. Биореактор WAVE (Xuri™) может использоваться в комбинации с другими технологиями, например, с системой разделения клеток Sepax™ (GE Biosciences) для стадий промывки культуры и уменьшения объема. Устройство для стерильного запаивания (Terumo BCT™), используемое для соединения стерильных мешков для переноса растворов, а термическое устройство для запаивания — для запаивания магистралей.

[00216] В основе системы разделения клеток лежат разделительная камера, которая обеспечивает как разделение посредством вращения шприцевой камеры (центрифугирование), так и перенос компонентов при помощи смещения поршня шприца. Оптический сенсор измеряет поглощение света разделенными компонентами и управляет направлением потока каждого из них в соответствующий контейнер для выходного продукта, например, таким образом могут быть разделены и собраны плазма, лейкоцитарная пленка и эритроциты из образцов крови.

[00217] *Определения*

[00218] Понятие «активация» относится к состоянию Т-клетки, при котором она простимулирована для того, чтобы индуцировать обнаруживаемую пролиферацию клеток. Активация также может быть связана с индуцированной выработкой цитокинов и поддающимися обнаружению эффекторными функциями. Понятие «активированная Т-клетка» относится, помимо прочего, к пролиферирующим Т-клеткам. Сигналы, генерируемые только лишь при помощи ТКР, являются недостаточными для полной активации Т-клетки, и существует также потребность в одном или более вторичных или костимулирующих сигналах. Таким образом, активация Т-клетки включает первичный сигнал стимуляции через комплекс ТКР/CD3 и один или более вторичных костимулирующих сигналов. О костимуляции может свидетельствовать пролиферация и/или выработка цитокинов Т-клетками, которые получили первичный сигнал активации, такой как стимуляция через комплекс ТКР/CD3 или через CD2. Например, для активации популяции Т-клеток могут использоваться антитело к CD3, антитело к CD2 или активатор протеинкиназы С в сочетании с кальциевым ионофором.

[00219] Активацию можно обнаружить по сигнатуре любого фенотипа или генной экспрессии, дифференциально экспрессируемых в сравнении с состоянием покоя. Такие изменения, могут быть индуцированы за счет культивирования с любыми известными митогенами или биоаналогами, которые вызывают рост Т-клеток, стимулируют эффекторную функцию и/или изменение состояния клеточного цикла.

[00220] Для индукции пролиферации популяция активированных Т-клеток может быть приведена в контакт со вторым веществом, что стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности Т-клеток. Например, популяция CD4+ Т-клеток может подвергнуться стимуляции для пролиферации при помощи антитела к CD28, направленного на молекулу CD28 на поверхности Т-клеток. Альтернативно, CD4+ Т-клетки можно стимулировать природным лигандом для CD28, таким как B7-1 и B7-2. Природный лиганд может быть растворимым, или на клеточной мембране, или прикреплен к поверхности твердой фазы.

Пролиферацию популяции CD8+ Т-клеток можно осуществить при помощи использования моноклонального антитела ES5.2D8, которое связывается с CD9, вспомогательной молекулой, имеющей молекулярную массу примерно 27 кДа, которая присутствует на активированных Т-клетках. Альтернативно, пролиферацию популяции активированных Т-клеток можно индуцировать путем стимуляции одного или более внутриклеточных сигналов, возникших в результате лигирования вспомогательной молекулы, например, CD28.

[00221] Средство, обеспечивающее первичный сигнал активации и средство, обеспечивающее костимуляторную молекулу, могут быть добавлены либо в растворимой форме, либо прикрепленными к поверхности твердой фазы. В предпочтительном варианте осуществления оба средства прикреплены к одной и той же поверхности твердой фазы. Культивирование Т-клеток в таком окружении приводит к неселективной активации всех Т-клеток, которые экспрессируют родственные рецепторы.

[00222] После активации и стимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток можно отслеживать динамику пролиферации Т-клеток в ответ на продолжающееся воздействие лиганда или другого средства, которое действует внутриклеточно, стимулируя путь, опосредованный вспомогательной молекулой. Когда скорость пролиферации Т-клеток снижается, возникает

возможность повторно активировать и повторно стимулировать Т-клетки, например, дополнительным антителом к CD3 и костимуляторным лигандом с целью вызвать дальнейшую пролиферацию. В одном варианте осуществления скорость пролиферации Т-клеток можно отслеживать, анализируя размер клеток. Альтернативно, пролиферацию Т-клеток можно отслеживать, анализируя экспрессию молекул на клеточной поверхности в ответ на воздействие лиганда или другого вещества, например, CD28 или CD27. Мониторинг и повторную стимуляцию Т-клеток можно повторять в случае устойчивой пролиферации с целью получения популяции Т-клеток с увеличенным числом клеток от примерно в 100 раз до примерно в 100 000 раз в сравнении с исходной популяцией Т-клеток.

[00223] В одном аспекте активация, описанная в данном контексте, может проводиться в течение периода времени от примерно 1 часа до примерно 120 часов, от примерно 1 часа до примерно 108 часов, от примерно 1 часа до примерно 96 часов, от примерно 1 часа до примерно 84 часов, от примерно 1 часа до примерно 72 часов, от примерно 1 часа до примерно 60 часов, от примерно 1 часа до примерно 48 часов, от примерно 1 часа до примерно 36 часов, от примерно 1 часа до примерно 24 часов, от примерно 2 часов до примерно 24 часов, от примерно 4 часов до примерно 24 часов, от примерно 6 часов до примерно 24 часов, от примерно 8 часов до примерно 24 часов, от примерно 10 часов до примерно 24 часов, от примерно 12 часов до примерно 24 часов, от примерно 12 часов до примерно 72 часов, от примерно 24 часов до примерно 72 часов, от примерно 6 часов до примерно 48 часов, от примерно 24 часов до примерно 48 часов, от примерно 6 часов до примерно 72 часов или от примерно 1 часа до примерно 12 часов.

[00224] Способ согласно данному раскрытию может использоваться для экспансии определенных популяций Т-клеток с целью применения при лечении инфекционных заболеваний или рака. Полученная в результате этого популяция Т-клеток может быть подвергнута генетической трансдукции и использована при иммунотерапии или может использоваться для анализа возбудителей инфекций *in vitro*. После экспансии популяции Т-клеток до достаточного их количества экспансированные Т-клетки можно повторно ввести индивиду. Способ по данному изобретению может также обеспечить возобновляемый источник Т-клеток. Таким образом, Т-клетки от индивида можно подвергнуть процедуре экспансии *ex vivo*,

часть подвергшейся экспансии популяции может быть повторно введена индивиду, а другая часть может быть заморожена в виде аликвот для длительного консервирования и последующей экспансии и введения индивиду. Аналогично, популяцию опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов можно получить от больного раком индивида, а Т-клетки стимулировать для пролиферации до достаточного количества и повторно ввести индивиду.

[00225] В одном аспекте экспансия может проводиться в течение периода времени от примерно 1 дня до 2 дней, от примерно 1 дня до 3 дней, от примерно 1 дня до 4 дней, от примерно 1 дня до 5 дней, от примерно 1 дня до 6 дней, от примерно 1 дня до 7 дней, от примерно 1 дня до 8 дней, от примерно 1 дня до 9 дней, от примерно 1 дня до 10 дней, от примерно 2 дней до 3 дней, от примерно 2 дней до 4 дней, от примерно 2 дней до 5 дней, от примерно 2 дней до 6 дней, от примерно 2 дней до 7 дней, от примерно 2 дней до 8 дней, от примерно 2 дней до 9 дней, от примерно 2 дней до 10 дней, от примерно 3 дней до 4 дней, от примерно 3 дней до 5 дней, от примерно 3 дней до 6 дней, от примерно 3 дней до 7 дней, от примерно 3 дней до 8 дней, от примерно 3 дней до 9 дней, от примерно 3 дней до 10 дней, от примерно 4 дней до 5 дней, от примерно 4 дней до 6 дней, от примерно 4 дней до 7 дней, от примерно 4 дней до 8 дней, от примерно 4 дней до 9 дней, от примерно 4 дней до 10 дней, от примерно 5 дней до 6 дней, от примерно 5 дней до 7 дней, от примерно 5 дней до 8 дней, от примерно 5 дней до 9 дней или от примерно 5 дней до 10 дней.

[00226] Понятие «быстрая экспансия» обозначает рост численности антиген-специфических Т-клеток по меньшей мере примерно в 3 раза (или 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) в течение недели, более предпочтительно, по меньшей мере примерно в 10 раз (или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) в течение недели, или, более предпочтительно, по меньшей мере примерно в 100 раз в течение недели. Например, при культивировании антиген-специфических Т-клеток с облученными (например, 40 Гр) аллогенными моноклеарными «питающими» клетками периферической крови в полной среде (CM) с антителом к CD3 (например, 30 нг/мл) и ИЛ-2 (например, 6000 Ед/мл) может быть использован протокол быстрой экспансии (REP), который был описан ранее (Dudley et al. *J. Immunother.* 26:332-42 (2003) и Riddell и соавт. *J. Immunol. Methods* 128:189-201 (1990), содержание которых в полном объеме включено путем ссылки.

[00227] В контексте настоящего описания понятие «Т-клеточный рецептор (ТКР)» относится к белковому рецептору на Т-клетках, который состоит из гетеродимера альфа- (α) и бета- (β) цепи, хотя в некоторых клетках ТКР состоит из гамма- и дельта- (γ/δ) цепей. В вариантах осуществления данного изобретения ТКР может быть модифицированным на любой клетке, имеющей ТКР, включая хелперную Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку, Т-клетку памяти, регуляторную Т-клетку, природную киллерную Т-клетку и гамма-дельта Т-клетку, к примеру.

[00228] Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» могут включать тимоциты, наивные Т-лимфоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, Т-лимфоциты в стадии покоя или активированные Т-лимфоциты. Иллюстративные популяции Т-клеток, пригодных для использования в конкретных вариантах воплощения, включают, но без ограничения, хелперные Т-клетки (ХТЛ; CD4+ Т-клетку), цитотоксическую Т-клетку (ЦТЛ; CD8+ Т-клетку), CD4+CD8+ Т-клетку, CD4-CD8- Т-клетку или любую другую субпопуляцию Т-клеток. Другими иллюстративными популяциями Т-клеток, подходящими для использования в конкретных вариантах воплощения, включают, но без ограничения, Т-клетки, экспрессирующие один или более из следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197 и HLA-DR, и при необходимости они могут быть далее выделены при помощи методик положительного и отрицательного отбора.

[00229] В одном аспекте «несоответствующий пептид» – это пептид, который не является пептидом-мишенью, и использование которого в процессе сортировки упрощает исключение не специфических к мишени Т-клеток. Несоответствующий пептид может быть определен как пептид, который не представляет интереса, так что комплексы несоответствующий пептид/МНС не приводят к желаемому ответу Т-клеток. Например, термин «несоответствующий пептид» может относиться к пептиду, последовательность которого менее чем на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентична последовательности пептида-мишени, так что комплекс несоответствующий пептид/МНС не связывается с теми же Т-клетками, как в случае комплекса пептид-мишень/МНС. В другом примере несоответствующий пептид может относиться к пептиду, последовательность которого менее чем на 30 %, менее чем на 40 %, менее чем на 50 %, например, менее чем на 30 % идентична последовательности пептида-мишени, так что комплекс несоответствующий пептид/МНС не связывается с теми же Т-клетками,

как в случае комплекса пептид-мишень/МНС. Длина аминокислотной последовательности несоответствующего пептида обычно составляет от 8 до 16 аминокислот. Несоответствующий пептид может кодироваться геном «домашнего хозяйства». Как таковой отбор комплексов ТКР-пептид-мишень при исключении потенциально несоответствующих пептидов, где комплексы несоответствующий пептид/МНС не приводят к желаемому Т-клеточному ответу. Длина пептида, сходного с мишенью, обычно составляет 8–16 аминокислот, предпочтительно 8–11 аминокислот, и он имеет сходство аминокислотной последовательности с пептидом-мишенью, составляющее по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. Обычно пептид, сходный с мишенью, отличается пятью аминокислотами или менее, четырьмя аминокислотами или менее, тремя аминокислотами или менее или одной заменой аминокислоты от аминокислотной последовательности пептида-мишени. Кроме того, предпочтительные Т-клетки, связывающиеся с комплексом пептид-мишень/МНС, не связываются с комплексом сходный с мишенью пептид/МНС и, в первую очередь, или исключительно связываются с комплексом пептид-мишень/МНС. Это связано с тем фактом, что Т-клетки, которые связываются с обоими, с комплексом пептид-мишень/МНС и комплексом сходный с мишенью пептид/МНС, будут демонстрировать не желаемый Т-клеточный ответ, т. е. могут приводить к побочным реакциям, таким как «целевые, внеопухолевые» побочные эффекты, перекрестному взаимодействию с пептидами, сходными с мишенью на здоровых тканях и т. д. (Lowdell *et al.*, *Cytotherapy*, 2018; 00: 1-17).

[00230] Мононуклеарная клетка периферической крови (МКПК) относится к любой клетке крови с круглым ядром (т. е. лимфоциту, моноциту или макрофагу). Эти клетки крови являются ключевым компонентом иммунной системы в борьбе с инфекцией и адаптации к чужеродным агентам. Популяция лимфоцитов состоит из CD4+ и CD8+ Т-клеток, В-клеток и природных киллерных клеток (NK), CD14+ моноцитов и базофильных/нейтрофильных/эозинофильных/дендритных клеток. Эти клетки часто выделяют из цельной крови или из продуктов лейкофереза (leukorack) при помощи FICOLL™, гидрофильного полисахарида, который разделяет кровь на слои, причем моноциты и лимфоциты образуют лейкоцитарную пленку под слоем плазмы. В одном варианте осуществления

МКПК обозначают популяцию клеток, содержащую по меньшей мере Т-клетки и необязательно Nk-клетки и антигенпрезентирующие клетки.

[00231] Методика сортировки клеток, используемая в данном описании, может быть осуществлена с помощью способа или оборудования, обычно используемого в уровне техники, без какого-либо ограничения изобретения. Любые методики, способы и оборудование для сортировки клеток могут быть использованы в данном изобретении, если в этих методиках, способах и оборудовании для сортировки клеток применяются поверхностные маркеры. Например, можно использовать метод магнитной сортировки или проточной цитометрии. Экспериментальные процессы методик сортировки клеток, таких как методика магнитного разделения или проточная цитометрия, встречаются в различных источниках научной литературы, или их можно осуществить в соответствии с инструкциями или рекомендуемыми протоколами, предоставленными производителем оборудования или прибора. Опытный специалист данной области будет иметь возможность получить описания этих конкретных экспериментальных процессов или протоколы.

[00232] Понятие «прямая сортировка», используемое в настоящем контексте, относится к любой деятельности по сортировке, которая не основана на клональном культивировании (т. е. культивировании, при котором исходные клетки разделены на несколько суб-культур) Т-клеток до сортировки. Например, прямая сортировка Т-клеток, например, выделенные CD8⁺ Т-клетки из неклонально культивированных Т-клеток могут быть отсортированы с помощью мультимеров пептид/МНС, меченных флуорофором, например, тетрамеров или других антител, меченных флуорофором, связывающихся с молекулами поверхности Т-клеток, включая CD45, CD197, CD28, CD27, рецептор ИЛ-7 (IL-7R α), CD57, CD95, CD127 и CD62L. Т-клетки, полученные таким образом с помощью метода прямой сортировки, могут содержать, в первую очередь, антиген-специфические Т-клетки-предшественники с низкой частотой встречаемости.

[00233] В контексте настоящего описания понятия «рак» (или «раковый»), «гиперпролиферативный» и «неопластический» могут быть использованы для обозначения клеток, обладающих потенциалом для автономного роста (т. е. аномальное состояние или условия, характеризующиеся быстрым ростом пролиферирующих клеток). Состояния гиперпролиферативного или

неопластического заболевания может быть отнесено к категории патологического (т. е. характеризующим или представляющим собой болезненное состояние), или они могут быть отнесены к категории непатологических (т. е. как отклонение от нормального, но не быть ассоциированными с болезненным состоянием). Имеется в виду, что эти термины включают все виды раковых образований или онкогенных процессов, метастатические ткани и злокачественно трансформированные клетки, ткани или органы вне зависимости от гистопатологического типа или стадии или инвазивности. «Патологические гиперпролиферативные» клетки могут появиться при болезненных состояниях, характеризующихся ростом злокачественных опухолевых образований. Примеры непатологических гиперпролиферативных клеток могут включать пролиферацию клеток, ассоциированных с заживлением ран.

[00234] Понятие «рак» или «неоплазма» может быть использовано для обозначения злокачественных образований различных систем органов, включая те, которые поражают легкие, молочную железу, щитовидную железу, лимфатические железы и лимфоидную ткань, желудочно-кишечные органы и мочеполовой тракт, а также аденокарциномы, которые, как считается, в общем включают злокачественные заболевания, например, большинство раковых заболеваний толстой кишки, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы и/или опухоли яичек, мелкоклеточную карциному легких, рак тонкой кишки и рак пищевода. В отношении способов согласно изобретению раковое заболевание может быть любым раковым заболеванием, включая острый лимфоцитарный рак, острый миелолейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак анального отверстия, анального канала или аноректальной области, рак глаза, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак шейки матки, глиому, ходжкинскую лимфому, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого, злокачественную мезотелиому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому, рак яичника, брюшины, сальника и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечный рак, рак кожи, рак мягких тканей, рак яичек, рак щитовидной железы, рак

мочеточника, рак мочевого пузыря и рак пищеварительного тракта, такой как, например, рак пищевода, желудочный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак тонкой кишки, гастроинтестинальная карциноидная опухоль, рак полости рта, рак толстой кишки и рак печени и желчевыводящих путей.

[00235] Понятие «карцинома» относится к злокачественным образованиям эпителиальных или эндокринных тканей, включая карциномы дыхательных путей, карциномы гастроинтестинальной системы, карциномы мочеполовой системы, карциномы яичек, карциномы молочной железы, карциномы предстательной железы, карциномы эндокринной системы и меланомы. Типичные виды карцином включают те, что образуются из ткани шейки матки, легких, предстательной железы, молочной железы, головы и шеи, толстой кишки и яичника. Понятие также может включать карциносаркомы, которые включают злокачественные опухоли, образованные карциноматозными и саркоматозными тканями. «Аденокарцинома» относится к карциноме, возникшей из ткани железы или в которой опухолевые клетки образуют распознаваемые железистые структуры.

[00236] Дополнительные примеры пролиферативных нарушений могут включать неопластические заболевания кроветворной системы. В контексте настоящего описания понятие «неопластические заболевания кроветворной системы» могут включать заболевания, в которых участвуют гиперпластические/неопластические клетки гематопозитического происхождения, образующиеся, например, из клеток миелоидного, лимфоидного или эритроидного ряда, или их клетки-предшественники. Предпочтительно, заболевания могут возникнуть из плохо дифференцированного острого лейкоза (например, эритробластного лейкоза и острого мегакариобластного лейкоза). Дополнительные типичные миелоидные нарушения могут включать, но без ограничения, острый промиелоидный лейкоз (ОПМЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ) (обзор дан в работе Vaickus, L. (1991) *Crit. Rev. in Oncol./Hematol.* 11:267-97); лимфоидные злокачественные заболевания включают, но без ограничения, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), который включает В-клеточный ОЛЛ и Т-клеточный ОЛЛ, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), пролимфоцитарный лейкоз (ПЛЛ), волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) и макроглобулинемию Вальденстрема (МВ). Дополнительные формы злокачественных лимфом могут включать, но без ограничения, неходжкинскую лимфому и ее варианты, лимфомы

периферических Т-клеток, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых (ТКЛЛВ), Т-клеточную лимфому кожи (ТКЛК), лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (ЛБГЛ), болезнь Ходжкина и болезнь Рид-Штернберга.

[00237] Специалистам данной области следует понимать, что количества размноженных сконструированных Т-клеток, достаточные для уменьшения роста и размера опухоли, или терапевтически эффективное количество, могут варьироваться не только в зависимости от конкретно выбранных композиций, но и от способа введения, природы состояния, подвергающегося лечению, и возраста и состояния пациента, и будут устанавливаться, в конечном итоге, по усмотрению лечащего врача или фармацевта пациента. Продолжительность времени, в течение которого могут вводиться в минимальной степени размноженные сконструированные Т-клетки, использованные в настоящих способах, может варьироваться в каждом отдельном случае. Специалистам данной области следует понимать, что ссылка на лечение в настоящем контексте распространяется на профилактику, а также лечение указанных раковых заболеваний и симптомов.

ПРИМЕРЫ

[00238] ПРИМЕР 1:

[00239] *Сравнение процесса прямой сортировки и обычного процесса*

[00240] На ФИГ. 1 показано, что при использовании обычного процесса получение Т-клеточного продукта может занять примерно 52 дня, начиная с выделения МКПК, за чем следует одна неделя получения дендритных клеток (ДК), два цикла стимуляций (Стим 1 и Стим 2), каждый в течение одной недели, сортировка и два цикла протокола быстрой экспансии (REP), т. е., REP1 и REP2, по две недели каждый. Напротив, при использовании способа прямой сортировки это занимает примерно 30 дней или менее, начиная с выделения CD8⁺ Т-клеток, за чем следует сортировка и два цикла экспансии (REP1 и REP2), по две недели каждый. Таким образом, прямая сортировка может сэкономить примерно 3 недели времени при производстве Т-клеток по сравнению с обычным процессом.

[00241] ПРИМЕР 2:

[00242] Прямая сортировка с усовершенствованной стратегией
гейтирования

[00243] Прямая сортировка MLA

[00244] Отбор CD8+ Т-клеток

[00245] CD8+ Т-клетки были выделены из свежего материала LeukoPak, полученного у Донора 2 (StemExpress®). На ФИГ. 2А–2D показана чистота CD8+ Т-клеток, использованных для прямой сортировки по MLA для Донора 2. На ФИГ. 2А показано наличие 97,3 % лимфоцитов в выделенных CD8+ Т-клетках. На ФИГ. 2В показано, что 94,1 % ($8,5 \times 10^8$ клеток) лимфоцитов были положительными по CD8, т. е., чистота составляет примерно 94 %. В CD8-отрицательных фракциях, как показано на ФИГ. 2С, представлено 83,9 % лимфоцитов. На ФИГ. 2D, показано, что 0,27 % лимфоцитов были положительными по CD8.

[00246] Сортировка № 1

[00247] Выделенные CD8+ Т-клетки культивировали в присутствии ИЛ-7 в течение ночи, за чем следовала прямая сортировка. Сброс-отрицательные, т. е., CD8+ Т-клетки, которые, как было обнаружено, являются отрицательными для тетрамера с несоответствующим пептидом, CD56, CD19 и CD14, были отсортированы, чтобы удалить MLA Tet (тетрамеры с пептидом MLA)-отрицательные или CD45-отрицательные CD8+ Т-клетки. На ФИГ. 3 показано, что после сортировки № 1 было получено 399 516 MLA Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (средняя секция) по сравнению со внесенными клетками (левая секция) и отрицательным контролем (правая секция).

[00248] Таблица 2 Результаты сортировки № 1

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
27,4 %	66,7 %	66,6 %	49,1 %	21,0 %

Теоретическая чистота составляет 25,6 %

Концентрация вносимых клеток = $31,8 \times 10^6$ клеток/мл и 0,21% мишеней

SA Δ = обоснованное прогностическое значение – фактический результат по определению количества

Как ожидается, обоснованные прогностические значения обладают точностью в связи с высокой фоновой концентрацией клеток и триггерной стратегией.

[00249] Сортировка № 2

[00250] Аналогично сортировке № 1, выделенные CD8+ Т-клетки культивировали в присутствии ИЛ-7 в течение ночи, затем проводили сортировку. Объем сброс-отрицательных, т. е., CD8+ Т-клеток, которые, как было обнаружено, являются отрицательными для тетрамера с несоответствующим пептидом, CD56, CD19 и CD14, уменьшали, чтобы удалить MLA Tet-отрицательные или CD45-отрицательные CD8+ Т-клетки. На ФИГ. 4 показано, что после сортировки с уменьшением объема было получено 462 168 MLA Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (средняя секция) по сравнению со внесенными клетками (левая секция) и отрицательным контролем (правая секция).

[00251] Таблица 3 Результаты сортировки № 2

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
24,2 %	76,2 %	76,2 %	49,5 %	9,2 %

Теоретическая чистота составляет 23,7 %

Концентрация вносимых клеток = примерно 30×10^6 клеток/мл и 0,21% мишеней

[00252] Сортировка № 3

[00253] MLA Tet-положительные и CD45-положительные CD8+ Т-клетки, полученные после Сорт № 1 и Сорт № 2, были объединены для последующей прямой сортировки. На ФИГ. 5 показано, что после сортировки для обеспечения чистоты было получено 662 650 MLA Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (левая секция) по сравнению с отрицательным контролем (правая секция).

[00254] Таблица 4. Результаты после Сорт. № 1–Сорт. № 3

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
96,0 %	-	91,1 %	6,4 %	2,6 %

[00255] Фенотип памяти (после сортировки для обеспечения чистоты до экспансии)

[00256] На ФИГ. 6А показано, что, например, обогащение MLA Tet-положительными CD8+ Т-клетками возросло с 0,34 % в исходном материале до 95,75 % среди клеток после прямой сортировки, и что количество наивных Т-клеток возросло от 41,7 % в исходном материале до 80,2 % среди клеток после прямой сортировки.

[00257] На ФИГ. 6В показано, что, например, обогащение CD27+ CD8+ Т-клетками возросло с 81,1 % в исходном материале до 99,9 % среди клеток после прямой сортировки, CD127+ CD8+ Т-клетками возросло с 11,4 % в исходном материале до 96,4 % среди клеток после прямой сортировки и CD62L+ CD8+ Т-клетками возросло с 53,6 % в исходном материале до 92,8 % среди клеток после прямой сортировки.

[00258] На ФИГ. 7 показано, что MLA Tet-положительные CD8+ Т-клетки после прямой сортировки содержали больше наивных Т, больше Т_{см}, меньше Т_{ем}, и меньше Т_{ефф}, чем MLA Tet-отрицательные CD8+ Т-клетки. Равным образом, на ФИГ. 8 показано, что MLA Tet-положительные CD8+ Т-клетки после прямой сортировки экспрессировали больше маркеров наивных Т-клеток, например, CD27, CD62L и CD127, чем MLA Tet-отрицательные CD8+ Т-клетки.

[00259] *Прямая сортировка по MAGEA1*

[00260] Отбор CD8+ Т-клеток

[00261] CD8+ Т-клетки были выделены из свежего материала LeukoPak, полученного у Донора 3 (StemExpress®). На ФИГ. 9А–9D показана чистота CD8+ Т-клеток, использованных для прямой сортировки по MAGEA1 для Донора 3. На ФИГ. 9А показано наличие 98,8 % лимфоцитов в выделенных CD8+ Т-клетках. На ФИГ. 9В показано, что 99,4 % ($1,1 \times 10^9$ клеток) лимфоцитов были положительными по CD8, т. е., чистота составляет примерно 99 %. В CD8-отрицательных фракциях, как показано на ФИГ. 9С, 91,0% клеток были лимфоцитами и моноцитами, а на ФИГ. 9D показано, что 0,78% их этих клеток были положительными для CD8.

[00262] Сортировка № 1

[00263] Выделенные CD8+ Т-клетки культивировали в присутствии ИЛ-7 в течение ночи, за чем следовала сортировка. Объем сброс-отрицательных, т. е., CD8+ Т-клеток, которые, как было обнаружено, являются отрицательными для тетрамера с несоответствующим пептидом, CD56, CD19 и CD14, уменьшали, чтобы удалить MAGEA1 Tet-отрицательные или CD45-отрицательные CD8+ Т-клетки. На ФИГ. 10 показано, что после сортировки с уменьшением объема было получено 12 144 MAGEA1 Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (средняя секция) по сравнению со внесенными клетками (левая секция) и отрицательным контролем (правая секция).

[00264] Таблица 5. MAGEA1 после сортировки № 1

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
3,1 %	50,0 %	16,9 %	71,7 %	65,3 %

Теоретическая чистота составляет 23,7 %

Концентрация вносимых клеток = $34,0 \times 10^6$ клеток/мл и 0,04% мишеней

SA Δ = обоснованное прогностическое значение – фактический результат по определению количества

Как ожидается, обоснованные прогностические значения обладают точностью в связи с высокой фоновой концентрацией клеток и триггерной стратегией.

[00265] Сортировка № 2

[00266] Аналогично сортировке № 1, выделенные CD8+ Т-клетки культивировали в присутствии ИЛ-7 в течение ночи, затем проводили сортировку. Объем сброс-отрицательных, т. е., CD8+ Т-клеток, которые, как было обнаружено, являются отрицательными для тетрамера с несоответствующим пептидом, CD56, CD19 и CD14, уменьшали, чтобы удалить MAGEA1 Tet-отрицательные или CD45-отрицательные CD8+ Т-клетки. На ФИГ. 11 показано, что после сортировки с уменьшением объема было получено 10 846 MAGEA1 Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (средняя секция) по сравнению со внесенными клетками (левая секция) и отрицательным контролем (правая секция).

[00267] Таблица 6. MAGEA1 после сортировки № 2

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
4,0 %	50,0 %	16,7 %	76,9 %	59,2 %

Теоретическая чистота составляет 23,7 %

Концентрация вносимых клеток = примерно 30×10^6 клеток/мл

[00268] Сортировка № 3

[00269] Выделенные CD8+ Т-клетки культивировали в присутствии ИЛ-7 в течение ночи, за чем следовала прямая сортировка. Без применения гейтирования по каналу сброса производили уменьшение объема CD8+ Т-клеток, чтобы удалить MAGEA1 Tet-отрицательные или CD45-отрицательные CD8+ Т-клетки. На ФИГ. 12 показано, что после сортировки с уменьшением объема было получено 17 646 MAGEA1 Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (средняя секция) по сравнению со внесенными клетками (левая секция) и отрицательным контролем (правая секция).

[00270] Таблица 7. MAGEA1 после сортировки № 3

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
1,5 %*	75,0 %	32,4 %	77,1 %	44,2 %

Теоретическая чистота составляет 23,7 %

* более низкий уровень чистоты может быть связан с отсутствием гейтирования по каналу сброса.

Концентрация вносимых клеток = примерно 30×10^6 клеток/мл

[00271] Сортировка № 4

[00272] Аналогично сортировке № 3, выделенные CD8+ Т-клетки культивировали в присутствии ИЛ-7 в течение ночи, затем проводили сортировку. Без применения гейтирования по каналу сброса производили уменьшение объема CD8+ Т-клеток, чтобы удалить MAGEA1 Tet-отрицательные или CD45-отрицательные CD8+ Т-клетки. На ФИГ. 13 показано, что после сортировки с уменьшением объема было получено 7 064 MAGEA1 Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-

клеток (средняя секция) по сравнению со внесенными клетками (левая секция) и отрицательным контролем (правая секция).

[00273] Таблица 8 MAGEA1 после сортировки № 4

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
1,9 %*	0,0 %	21,4 %	78,3 %	67,1 %

Теоретическая чистота составляет 23,7 %

* более низкий уровень чистоты может быть связан с отсутствием гейтирования по каналу сброса.

[00274] Концентрация вносимых клеток = примерно 20×10^6 клеток/мл

[00275] Сортировка № 5

[00276] MAGEA1 Tet-положительные и CD45-положительные CD8+ Т-клетки, полученные начиная с Сорт. № 1 по Сорт. № 4, были объединены для последующей Сорт. № 5. На ФИГ. 14 показано, что после Сорт. № 5 было получено 33 605 MAGEA1 Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток (левая секция) по сравнению с отрицательным контролем (правая секция).

[00277] Таблица 9 MAGEA1 после прямой сортировки, следовавшей за Сорт. № 1–Сорт. № 4

Чистота	Выход после истощения	Эффективность сортировки	SA Δ для чистоты	SA Δ для эффективности сортировки
86,2 %	-	42,7 %	9,9 %	46,6 %

[00278] 33 605 MAGEA1 Tet-положительных и CD45-положительных CD8+ Т-клеток, полученных после сортировки для обеспечения чистоты, были разделены на два протокола REP, т. е., по 16 802 клеток на планшет для REP1.

[00279] Жизнеспособность клеток и кратность экспансии клеток, отобранных по MLA и MAGEA1

[00280] Для определения жизнеспособности клеток и кратности экспансии прошедших сортировку для обеспечения чистоты CD8+ Т-клеток клетки окрашивали AOPI, т. е., акридиновым оранжевым (АО), который может легко

диффундировать через мембраны клеток и, таким образом окрашивать ДНК живых клеток, и пропидий иодидом (PI), который может проникать только в клетки с нарушенными мембранами и, таким образом, окрашивать мертвые клетки.

[00281] На ФИГ. 15А показаны общее число жизнеспособных Т-клеток (верхняя секция) и кратность экспансии (нижняя секция) среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet и MAGEA1 Tet после REP1.

[00282] На ФИГ. 15В показаны общее число жизнеспособных Т-клеток (верхняя секция) и кратность экспансии (нижняя секция) среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet и MAGEA1 Tet после REP2.

[00283] На ФИГ. 16А показана процентная доля CD3⁺CD8⁺ Т-клеток среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet и MAGEA1, после REP1.

[00284] На ФИГ. 16В показана процентная доля CD3⁺CD8⁺ Т-клеток среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet и MAGEA1, после REP2.

[00285] На ФИГ. 17А показана процентная доля MLA Tet⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet, и процентная доля MAGEA1 Tet⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MAGEA1 Tet, после REP1.

[00286] На ФИГ. 17В показана процентная доля MLA Tet⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet, и процентная доля MAGEA1 Tet⁺ CD8⁺ Т-клеток среди CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MAGEA1 Tet, после REP2.

[00287] На ФИГ. 18А показаны данные проточного цитометрического анализа после REP1 для MLA на ФИГ. 16А и 17А.

[00288] На ФИГ. 18В показаны данные проточного цитометрического анализа после REP2 для MLA на ФИГ. 16В и 17В.

[00289] На ФИГ. 19А показаны данные проточного цитометрического анализа после REP1 для CD8⁺ Т-клеток, отобранных по Ag001-02 Tet.

[00290] На ФИГ. 19В показаны данные проточного цитометрического анализа после REP2 для CD8⁺ Т-клеток, отобранных по Ag001-02 Tet.

[00291] Для определения цитотоксической активности CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MLA Tet, и CD8⁺ Т-клеток, отобранных по MAGEA1 Tet, были проведены анализы количественной оценки гибели клеток T2 при помощи

инкубирования CD8+ Т-клеток, отобранных по MLA Tet, или CD8+ Т-клеток, отобранных по MAGEA1 Tet, с Т2-клетками, нагруженными увеличивающимися концентрациями, например, 0 (контроль), 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг/мл пептида MLA или пептида MAGEA1, соответственно.

[00292] ЦТЛ, отобранные по MLA Tet (ФИГ. 20А), и ЦТЛ, отобранные по MAGEA1 Tet (ФИГ. 20В), уничтожали Т2-клетки, нагруженные пептидом MLA или пептидом MAGEA1 в зависимости от концентрации.

[00293] ПРИМЕР 3:

[00294] *Сравнение условий окрашивания*

[00295] Как известно, после привлечения родственного антигена ТКР активируются и интернализируются. Тетрамеры рМНС были бы не в состоянии окрасить Т-клетки после того, как они были экспонированы родственному антигену. Один из способов усиления интенсивности окрашивания – это ингибирование интернализации ТКР за счет обработки этих клеток ингибиторами протеинкиназы (ИПК), например, дазатинибом, до окрашивания мультимерами пептид/МНС (рМНС) (Lissina et al., *J Immunol Methods* 2009; 340:11–24; содержание которой включено в описание во всей полноте путем ссылки).

[00296] Для сравнения воздействия ИПК и температур на окрашивание мультимерами рМНС моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) здорового донора предварительно обрабатывали 50 нМ дазатиниба (ФИГ. 21А) или не обрабатывали им (ФИГ. 21В), а затем окрашивали двумя тетрамерами (2Dtet) пептида Col6A3-002 (FLLDGSANV (SEQ ID NO: 141)) (Col), конъюгированными со стрептавидином и ФЭ, и пятью различными несоответствующими мечеными АФЦ тетрамерами (пептид 1, пептид 2, пептид 3, пептид 4 и пептид 5) при 37 °С (ФИГ. 21А) или при комнатной температуре (КТ) (ФИГ. 21В) в течение 30 минут. После окрашивания тетрамером образцы докрашивали тетрамер-стабилизирующими антителами к ФЭ и АФЦ при 4 °С, за чем следовало окрашивание антителом PE-Cy7 к CD45 при 4 °С.

[00297] На ФИГ. 21А (секция А1) и 21В (секция В1) показана стратегия фонового гейтирования в образцах, окрашенных без тетрамеров.

[00298] На ФИГ. 21А (секция А2) и 21В (секция В2) показано окрашивание 2Dtet исследуемыми клетками, представленными в Q2. Обработка дазатинибом при

37 °C привела к получению 0,027 % окрашенных Col Tet⁺ Т-клеток, что сравнимо с результатами, полученными из эксперимента без обработки дазатинибом при КТ, т. е., 0,0095 %.

[00299] На ФИГ. 21А (секция А3) и 21В (секция В3) показан квадрант Q2 из ФИГ. 21А (секция А2) и 21В (секция В2) в сравнении с несоответствующими мечеными АФЦ тетрамерами (пептид 1, пептид 2, пептид 3, пептид 4 и пептид 5) с квадрантом Q1, представляющим интересующие клетки. Обработка дазатинибом при 37 °C привела к получению 0,93 % окрашенных Tet⁺ Т-клеток, что сравнимо с результатами, полученными из эксперимента без обработки дазатинибом при КТ, т. е., 3,35 %.

[00300] На ФИГ. 21А (секция А4) и 21В (секция В4) показано расположение клеток квадранта Q1 из ФИГ. 21А (секция А3) и 21В (секция В3), наложенных на ФИГ. 21А (секция А2) и 21В (секция В2). Все клетки были гейтированы из лимфоцитов CD45⁺ в виде одиночных клеток. Конечные частоты встречаемости и чувствительность к окрашиванию показывают, что обработка дазатинибом при 37°C приводила к одним Col Tet⁺ Т-клеткам из 4×10^5 CD45⁺ клеток, что сравнимо с результатом, полученным из эксперимента без обработки дазатинибом при КТ, т. е., одним Col Tet⁺ Т-клеток было получено 3×10^5 CD45⁺ клеток.

[00301] ПРИМЕР 4:

[00302] Оптимизация панели

[00303] Для сравнения воздействия конъюгации мультимеров рМНС с одним (1D) и двойным (2D) флуорофором на окрашивание Т-клеток примерно 5×10^6 клеток/мл полученных по REP1 клеток Col6A3 (α Col6A3 Т-клеток), которые являются Т-клетками, специфически связывающимися с клетками, презентирующими комплекс пептид Col6A3-002/МНС на клеточной поверхности, и, в качестве отрицательного контроля, примерно 5×10^6 клеток/мл α MLA Т-клеток, которые являются Т-клетками, специфически связывающимися с клетками, презентирующими комплекс MLA-пептид/МНС на клеточной поверхности, были окрашены при условиях, показанных в Таблице 10. Все клетки были гейтированы из лимфоцитов CD45⁺ в виде одиночных клеток.

Таблица 10.

Концентрация клеток	5е6/мл, свойства отдельного типа Т-клеток
Тетрамерное окрашивание	КТ, 3 мкг/мл*, АФЦ и/или ФЭ COL6A3, 1' при 1000G предв. центрифугировании
Окрашивание антителом	4 °С, разведение 1:80, Ре-Су7 к CD45

[00304] На ФИГ. 22А (секция А1) показано фоновое окрашивание АФЦ/ФЭ α Col6A3 Т-клеток, окрашенных антителом к CD45 (α CD45). В секции А2 (Q1) показано, что 37,7 % α CD45+ α Col6A3 Т-клеток имели положительное окрашивание по Col6A3-ФЭ. В секции А3 (Q1) показано, что 33,5 % α CD45+ α Col6A3 Т-клеток имели положительное окрашивание по Col6A3-АФЦ. В секции А4 (Q1) показано, что 33,5 % α CD45+ α Col6A3 Т-клеток имели положительное окрашивание как по Col6A3-ФЭ, так и по Col6A3-АФЦ. В качестве отрицательного контроля на ФИГ. 22В показано фоновое окрашивание АФЦ/ФЭ α MLA Т-клеток, окрашенных α CD45 (секция В1), α MLA Т-клеток, окрашенных Col6A3-ФЭ (0,48%) (секция В2, Q1), α MLA Т-клеток, окрашенных Col6A3-АФЦ (1,48%) (секция В3, Q3), и α MLA Т-клеток, окрашенных двумя флуорофорами Col6A3-ФЭ и Col6A3-АФЦ (0,024%) (секция В4, Q2). На ФИГ. 22С показано смешивание окрашенных α MLA Т-клеток отрицательного контроля с окрашенными двумя флуорофорами α Col6A3 Т-клетками в соотношении 10:1, 0,39 % (Q2) α Col6A3 Т-клеток могут быть также обнаружены.

[00305] Для сравнения способности одинарного окрашивания тетрамером и двойного окрашивания тетрамерами (2D Tet) обнаруживать пептид-специфические Т-клетки с низкой частотой встречаемости, окрашенные двумя флуорофорами α MLA Т-клетки смешивали или добавляли в известном количестве к окрашенным двумя флуорофорами (АФЦ/ФЭ) α Col6A3 Т-клеткам в соотношении разведений 3:1, 30:1 и 90:1, затем анализировали проточным методом. Условия окрашивания обобщены в Таблице 11.

Таблица 11.

Концентрация клеток	5е6/мл, титрование смеси Т-клеток (от 3- до 100-кратного)
---------------------	---

Тетрамерное окрашивание	КТ, 3 мкг/мл*, АФЦ и/или ФЭ COL6A3, 1' при 1000G предв. центрифугировании
Окрашивание антителом	4 °С, разведение 1:80, Ре-Су7 к CD45

[00306] На ФИГ. 23А показано с помощью двойного окрашивания Col6A3-ФЭ/АФЦ, что α CD45+ α Col6A3 Т-клетки могут быть обнаружены при соотношении разведений 3:1 (9,51 %) (секция А1, Q2), 30:1 (1,38 %) (секция А2, Q2) и 90:1 (0,66 %, секция А3, Q2). Напротив, на ФИГ. 23В показано с помощью отдельного окрашивания Col6A3-ФЭ, что α CD45+ α Col6A3 Т-клетки могут быть обнаружены при соотношении разведений 3:1 (13,5 %) (секция В1, Q1), 30:1 (2,32 %) (секция В2, Q1) и 90:1 (1,06 %, секция В3, Q1). На ФИГ. 23С показано, что в рамках испытанного диапазона разведений двойное окрашивание тетрамерами может иметь улучшенную линейность ($R^2 = 0,9394$) при обнаружении α Col6A3 Т-клеток в сравнении с одинарным окрашиванием тетрамером ($R^2 = 0,8756$).

[00307] Для дальнейшего сравнения способности одинарного окрашивания тетрамером и двойного окрашивания тетрамерами обнаруживать пептид-специфические Т-клетки с низкой частотой встречаемости, окрашенные вдвойне α MLA Т-клетки смешивали или добавляли в известном количестве к окрашенным вдвойне (АФЦ/ФЭ) α Col6A3 Т-клеткам в соотношении разведений 3:1, 9:1, 27:1, 81:1, 243:1 и 729:1, затем анализировали проточным методом. Условия окрашивания обобщены в Таблице 12.

Таблица 12.

Концентрация клеток	5е6/мл, титрование смеси Т-клеток (от 3- до 100-кратного)
Тетрамерное окрашивание	КТ, 3 мкг/мл*, АФЦ и/или ФЭ COL6A3, 30' при 1000G предв. центрифугировании
Окрашивание антителом	4 °С, разведение 1:80, Ре-Су7 к CD45

[00308] На ФИГ. 24А показано с помощью двойного окрашивания Col6A3-ФЭ/АФЦ, что α CD45+ α Col6A3 Т-клетки могут быть обнаружены при соотношении разведений 3:1 (9,86 %) (секция А1, Q2), 9:1 (3,40 %) (секция А2, Q2), 27:1 (1,92 %)

(секция A3, Q2), 81:1 (0,88 %) (секция A4, Q2), 243:1 (0,31 %) (секция A5, Q2) и 729:1 (0,19 %, секция A6, Q2). Напротив, на ФИГ. 24В показано с помощью одинарного окрашивания Col6A3-ФЭ, что α CD45+ α Col6A3 Т-клетки могут быть обнаружены при соотношении разведений 3:1 (16,5 %) (секция B1, Q1), 9:1 (6,15 %) (секция B2, Q1), 27:1 (2,92 %) (секция B3, Q1), 81:1 (1,39 %) (секция B4, Q1), 243:1 (0,83 %) (секция B5, Q1) и 729:1 (0,96 %, секция B6, Q1). На ФИГ. 24С показано, что в рамках всех испытанных диапазонов разведений двойное окрашивание тетрамерами может иметь улучшенную линейность ($R^2 = 0,7265$) при обнаружении α Col6A3 Т-клеток в сравнении с одинарным окрашиванием тетрамером ($R^2 = 0,7021$). На ФИГ. 24D показано для более низкого диапазона разведений, например, от 64:1 до 1024:1, что двойное окрашивание тетрамерами имеет улучшенную линейность ($R^2 = 0,8758$) при обнаружении α Col6A3 Т-клеток, чем в случае одинарного окрашивания тетрамером ($R^2 = 0,5381$). Данные результаты указывают, что двойное окрашивание тетрамерами может быть лучше, чем одинарное окрашивание тетрамерами при обнаружении пептид-специфических Т-клеток с низкой частотой встречаемости.

[00309] Tungatt и соавт. (*J Immunol* 2015, 194:463-474) и Dolton и соавт. (*Immunology* 2015, 146:11-22) (содержание которых включено во всей полноте путем ссылки) сообщают, что добавление неконъюгированных антител к флуорофору во время окрашивания приводило к существенно улучшенной интенсивности флуоресценции как с тетрамерами и декстрамерами рМНС, так и с реактивами на основе ФЭ, АФЦ или FITC.

[00310] Для определения воздействия неконъюгированных антител к флуорофору на одинарное окрашивание Tet пептид-специфических Т-клеток α CD45+ α Col6A3 Т-клетки окрашивали (i) 1D Tet (АФЦ) $\pm$ первичное антитело к АФЦ или (ii) 1D Tet (ФЭ) Tet $\pm$ первичное антитело к ФЭ. На ФИГ. 25А (секция A1, Q3) показано, что добавление первичного антитела к АФЦ улучшает обнаружение α CD45+ АФЦ-Tet-окрашенных α Col6A3 Т-клеток с 46,3 % без первичного антитела к АФЦ до 63,8 % (секция A2, Q3). На ФИГ. 25В показано, что добавление первичного антитела к ФЭ улучшает обнаружение ФЭ-Tet-окрашенных α CD45+ α Col6A3 Т-клеток с 39,1 % без первичного антитела к АФЦ (секция B1, Q1) до 60,6 % (секция B2, Q1).

[00311] Для определения воздействия неконъюгированных антител к флуорофору на двойное окрашивание тетрамерами пептид-специфических Т-клеток α CD45+ α Col6A3 Т-клетки окрашивали (i) двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ) $\pm$ первичное антитело к АФЦ и первичным антителом к ФЭ или (ii) двойным окрашиванием тетрамерами (BV421+ФЭ) $\pm$ первичное антитело к ФЭ. На ФИГ. 25С (секция С1, Q2) показано, что добавление первичного антитела к АФЦ и первичного антитела к ФЭ улучшает обнаружение α CD45+ двойное окрашивание тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ)-окрашенных α Col6A3 Т-клеток с 12,0 % без первичного антитела к АФЦ и первичного антитела к ФЭ до 39,2 % (секция С2, Q2). На ФИГ. 25D показано, что добавление первичного антитела к ФЭ улучшает обнаружение α CD45+ α Col6A3 Т-клеток, с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными BV421+ФЭ), с 20,8 % без первичного антитела к АФЦ (секция D1, Q6) до 39,5 % (секция D2, Q6). В качестве отрицательного контроля на ФИГ. 25Е показано, что добавление первичного антитела к АФЦ и первичного антитела к ФЭ не обнаруживает α MLA Т-клетки с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными (АФЦ+ФЭ) (секция E1, Q2), ни добавление первичного антитела к ФЭ не обнаруживает α MLA Т-клетки с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными (BV421+ФЭ) (секция E2, Q6). Отрицательный контроль показан на ФИГ. 25С. Данные результаты показывают, что добавление неконъюгированных антител к флуорофору могут улучшить обнаружение пептид-специфических Т-клеток при одинарном и двойном окрашивании тетрамерами пептид-специфических Т-клеток.

[00312] Для сравнения чувствительности обнаружения между двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) и двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ), α Col6A3 Т-клетки с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), были добавлены в известном количестве в α MLA Т-клетки с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), в соотношении разведений 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000 в присутствии первичного антитела к ФЭ (ФИГ. 26, верхние секции). Отрицательный контроль для двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) показан на ФИГ. 25Е (E2). Аналогично, α CD45+ α Col6A3 Т-клетки с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ), были добавлены в известном количестве в α MLA Т-клетки с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ), в соотношении

разведений 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000 в присутствии первичного антитела к АФЦ и первичного антитела к ФЭ (ФИГ. 26, нижние секции). Отрицательный контроль для двойного окрашивания тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ) показан на ФИГ. 25Е (Е1). Данные результаты показывают, при каком соотношении разведений сравнимы обнаружение α Col6A3 Т-клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ) (верхние секции, Q6), и обнаружение α Col6A3 Т-клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) (нижние секции, Q2), позволяя предположить эквивалентную чувствительность двойного окрашивания тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ) и двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Использование двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), тем не менее, может снизить потребность в реактивах, например, использование отдельного неконъюгированного антитела к флуорофору, например, первичного антитела к ФЭ, для двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) в сравнении с двумя неконъюгированными антителами к флуорофору, например, первичного антитела к АФЦ и первичного антитела к ФЭ, для двойного окрашивания тетрамерами (мечеными АФЦ+ФЭ).

[00313] Для испытания способности блокаторов фона, например, молока, обнаруживать неокрашенные Т-клетки в растворы для промывки добавляли 5% молочный буфер, содержащий 0,5 % Tween 20. Например, неокрашенные α Col6A3 Т-клетки, α MLA Т-клетки и МКПК Т-клетки промывали растворами, содержащими 5 % молока и 0,5 % Tween 20, или промывали растворами, содержащими 0,5 % Tween 20 без молока. На ФИГ. 27 показано, что добавление молока в промывочные растворы усиливает аутофлуоресценцию α Col6A3 Т-клеток (нижняя левая секция, Q6) и α MLA Т-клеток (нижняя средняя секция, Q6) по сравнению с теми, которые были без молока в промывочных растворах (верхняя левая секция (Q6) и верхняя средняя секция (Q6), соответственно. Добавление молока в промывочные растворы может усиливать аутофлуоресценцию МКПК Т-клеток (верхние и нижние правые секции).

[00314] Влияние ИПК, тетрамеров с несоответствующим пептидом, температуры на окрашивание

[00315] Для определения того, какие условия окрашивания могут обеспечить самым низким фоном и самым низким уровнем ложноположительных результатов МКПК окрашивали с обработкой ИПК или без нее, например, дазатинибом (DAS),

со смесью с тетрамером и несоответствующим пептидом или без нее при различных температурах окрашивания тетрамерами (Hadrup et al., *Nat. Methods*, 2009, 6:520-526; содержание которой во всей своей полноте включено в настоящий документ путем ссылки). Например, клетки МКПК были окрашены двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) в присутствии или отсутствии смеси с тетрамером несоответствующим пептидом, например, пяти различных несоответствующих пептидов (например, Col6A3-015 (YLMDDFSSL (SEQ ID NO: 16)), MAG-003 (KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 118)), MAGEC2-001 (TLDEKVAEL (SEQ ID NO: 161)), MXRA5-003 (LLWGHPRVALA (SEQ ID NO: 18)) и MAGEA1-003 (KVLEYVIKV (SEQ ID NO: 105)) меченых АФЦ-тетрамеров ± обработка DAS, при 37°C или при комнатной температуре (КТ). Обработку DAS проводили при 37 °C.

[00316] Для этого анализа было получено по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ событий. С обработкой DAS, на ФИГ. 28А, верхняя левая секция, показано окрашивание в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером несоответствующего пептида при КТ, обнаружение 8,04E-3% (Q2) CD45+ Col6A3-специфических Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На верхней правой секции (Q2) показано обнаружение 95,2% Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 4,76 % АФЦ-отрицательных и BV421-положительных клеток могут представлять собой истинные Col6A3-специфические Т-клетки (верхняя правая секция, Q1). При отсутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом, на нижней правой секции (Q2) показано 0 % Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 (7,17E-3 %) нижней левой секции. Таким образом, 100 % клеток среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 в нижней левой секции, скорее всего, являются истинными Col6A3-специфическими Т-клетками (нижняя правая секция, Q1). Данные результаты указывают на то, что добавление смеси с тетрамером и несоответствующим пептидом при окрашивании тетрамером при КТ может

снизить уровень ложноположительных обнаружений пептид-специфических Т-клеток в МКПК, например, со 100 % в отсутствие смеси меченого АФЦ тетрамера с несоответствующим пептидом до 4,76 % в присутствии смеси с АФЦ-тетрамером и несоответствующим пептидом.

[00317] Когда эксперименты, показанные на ФИГ. 28А, проводили при 37 °С, наблюдались сходные результаты. На ФИГ. 28В, верхняя левая секция, показано обнаружение 0,055 % (Q2) CD45+ Col6A3-специфических Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На верхней правой секции (Q2) показано обнаружение 98,2% Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 1,78% АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные Col6A3-специфические Т-клетки (верхняя правая секция, Q1). Напротив, при отсутствии смеси меченого АФЦ тетрамера с несоответствующим пептидом, на нижней правой секции (Q2) показано 0% Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 (0,19 %) нижней левой секции. Таким образом, 100 % клеток среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 в нижней левой секции, скорее всего, являются истинными Col6A3-специфическими Т-клетками (нижняя правая секция, Q1). Данные результаты указывают на то, что добавление смеси с тетрамером и несоответствующим пептидом при окрашивании тетрамера при 37 °С может снизить уровень ложноположительных обнаружений пептид-специфических Т-клеток в МКПК, например, со 100 % в отсутствие смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом до 1,78 % в присутствии смеси с АФЦ-тетрамером и несоответствующим пептидом.

[00318] На ФИГ. 28С показано, что добавление смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом существенно снижает степень обнаружения отрицательных по несоответствующему пептиду и положительных по двойному окрашиванию тетрамерами клеток в МКПК, например, начиная от среднего ($n = 4$) $99,3 \pm 1,14$ % в отсутствие смеси с АФЦ-тетрамером и

несоответствующим пептидом до $3,77 \pm 2,7$ % в присутствии смеси с АФЦ-тетрамером и несоответствующим пептидом. Данные результаты указывают на то, что смесь с тетрамером и несоответствующим пептидом может снизить уровень ложноположительных обнаружений пептид-специфических Т-клеток по двойному окрашиванию тетрамерами.

[00319] На ФИГ. 29 показано, что обработка DAS не может существенно повысить обнаружение фоновых CD45+ положительных по двойному окрашиванию тетрамерами клеток в МКПК ($n = 4$, Т-тест, $p = 0,527373$) по сравнению с результатами без обработки DAS.

[00320] На ФИГ. 30 показано, что двойное окрашивание тетрамерами при 37° С имеет тенденцию к повышению уровня обнаружения фоновых CD45+ положительных по двойному окрашиванию тетрамерами клеток в МКПК ($n = 4$, Т-тест, $p = 0,063954$) по сравнению с окрашиванием при КТ.

[00321] Если окрашивание производили в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом при КТ с обработкой DAS, см. ФИГ. 31А, верхняя левая секция, показано обнаружение $8,04E-3$ % (Q2) CD45+ Col6A3-специфических Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На верхней правой секции (Q2) показано обнаружение 95,2 % Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 4,76% АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные Col6A3-специфические Т-клетки (верхняя правая секция, Q1). Без обработки DAS, на нижней правой секции показаны 92,9 % (Q2) Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 ($5,51E-3\%$) нижней левой секции. Таким образом, 7,14 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 в нижней левой секции, могут представлять истинные Col6A3-специфические Т-клетки (нижняя правая секция, Q1).

[00322] Если окрашивание проводили в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом при 37 °С,, были получены аналогичные результаты. С обработкой DAS, см. ФИГ. 31В, верхняя левая секция, показано обнаружение 0,055% (Q2) CD45+ Col6A3-специфических Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клетки, положительные по несоответствующему пептиду, т. е., клетки, окрашенные двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На верхней правой секции (Q2) показано обнаружение 98,2% Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 1,78 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные Col6A3-специфические Т-клетки (верхняя правая секция, Q1). Без обработки DAS, на нижней правой секции показаны 98,6% (Q2) Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421 клеток, среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 (0,027 %) нижней левой секции.

[00323] Для определения, какие условия окрашивания могут обеспечить более высокий индекс окраски (SI), указывающий на лучшее отделение положительно окрашенных клеток от отрицательно окрашенных клеток, и более низкий уровень ложноположительных результатов, Col6A3 REP1-клетки, которые были подготовлены по протоколу быстрой экспансии (REP), окрашивали ± обрабатывали DAS (при 37°C), ± смесью с тетрамером и несоответствующим пептидом и окрашивали при КТ или 37 °С.

[00324] Индекс окраски (SI) может быть рассчитан по следующей формуле (I): $SI = (\text{средн. ФЭ} + \text{средн. BV421 2Dtet+}) - (\text{средн. ФЭ} + \text{средн. BV421 2Dtet-}) / 2 \times (\text{SD ФЭ} + \text{SD BV421 2Dtet-})$. На ФИГ. 32 показано, что обработка DAS существенно повышает уровень SI по сравнению со случаем без обработки DAS, например, $P = 0,006101$. Напротив, температура окрашивания и смесь с несоответствующим пептидом, возможно, не оказывают существенного влияния на уровень SI, например, КТ в сравнении с 37°C ($P = 0,316695$), и ± смесь тетрамера с несоответствующим пептидом ($P = 0,597223$).

[00325] Если окрашивание проводили с обработкой DAS и в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и с несоответствующим пептидом, см. ФИГ. 33А,

верхняя левая секция, показано обнаружение 55,8 % (Q2) из CD45+ Col6A3 REP1 клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (ФЭ+BV421), если окрашивание проводили при КТ. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На верхней правой секции (Q2) показано обнаружение 21,6 % Т-клеток, положительных для несоответствующего пептида, в дважды положительных клетках BV421/ФЭ, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 78,4 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные Col6A3 REP1-клетки (верхняя правая секция, Q1) (SI = 24,0). Если окрашивание проводили при 37°C, на нижней правой секции (Q2) показано 6,38 % Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 (54,4 %) нижней левой секции. Таким образом, около 93,6 % могут представлять истинные Col6A3 REP1-клетки (нижняя правая секция, Q1) (SI = 19,0). Данные результаты показывают, что окрашивание тетрамером при 37°C с обработкой DAS и в присутствии смеси с тетрамером и несоответствующим пептидом снижает уровень ложноположительных обнаружений Т-клеток, например, с 21,6 % при КТ до 6,38 % при 37°C.

[00326] Если окрашивание проводили без обработки DAS и в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом, см. ФИГ. 33В, верхняя левая секция, показано обнаружение 59,2 % (Q2) из CD45+ Col6A3 REP1 клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) при КТ. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На верхней правой секции показано обнаружение 12,4 % (Q2) Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 87,6 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные Col6A3 REP1-клетки (верхняя правая секция, Q1) (SI = 15,9). Если окрашивание проводили при 37°C, см. ФИГ. 33В, на нижней правой секции (Q2) показано 4,12 % Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, среди дважды положительных по BV421/ФЭ клеток, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 95,9% могут представлять истинные

Col6A3 REP1-клетки (нижняя правая секция, Q1) (SI = 9,49). Данные результаты показывают, что окрашивание тетрамером при 37°C без обработки DAS и в присутствии смеси с тетрамером и несоответствующим пептидом может снизить уровень ложноположительных обнаружений Т-клеток, например, с 12,4 % при КТ до 4,12 % при 37°C.

[00327] Сравнение двух условий окрашивания

[00328] Условие № 1: с обработкой DAS + смесью с тетрамером и несоответствующим пептидом, окрашивание при 37°C

[00329] Следующие образцы № 1 – № 3 были окрашены при условии № 1

[00330] Образец № 1: αCol6A3 Т-клетки

[00331] На ФИГ. 34А, левая секция, показано обнаружение 25,1% (Q2) CD45+ Col6A3 Т-клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421 (SI = 15,6). На правой секции (Q2) показано обнаружение 3,18% Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. Таким образом, около 96,9 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять настоящие Col6A3 Т-клетки (правая секция, Q1).

[00332] Образец № 2: αCol6A3 Т-клетки в известном количестве добавляли в МКПК (1:1 x 10⁵), было получено примерно 2 x 10⁶ CD45+ клеток

[00333] На ФИГ. 34В, секция В2, показано обнаружение 0,035% (Q2) CD45+ αCol6A3 Т-клеток, добавленных в известном количестве в МКПК (1:1 x 10⁵) с двойным окрашиванием тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На ФИГ. 34В, секция В3, показано обнаружение 97,4 % (Q2) нагруженных несоответствующим пептидом Т-клеток, дважды положительных по BV421/АФЦ, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 секции В2. Таким образом, около 2,58 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные αCol6A Т-клетки, добавленные в известном количестве в МКПК (секция В3, Q1). МКПК без

окрашивания (секция В1) служат в качестве отрицательного контроля. Секция В4 показывает наложение Q1 секции В3 на секцию В2. Данные результаты показывают обнаружение 18 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в 2×10^6 CD45+ полученных клеток, т. е., примерно одна α Col6A3 Т-клетка в 1×10^5 CD45+ клеток.

[00334] Образец № 3: только МКПК (5×10^6 клеток), получено примерно 2×10^6 CD45+ клеток

[00335] На ФИГ. 34С, секция С, показано обнаружение 0,027 % (Q2) CD45+ α Col6A3 Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На секции С3 показано обнаружение 99,1 % (Q2) нагруженных несоответствующим пептидом Т-клеток, дважды положительных по BV421/АФЦ для несоответствующего пептида, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 секции С2. Таким образом, около 0,93 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные α Col6A3 Т-клетки в МКПК (секция С3, Q1). МКПК без окрашивания (секция С1) служат в качестве отрицательного контроля. Секция С4 показывает наложение Q1 секции С3 на секцию С2. Результаты показывают обнаружение 5 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по окрашиванию тетрамером, меченым АФЦ, нагруженных несоответствующим пептидом клеток в 2×10^6 CD45+ полученных клеток, т. е., примерно одна α Col6A3 Т-клетка в 4×10^5 CD45+ клеток.

[00336] Условие № 2: без обработки DAS + смесью с тетрамером и несоответствующим пептидом, окрашивание при КТ

[00337] Следующие образцы № 4–№ 6 были окрашены при условии № 2

[00338] Образец № 4: α Col6A3 Т-клетки

[00339] На ФИГ. 35А, левая секция, показано обнаружение 35,5% (Q2) CD45+ α Col6A3 Т-клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами

АФЦ/BV421 (SI = 10,2). На правой секции (Q2) показано обнаружение 2,60 % Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 левой секции. Таким образом, около 97,4% АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные α Col6A3 Т-клетки (правая секция, Q1).

[00340] Образец № 5: α Col6A3 Т-клетки в известном количестве добавляли в МКПК ($1:1 \times 10^5$), было получено примерно 2×10^6 CD45+ клеток

[00341] На ФИГ. 35В, секция В2, показано обнаружение 0,012% (Q2) CD45+ α Col6A3 Т-клеток, добавленных в известном количестве в МКПК, с двойным окрашиванием тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На ФИГ. 35В, секция В3, показано обнаружение 93,7 % (Q2) нагруженных несоответствующим пептидом Т-клеток, дважды положительных по BV421/АФЦ, в дважды положительных по BV421/ФЭ, обнаруженных в Q2 секции В2. Таким образом, около 6,32 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные α Col6A Т-клетки, добавленные в известном количестве в МКПК (секция В3, Q1). МКПК без окрашивания (секция В1) служат в качестве отрицательного контроля. Секция В4 показывает наложение Q1 секции В3 на секцию В2. Результаты показывают обнаружение 12 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по окрашиванию тетрамером, меченым АФЦ, нагруженных несоответствующим пептидом клеток в 2×10^6 CD45+ полученных клеток, т. е., примерно одна α Col6A3 Т-клетка в $1,7 \times 10^5$ CD45+ клеток.

[00342] Образец № 6: только МКПК (5×10^6 клеток), получено примерно 2×10^6 CD45+ клеток

[00343] На ФИГ. 35С, секция С, показано обнаружение $9,54 \times 10^{-3}$ % (Q2) CD45+ Col6A3 Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами, мечеными ФЭ+BV421. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На секции С3 показано обнаружение 96,6 % (Q2) нагруженных несоответствующим пептидом Т-клеток, дважды положительных по

BV421/АФЦ для несоответствующего пептида, в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 секции С2. Таким образом, около 3,35 % АФЦ-отрицательных/BV421-положительных клеток могут представлять истинные α Col6A3 Т-клетки в МКПК (секция С3, Q1). МКПК без окрашивания (секция С1) служат в качестве отрицательного контроля. Секция С4 показывает наложение Q1 секции С3 на секцию С2. Результаты показывают обнаружение 6 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по окрашиванию тетрамером, меченым АФЦ, нагруженных несоответствующим пептидом клеток в 2×10^6 CD45+ полученных клеток, т. е., примерно одна α Col6A3 Т-клетка в $3,3 \times 10^5$ CD45+ клеток.

[00344] Как отмечено выше, на ФИГ. 34А, левая секция, показано обнаружение 25,1 % (Q2) CD45+ α Col6A3 Т-клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) с обработкой DAS и в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом и окрашиванием при 37 °С. На ФИГ. 35А, левая секция, показано обнаружение 35,5 % (Q2) CD45+ α Col6A3 Т-клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) без обработки DAS и в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом и окрашиванием при КТ. Наблюдение более низкого, чем ожидалось, уровня двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) с обработкой DAS (25,1%), чем без обработки DAS (35,5%), изучили, проведя двойное окрашивание тетрамерами в условиях А-Г, как это показано в Таблице 13.

Таблица 13.

Состояние	Дазатиниб	Темп. окрашивания тетр.	Темп. лабораторного стенда	Темп. центрифуги
A	+	37	КТ	КТ
B	-	КТ	КТ	КТ
C	+	37	4	4
D	+	4	4	4
E	-	КТ	4	4
F	+	КТ	4	4
G	-	4	4	4

[00345] На ФИГ. 36А показано, что двойное окрашивание тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) ± обработка DAS в присутствии смеси с тетрамером и

несоответствующим пептидом с инкубированием на лабораторном стенде (например, на льду) и центрифугированием при 4°C (Q2 в секциях C-G) как правило увеличивает степень обнаружения CD45+ Col6A3 REP1 клеток, окрашенных двумя флуорофорами ФЭ/BV421, по сравнению с теми случаями, когда не были предприняты какие-либо этапы при 4 °C (Q2 в секциях A и B). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. С обработкой DAS, на ФИГ. 36В, секция D (13,7%, Q2) показано, что проведение двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), инкубация на лабораторном стенде и центрифугирование при 4°C повышает фоновое окрашивание нагруженных несоответствующим пептидом Т-клеток, дважды положительных по BV421/АФЦ, в сравнении с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), проведенным при 37°C (секция С, 2,01 %, Q2) или при КТ (секция F, 3,07 %, Q2). Без обработки DAS, секция G (5,48%, Q2) показано, что проведение двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), инкубация на лабораторном стенде и центрифугирование при 4°C повышает фоновое окрашивание нагруженных несоответствующим пептидом Т-клеток, дважды положительных по BV421/АФЦ, в сравнении с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421), проведенным при КТ (секция E, 2,80 %, Q2).

[00346] На ФИГ. 36С представлены столбчатые диаграммы для специфического окрашивания (секции Q2 на ФИГ. 36А) и неспецифического окрашивания (секции Q2 на ФИГ. 36В). Предполагаемое количество на 1×10^6 на основании процентного соотношения из проточного цитометрического анализа, которое показывает число пептид-специфических Т-клеток на 1×10^6 CD45+ клеток, может быть рассчитано по формуле (2Dtet означает двойное окрашивание тетрамерами): $(2Dtet + \% \times 1 \times 10^6 / 100) - ((2Dtet + \% \times 1 \times 10^6 / 100) \times \text{смесь с тетрамером и несоответствующим пептидом} + \% / 100)$. В Таблице 14 обобщаются предполагаемые количества в условиях окрашивания A-G. Обработку DAS проводили при 37°C в течение 30 минут.

Таблица 14.

Состояние	Дазатиниб	Темп. окрашивания тетр.	Темп. лабораторного стенда	Темп. центрифуги	Предполагаемое кол-во на 1е6 на основе % соотн. в потоке*
A	+	37	КТ	КТ	2,24x10 ⁵
B	-	КТ	КТ	КТ	3,32x10 ⁵
C	+	37	4	4	5,61x10 ⁵
D	+	4	4	4	6,75x10 ⁵
E	-	КТ	4	4	6,40x10 ⁵
F	+	КТ	4	4	6,75x10 ⁵
G	-	4	4	4	7,06x10 ⁵

*(2Dtet+% x 1x10⁶/100) - ((2Dtet+% x 1x10⁶/100) x смесь с тетрамером и несоответствующим пептидом +% /100)).

[00347] Данные результаты указывают на то, что проведение всех циклов окрашивания, вращения (центрифугирования) и/или промывок при 4°C, например, условий окрашивания D и G, может быть предпочтительным на основании выявления более высокого предполагаемого числа пептид-специфических Т-клеток на 1 x 10⁶ CD45+ клеток, т. е., 6,75 x 10⁵ и 7,06 x 10⁵, соответственно, чем при других условиях, т. е., A, B, C, E и F.

[00348] Для изучения окрашивания МКПК в условиях D и G МКПК (12,5x10⁶ клеток/мл), полученных у 4 доноров, окрашивали ± обрабатывали DAS (50 нМ, при 37°C), тетрамером Col6A3-002 BV421 (3 мкг/мл) и Col6A3-002 ФЭ-тетрамером (2,5 мкг/мл), меченным флуорофором антителом к CD45, например, мышинные антитела PE-Cy7 к CD45 человека (BD Biosciences), тетрамером Col6A3-002 BV421 (3 мкг/мл), и АФЦ-несоответствующими пептидами (n = 5, например, и смесью с тетрамером Col6A3-015 (YLMDDFSSL (SEQ ID NO: 16)), MAG-003 (KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 118)), MAGEC2-001 (TLDEKVAEL (SEQ ID NO: 161)), MXRA5-003 (LLWGHPRVALA (SEQ ID NO: 18) и MAGEA1-003 (KVLEYVIKV (SEQ ID NO: 105)) (3 мкг/мл) со всеми видами окрашивания, вращений и промывки при 4°C.

[00349] С обработкой DAS, на ФИГ. 37А, верхняя левая секция, показано обнаружение 4,23Е-3 % (Q2) CD45+ Col6A3-положительных Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/ФЭ. На верхней средней секции (заключенной в прямоугольники) показано обнаружение 46,5 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами

(мечеными ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. На верхней правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области верхней средней секции на верхнюю левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 94 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $4,78 \times 10^6$ полученных лимфоцитов.

[00350] Без обработки DAS, на ФИГ. 37А, нижняя левая секция, показано обнаружение 4,38Е-3% (Q2) CD45+ Col6A3-положительных Т-клеток в МКПК с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/ФЭ. На нижней средней секции (заклученной в прямоугольники) показано обнаружение 34,4 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 нижней левой секции. На нижней правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области нижней средней секции на нижнюю левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 62 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $4,11 \times 10^6$ полученных лимфоцитов.

[00351] В целом, на ФИГ. 37В показано, что обработка DAS увеличивает степень обнаружения в МКПК, положительных по двойному окрашиванию тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в сравнении со случаем без обработки DAS, когда все виды окрашивания, вращения (центрифугирования) и промывки осуществляли при 4 °С. На ФИГ. 37С показано, что обработка DAS снижает среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для двойного окрашивания (мечеными ФЭ+BV421) + ФЭ и двойного окрашивания тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) + BV421 в сравнении со случаем без обработки DAS, когда все виды окрашивания, вращений (центрифугирования) и промывки осуществляли при 4 °С.

[00352] Эксперименты, показанные на ФИГ. 37A–37D, были повторены при использовании другого антитела к CD45, меченного флуорофором, например, PE-CyTM7 мышинные антитела к CD45 человека (BD Biosciences). МКПК (10×10^6 клеток/мл), полученные у 4 доноров, окрашивали с обработкой DAS и без нее (50 нМ, при 37°C), BV421 (3 мкг/мл), Col6A3-002 2D Tet (мечеными ФЭ+BV421) (2,5 мкг/мл), PerCP-CyTM5,5 мышинные антитела к CD45 человека (BD Biosciences), тетрамером Col6A3-002 BV421 (3 мкг/мл) и смесью с несоответствующим тетрамером-АФЦ ($n = 5$) (3 мкг/мл) со всеми этапами окрашивания, вращений и промывки при 4°C.

[00353] Без обработки DAS, на ФИГ. 38, нижняя секция, показано обнаружение 0,012% (Q2) CD45+ Col6A3-положительных Т-клеток в МКПК, с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/ФЭ. На средней секции (заключено в прямоугольник) показано обнаружение 7,62% 2D Tet (мечеными ФЭ+BV421)-положительных и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 левой секции. На правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области средней секции на левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 100 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $1,09 \times 10^7$ полученных лимфоцитов.

[00354] Эксперименты, показанные на ФИГ. 38, повторяли при использовании Col6A3 PER1 клеток в качестве контроля. С обработкой DAS, на ФИГ. 39, верхняя левая секция, показано обнаружение 68,9% (Q2) CD45+ Col6A3 PER1 клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/ФЭ. На верхней средней секции (заключено в прямоугольник) показано обнаружение 95,8% 2D Tet (мечеными ФЭ+BV421)-положительных и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 верхней левой секции. На верхней правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области

верхней средней секции на верхнюю левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 135941 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в 206 055 полученных лимфоцитов.

[00355] Без обработки DAS, на ФИГ. 39, нижняя левая секция, показано обнаружение 62,5 % (Q2) CD45+ Col6A3 PEP1 клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421). Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/ФЭ. На нижней средней секции (заключено в прямоугольник) показано обнаружение 97,6 % 2D Tet (мечеными ФЭ+BV421)-положительных и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 нижней левой секции. На нижней правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области нижней средней секции на нижнюю левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 179819 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в 294752 полученных лимфоцитов.

[00356] Для исследования влияния высокого и низкого числа МКПК, полученных для обнаружения 2D Tet, проводили окрашивание, например, высокого числа (S1 и S2) и низкого числа (S3 и S4). В отношении высокого числа МКПК на ФИГ. 40А (верхняя левая секция) на S1 (с обработкой DAS) показано обнаружение 128 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий среди $1,29 \times 10^7$ полученных лимфоцитов. В верхней правой секции, в S1 (без обработки DAS), показано обнаружение 100 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $1,09 \times 10^7$ полученных лимфоцитов. В нижней левой секции, в S2 (с обработкой DAS), показано обнаружение 68 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $6,09 \times 10^6$ полученных лимфоцитов. В нижней правой секции, в S2 (без обработки DAS), показано обнаружение 65

положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $6,37 \times 10^6$ полученных лимфоцитов.

[00357] В отношении низкого числа МКПК на ФИГ. 40В (верхняя левая секция) в S3 (с обработкой DAS), показано обнаружение 23 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $9,71 \times 10^5$ полученных лимфоцитов. В верхней правой секции, в S3 (без обработки DAS), показано обнаружение 11 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $9,48 \times 10^5$ полученных лимфоцитов. В нижней левой секции, в S4 (с обработкой DAS), показано обнаружение 80 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $5,35 \times 10^6$ полученных лимфоцитов. В нижней правой секции, в S4 (без обработки DAS), показано обнаружение 66 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру с несоответствующим пептидом событий в $6,42 \times 10^6$ полученных лимфоцитов.

[00358] На ФИГ. 40С показано, что обработка DAS при двойном окрашивании тетрамерами имеет тенденцию к увеличению частоты встречаемости положительных по двойному окрашиванию клеток по сравнению со случаями без обработки DAS.

[00359] На ФИГ. 40D показано, что обработка DAS при двойном окрашивании тетрамерами имеет тенденцию к снижению уровня MFI положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными BV421 + ФЭ, и может не влиять на MFI положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ, при обнаружении положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по меченому АФЦ тетрамеру нагруженных несоответствующим пептидом клеток по сравнению со случаями без обработки DAS.

[00360] Для исследования влияния на окрашивание фильтрованных и нефильтрованных тетрамеров для двойного окрашивания был приготовлен раствор для двойного окрашивания тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и доведен до рабочего разведения, а затем профильтрован через фильтр с размером пор 0,2 мкм. αCol6A3 Т-клетки были окрашены фильтрованным и нефильтрованным раствором для двойного окрашивания тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом. При использовании нефильтрованных растворов для двойного окрашивания тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, при окрашивании αCol6A3 Т-клеток, на ФИГ. 40Е (секции А-Е) показано образование агрегатов при окрашивании, на которые указывают стрелки в секциях D и E. Напротив, при использовании фильтрованных растворов для двойного окрашивания тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, при окрашивании αCol6A3 Т-клеток, на ФИГ. 40Е (секции F–J) показано снижение уровня агрегатов при окрашивании, на которые указывают стрелки в секциях I и J. Фильтрованные тетрамеры для двойного окрашивания демонстрируют снижение уровня «агрегатов» при окрашивании со всеми исследованными флуорофорами, например, АФЦ, BV421 и ФЭ.

[00361] В целом, снижение температуры до 4°C во время всего процесса окрашивания может повысить %-ную долю и интенсивность окрашивания. Обработка DAS может также повысить уровень чувствительности окрашивания, поскольку 1/4 из обработанных DAS образцов демонстрирует 2-кратное увеличение уровня MFI. Таким образом, один предпочтительный вариант осуществления по условиям окрашивания может включать (1) окрашивание при 4°C, (2) обработку DAS при 37°C, (3) пептид-специфический тетрамер, конъюгированный с BV421, (4) пептид-специфический тетрамер, конъюгированный с ФЭ, (5) тетрамер с несоответствующими пептидами, конъюгированный с АФЦ, и (6) меченое флуорофором антитело к CD45, например, мышинные антитела PE-Cy™7 к CD45 человека (BD Biosciences). Например, оптимизированные секции могут включать (1) специфические тетрамеры для двойного окрашивания, меченые ФЭ (2,5 мкг/мл) + BV421 (3 мкг/мл), (2) смесь несоответствующих пептидов (n = 5, например, Col6A3-015 (YLMDDFSSL (SEQ ID NO: 16)), MAG-003 (KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 118)), MAGEC2-001 (TLDEKVAEL (SEQ ID NO: 161)), MXRA5-003 (LLWGHPRVALA (SEQ ID NO: 18) и MAGEA1-003 (KVLEYVIKV (SEQ ID

NO: 105)) и меченых АФЦ тетрамеров (3 мкг/мл) (могут использоваться пептиды со сходной последовательностью), (3) тетрамер-стабилизированные антитела к АФЦ + к ФЭ (разведение 1:50 = по 10 мкг/мл каждого), (4) обработку DAS (50 нМ) при 37°C в течение 30 минут, (5) расположение шлангов на льду, центрифугирование при 4°C, и окрашивание при 4°C (например, в холодильнике) во время всех циклов окрашивания, что может привести к максимальной чувствительности, и (6) фильтрованные тетрамеры для снижения агрегации при окрашивании во всех флуорофорах.

[00362] ПРИМЕР 5:

[00363] Оптимизация сортировки

[00364] Для сравнения различных секций в стратегиях сортировки МКПК (4-5 x 10⁶ клеток/мл) окрашивали ± антитело к CD45, например, PE-Cy7 к CD45, в присутствии смеси среды для двойного окрашивания тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом. В Таблице 15 обобщаются результаты.

Таблица 15.

CD45 +/-	Триггер	Чистота
+	BV421	75,2%
+	PE	77,2%
-	BV421	73,8%
-	PE	71,9%

[00365] В Таблице 15 показано, что уровень чистоты с использованием антитела к CD45, триггера BV421 и триггера ФЭ в результате составлял 75,2% и 77,2%, соответственно, что немного выше, чем без применения антитела к CD45, например, 73,8% и 71,9%, соответственно. Наблюдавшийся более низкий уровень чистоты, чем теоретическая чистота, которая была рассчитана на основании распределения Пуассона с использованием модельной системы с известным процентным соотношением мишень-положительных клеток, может быть отнесен на счет довольно широкого гейтирования положительных по двойному

окрашиванию тетрамерами клеток. Данный низкий уровень чистоты может быть приемлемым для стратегий сортировки, которые содержат последовательные этапы сортировки.

[00366] В целях исследования влияния концентраций клеток на чистоту было проанализировано четыре различные концентрации МКПК, в которые в известном количестве было добавлено примерно 0,1 % клеток, положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, например, в 23×10^6 клеток/мл было добавлено 0,13 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, клеток, в 44×10^6 клеток/мл было добавлено 0,14 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, клеток, в 76×10^6 клеток/мл было добавлено 0,09 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, клеток и в 87×10^6 клеток/мл было добавлено 0,12 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, клеток. В Таблице 16 обобщаются результаты.

Таблица 16.

Концентрация (10^6 клеток/мл)	Чистота
23	50,60 %
44	28,40 %
76	18,90 %
87	13,90 %

[00367] В Таблице 16 показано, что чем более низкая концентрация клеток, тем выше чистота. Чистота, тем не менее, во всех случаях составила на 13-25% меньше, чем теоретическая чистота. Как отмечено выше, наблюдавшийся более низкий, чем теоретическая чистота, уровень чистоты может быть связан с довольно широким гейтированием положительных по двойному окрашиванию тетрамерами клеток.

[00368] Чтобы повысить чистоту, применяли две стратегии сортировки. В стратегии № 1 использовали только один картридж, т. е., все клетки целиком загружали в один картридж и процесс сортировки повторяли три раза, используя один и тот же картридж. Исходя из того, что при обработке 900×10^6 клеток было

возможно обнаружить примерно 0,0004 % положительных по двойному окрашиванию тетрамерами клеток, общая эффективность сортировки в 95,7 % может быть достигнута за счет повторения сортировки три раза при использовании одного и того же картриджа на основании эффективности сортировки в 65 % при концентрации 87×10^6 клеток/мл.

[00369] В стратегии № 2 использовали четыре картриджа, например, 900×10^6 клеток делили на три картриджа, и каждый картридж использовали только один раз. Предполагалось, что эффективность сортировки будет составлять между 92,8 % (аналогично тому, как при 25×10^6 клеток/мл) и 79,2% (аналогично тому, как при 50×10^6 клеток/мл). Например, если в каждый картридж помещается 10 мл, и в рамках стратегии № 2 обрабатывается 1×10^9 клеток, 2×10^9 клеток или 3×10^9 клеток, то концентрация 33×10^6 клеток/мл, 66×10^6 клеток/мл или 100×10^6 клеток/мл была бы использована при сортировке, соответственно. Для завершения процесса сортировки могут потребоваться 5 часов.

[00370] Чтобы максимально повысить эффективность в циклах сортировки в одном картридже обрабатывали весь образец целиком при концентрации 90–100 $\times 10^6$ клеток/мл (Стратегия № 1). В качестве контроля, на ФИГ. 41, левая секция, показано обнаружение 76,0% (Q2) Col6A3 PER1 клеток с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На средней секции (заключено в прямоугольник) показано обнаружение 98,9% 2D Tet (мечеными ФЭ+BV421)-положительных и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 левой секции. На правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области средней секции на левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 95315 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421 и отрицательных по окрашиванию меченым АФЦ тетрамером с несоответствующим пептидом событий в 126690 полученных лимфоцитов.

[00371] На ФИГ. 42 показан пример стратегии гейтирования. На ФИГ. 42, левая секция, показано обнаружение $2,62 \times 10^{-3}$ % (Q2) дважды-положительных по

BV421/ФЭ клеток в МКПК ($7,09 \times 10^6$ одиночных клеток) с двойным окрашиванием тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) в присутствии смеси с меченым АФЦ тетрамером несоответствующим пептидом. Данные клетки Q2 затем анализировали для выявления Т-клеток, положительных по несоответствующему пептиду, т. е., клеток, окрашенных двумя флуорофорами АФЦ/BV421. На средней секции (заключено в прямоугольник) показано обнаружение 40,2% (частота встречаемости одиночных клеток = $6,91 \times 10^{-4}$) положительных по двойному окрашиванию флуорофорами (ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток в дважды положительных по BV421/ФЭ клетках, обнаруженных в Q2 левой секции. В правой секции показано наложение заключенной в прямоугольник области средней секции на левую секцию. Данные результаты показывают обнаружение 49,0 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами, мечеными ФЭ/BV421, и отрицательных по окрашиванию меченым АФЦ тетрамером и несоответствующим пептидом событий в $4,66 \times 10^6$ полученных лимфоцитов (частота встречаемости лимфоцитов = $1,05 \times 10^{-3}$).

[00372] На ФИГ. 43 представлен пример последовательного истощения по положительным по двойному окрашиванию тетрамерами и отрицательным по окрашиванию АФЦ клеток из внесенного образца (левая секция, 0,001 % ($49/4,66 \times 10^6$)) до конечной сортировки (правая секция, 97,3 % ($73/75$)). Было отобрано 1,877 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду явлений, и 536 положительных по двойному окрашиванию тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток было удалено в отходы.

[00373] На ФИГ. 44 показаны эксплуатационные характеристики сортировки с примерно 92 000-кратным обогащением (от 0,001 % до 97,3 %) положительных по двойному окрашиванию тетрамерами (мечеными ФЭ+BV421) и отрицательных по несоответствующему пептиду клеток после последовательного истощения по положительным по двойному окрашиванию тетрамерами и отрицательным по окрашиванию АФЦ клеток из внесенного образца.

[00374] Для моделирования полной сортировки CD8 клеток из панели окрашивания МКПК окрашивали и анализировали МКПК (1×10^9 клеток). На ФИГ. 45 показано, что 54,7 % лимфоцитов (секция А) из МКПК были собраны с 98,3 %

живых клеток, представленных в секции В. В секции С показаны 35,3 % CD3+ клеток среди собранных лимфоцитов. В секции D показаны 49,1 % CD3+CD8+ клеток среди CD3+ клеток.

Таблица 17.

Состояние	CD8 из всех клеток	Всего Col6A3-002
1e9 МКПК	9,3%	1440
1e9 CD8	~85% (предсказано)	13 161 (предсказано)

[00375] В Таблице 17 показаны 9,3% CD8, которые были выделены из 1×10^9 МКПК. Выделенные CD8+ клетки могут быть дополнительно отсортированы с выходом примерно 1440 Col6A3-002-специфических CD8+ Т-клеток. На основании данных наблюдений, если исходить из 1×10^9 CD8+ клеток, то можно сделать предположение, что примерно 85% из них будут CD8+ клетками. Если это верно, то можно предположить, что примерно 13 161 Col6A3-002-специфических CD8+ Т-клеток будут обнаружены в 1×10^9 CD8+ клеток. Таким образом, имея одно и то же количество исходных клеток, начальная сортировка CD8+ клеток может привести к более высокому выходу пептид-специфических Т-клеток, чем начальная сортировка МКПК.

[00376] В целом, при сортировке клеток триггер ФЭ может быть лучше, чем триггер BV421. Чтобы улучшить сортировку с использованием клеток с высокими концентрациями клеток, например, свыше 1×10^8 клеток/мл, можно использовать картриджи с высокопроизводительными фильтрами и/или чистую исходную популяцию CD8.

[00377] Все цитируемые в настоящем описании источники включены в него посредством ссылки, как если бы каждый источник был конкретно и в отдельности указан включенным путем ссылки. Цитирование любой ссылки предназначается для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должно истолковываться как допущение, что настоящее изобретение не может быть датировано ранее такой публикации путем ссылки на более раннее изобретение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ РСТ

1. Способ получения Т-клеток, включающий

контактирование CD8⁺ Т-клеток с первым мультимером, включающим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС и вторым мультимером, включающим несоответствующий пептид в комплексе с молекулой МНС, где первый мультимер является меченным первым поддающимся обнаружению элементом, а второй мультимер является меченным вторым поддающимся обнаружению элементом, где первый поддающийся обнаружению элемент имеет отличие от второго поддающегося обнаружению элемента в обнаружении, где последовательность несоответствующего пептида менее чем на 50% идентична последовательности пептида-мишени, сортировку CD8⁺ Т-клеток после контактирования для сбора отобранных CD8⁺ Т-клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого поддающегося обнаружению элемента и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента, и экспансию собранных CD8⁺ Т-клеток.

2. Способ по п. 1, где контактирование производится в присутствии первого связывающего элемента, связывающегося с первым поддающимся обнаружению элементом и/или второго связывающего элемента, связывающегося со вторым поддающимся обнаружению элементом.

3. Способ по п. 2, где первый связывающий элемент и второй связывающий элемент являются антителами.

4. Способ по любому из пп. 1–3, где контактирование производится при температуре примерно от 4°C до примерно 37°C.

5. Способ по любому из пп. 1–4, где контактирование осуществляется в присутствии ингибитора протеинкиназы (ИПК).

6. Способ по п. 5, где ИПК является по меньшей мере одним из веществ, выбранных из группы, состоящей из следующего: афатиниб, акситиниб, босутиниб, цетуксимаб,

кобиметиниб, кризотиниб, кабозантиниб, дазатиниб, энтректиниб, эрдафитиниб, эрлотиниб, фостаматиниб, гефитиниб, ибрутиниб, иматиниб, лапатиниб, ленватиниб, мубритиниб, нилотиниб, пазопаниб, пегаптаниб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, SU6656, вандетаниб и вемурафениб.

7. Способ по любому из пп. 1–6, где сортировка, сбор и экспансия проводятся в закрытой системе.

8. Способ по любому из пп. 1–7, где пептид-мишень состоит из аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 141.

9. Способ по любому из пп. 1–8, где несоответствующий пептид является по меньшей мере одним пептидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–140 и 142–161.

10. Способ по любому из пп. 1–8, где несоответствующий пептид является по меньшей мере одним пептидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 18, 105, 118 и 161.

11. Способ получения Т-клеток, включающий

культивирование CD8⁺ Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина,

контактирование CD8⁺ Т-клеток с первым мультимером, включающим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС и вторым мультимером, включающим несоответствующий пептид в комплексе с молекулой МНС,

где первый мультимер является меченным первым поддающимся обнаружению элементом, а второй мультимер является меченным вторым поддающимся обнаружению элементом, где первый поддающийся обнаружению элемент имеет отличие от второго поддающегося обнаружению элемента в обнаружении,

сортировку CD8⁺ Т-клеток после контактирования для сбора отобранных CD8⁺ Т-клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого поддающегося обнаружению элемента и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента, и

экспансию собранных CD8⁺ Т-клеток.

12. Способ по п. 11, где образец крови является моноклеарной клеткой периферической крови (МКПК) или продуктом лейкофереза.
13. Способ по п. 12 или п. 13, где образец крови получена у пациента.
14. Способ по любому из пп. 11–13, где образец крови получают у донора.
15. Способ по любому из пп. 11–14, где по меньшей мере один цитокин выбран из интерлейкина (ИЛ)-1, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-23.
16. Способ по любому из пп. 11–15, где мультимер является тетрамером.
17. Способ по любому из пп. 11–16, где молекула МНС является молекулой МНС I класса.
18. Способ по любому из пп. 11–17, где и первый, и второй поддающийся обнаружению элемент включает флуоресцентное соединение.
19. Способ по любому из пп. 11–18, где сортировка и сбор проводятся при использовании клеточного сортера на основе микрочипов.
20. Способ по любому из пп. 11–19, где сортер на основе микрочипов является одноразовым, расходным материалом и полностью закрытым сортером на основе микрожидкостного чипа.
21. Способ по любому из пп. 11–20, где экспансия проводится в присутствии по меньшей мере одного цитокина.
22. Способ по п. 21, где по меньшей мере один цитокин выбран из ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-15, ИЛ-17, ИЛ-21 и ИЛ-23.
23. Способ по любому из пп. 11–22, где сортировка, сбор и экспансия проводятся в закрытой системе.
24. Способ по любому из пп. 11–23, где контактирование производится в присутствии первого связывающего элемента, связывающегося с первым поддающимся обнаружению элементом, и/или второго связывающего элемента, связывающегося со вторым поддающимся обнаружению элементом.
25. Способ по п. 24, где первый связывающий элемент и второй связывающий элемент являются антителами.

26. Способ по любому из пп. 11–25, где контактирование производится при температуре примерно от 4°C до примерно 37°C.
27. Способ по любому из пп. 11–26, где несоответствующий пептид является по меньшей мере одним пептидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–161.
28. Способ по любому из пп. 11–27, где несоответствующий пептид в комплексе с молекулой МНС не связывается с теми же Т-клетками, что и пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС.
29. Способ по любому из пп. 11–28, где контактирование осуществляется в присутствии ингибитора протеинкиназы (ИПК).
30. Способ по п. 29, где ИПК является по меньшей мере одним из веществ, выбранных из группы, состоящей из следующего: афатиниб, акситиниб, босутиниб, цетуксимаб, кобиметиниб, кризотиниб, кабозантиниб, дазатиниб, энтректиниб, эрдафитиниб, эрлотиниб, фостаматиниб, гефитиниб, ибрутиниб, иматиниб, лапатиниб, ленватиниб, мубритиниб, нилотиниб, пазопаниб, пегаптаниб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, SU6656, вандетаниб и вемурафениб.
31. Способ по любому из пп. 11–30, где контактирование осуществляется в присутствии третьего мультимера, включающего пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, где третий мультимер является меченным третьим поддающимся обнаружению элементом, где третий поддающийся обнаружению элемент имеет отличие от первого и второго поддающихся обнаружению элементов в обнаружении, и где сортировка включает сбор отсортированных CD8+ Т-клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого и третьего поддающихся обнаружению элементов и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента.
32. Способ по любому из пп. 11–31, где мультимеры фильтруют до использования в контактировании.
33. Способ по любому из пп. 11–32, где образец крови содержит клетки при концентрации от примерно $0,1 \times 10^6$ клеток/мл до примерно 1000×10^6 клеток/мл, от примерно 1×10^6 клеток/мл до примерно 900×10^6 клеток/мл, от примерно 5×10^6 клеток/мл до примерно 800×10^6 клеток/мл, от примерно 10×10^6 клеток/мл до

примерно 700×10^6 клеток/мл, от примерно 20×10^6 клеток/мл до примерно 600×10^6 клеток/мл, от примерно 25×10^6 клеток/мл до примерно 500×10^6 клеток/мл, от примерно 30×10^6 клеток/мл до примерно 400×10^6 клеток/мл, от примерно 35×10^6 клеток/мл до примерно 300×10^6 клеток/мл, от примерно 40×10^6 клеток/мл до примерно 200×10^6 клеток/мл, от примерно 45×10^6 клеток/мл до примерно 150×10^6 клеток/мл, от примерно 50×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 55×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 60×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 65×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 70×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 75×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 80×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 85×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 90×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл или от примерно 95×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл.

34. Способ по любому из пп. 11–33, где указанный способ получения Т-клеток не включает использование антигенпрезентирующей клетки или агонистов для CD3, CD28, CD134, CD278 или CD137 для активации Т-клеток до или во время этапа культивирования выделенных Т-клеток.

35. Способ по любому из пп. 11–34, дополнительно включающий получение экспансированных Т-клеток, где период времени между выделением и получением экспансированных Т-клеток составляет от примерно 7 дней до примерно 14 дней, от примерно 7 дней до примерно 21 дня, от примерно 7 дней до примерно 28 дней, от примерно 14 дней до примерно 21 дня, от примерно 14 дней до примерно 28 дней или от примерно 21 дня до примерно 28 дней.

36. Способ по любому из пп. 11–35, где указанный способ включает выделение CD4+ Т-клеток, а не CD8+ Т-клеток, или выделение как CD4+ Т-клеток, так и CD8+ Т-клеток.

37. Способ по любому из пп. 11–36, где культивирование выделенных CD8+ Т-клеток производится в отсутствие агента, активирующего Т-клетки, так что выделенные CD8+ Т-клетки являются неактивированными.

38. Способ получения Т-клеток, включающий
 контактирование образца крови с

первым мультимером, включающим пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, где первый мультимер является меченным первым поддающимся обнаружению элементом, и вторым мультимером, включающим несоответствующий пептид, который отличается от пептида-мишени, в комплексе с молекулой МНС, где второй мультимер является меченным вторым поддающимся обнаружению элементом, где первый и второй поддающиеся обнаружению элементы являются поддающимися обнаружению элементами, имеющими отличие друг от друга в обнаружении, сортировку клеток после контактирования для сбора отобранных клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого поддающегося обнаружению элемента и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента, и экспансию собранных Т-клеток.

39. Способ по п. 38, где образец крови является моноклеарной клеткой периферической крови (МКПК) или продуктом лейкофереза.
40. Способ по п. 38 или п. 39, где образец крови получен у пациента.
41. Способ по любому из пп. 38–40, где образец крови получают у донора.
42. Способ по любому из пп. 38–41, где контактирование производится в присутствии первого связывающего элемента, связывающегося с первым поддающимся обнаружению элементом, и/или второго связывающего элемента, связывающегося со вторым поддающимся обнаружению элементом.
43. Способ по п. 42, где первый связывающий элемент и второй связывающий элемент являются антителами.
44. Способ по любому из пп. 38–43, где контактирование производится при примерно от 4°C до примерно 37°C.
45. Способ по любому из пп. 38–44, где несоответствующий пептид является по меньшей мере одним пептидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1–161.

46. Способ по любому из пп. 38–45, где несоответствующий пептид в комплексе с молекулой МНС не связывается с теми же Т-клетками, что и пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС.

47. Способ по любому из пп. 38–46, где контактирование осуществляется в присутствии ингибитора протеинкиназы (ИПК).

48. Способ по п. 47, где ИПК является по меньшей мере одним из веществ, выбранных из группы, состоящей из следующего: афатиниб, акситиниб, босутиниб, цетуксимаб, кобиметиниб, кризотиниб, кабозантиниб, дазатиниб, энтректиниб, эрдафитиниб, эрлотиниб, фостаматиниб, гефитиниб, ибрутиниб, иматиниб, лапатиниб, ленватиниб, мубритиниб, нилотиниб, пазопаниб, пегаптаниб, руксолитиниб, сорафениб, сунитиниб, SU6656, вандетаниб и вемурафениб.

49. Способ по любому из пп. 38–48, где контактирование осуществляется в присутствии третьего мультимера, включающего пептид-мишень в комплексе с молекулой МНС, где третий мультимер является меченым третьим поддающимся обнаружению элементом, где третий поддающийся обнаружению элемент имеет отличие от первого и второго поддающихся обнаружению элементов в обнаружении, и где сортировка включает сбор отсортированных CD8+ Т-клеток, которые дают положительный результат при обнаружении первого и третьего поддающихся обнаружению элементов и отрицательный результат при обнаружении второго поддающегося обнаружению элемента.

50. Способ по любому из пп. 38–49, где мультимеры фильтруют через фильтр до использования в контактировании.

51. Способ по любому из пп. 38–50, где указанный способ получения Т-клеток не включает использование антигенпрезентирующей клетки или агониста для CD3, CD28, CD134, CD278 или CD137 для активации Т-клеток до или во время этапа культивирования выделенных Т-клеток.

52. Способ по любому из пп. 38–51, дополнительно включающий получение экспансированных Т-клеток, где период времени между выделением и получением экспансированных Т-клеток составляет от примерно 7 дней до примерно 14 дней, от примерно 7 дней до примерно 21 дня, от примерно 7 дней до примерно 28 дней, от примерно 14 дней до примерно 21 дня, от примерно 14 дней до примерно 28 дней или от примерно 21 дня до примерно 28 дней.

53. Способ по любому из пп. 38–52, где образец крови содержит клетки при концентрации от примерно $0,1 \times 10^6$ клеток/мл до примерно 1000×10^6 клеток/мл, от примерно 1×10^6 клеток/мл до примерно 900×10^6 клеток/мл, от примерно 5×10^6 клеток/мл до примерно 800×10^6 клеток/мл, от примерно 10×10^6 клеток/мл до примерно 700×10^6 клеток/мл, от примерно 20×10^6 клеток/мл до примерно 600×10^6 клеток/мл, от примерно 25×10^6 клеток/мл до примерно 500×10^6 клеток/мл, от примерно 30×10^6 клеток/мл до примерно 400×10^6 клеток/мл, от примерно 35×10^6 клеток/мл до примерно 300×10^6 клеток/мл, от примерно 40×10^6 клеток/мл до примерно 200×10^6 клеток/мл, от примерно 45×10^6 клеток/мл до примерно 150×10^6 клеток/мл, от примерно 50×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 55×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 60×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 65×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 70×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 75×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 80×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 85×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл, от примерно 90×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл или от примерно 95×10^6 клеток/мл до примерно 100×10^6 клеток/мл.

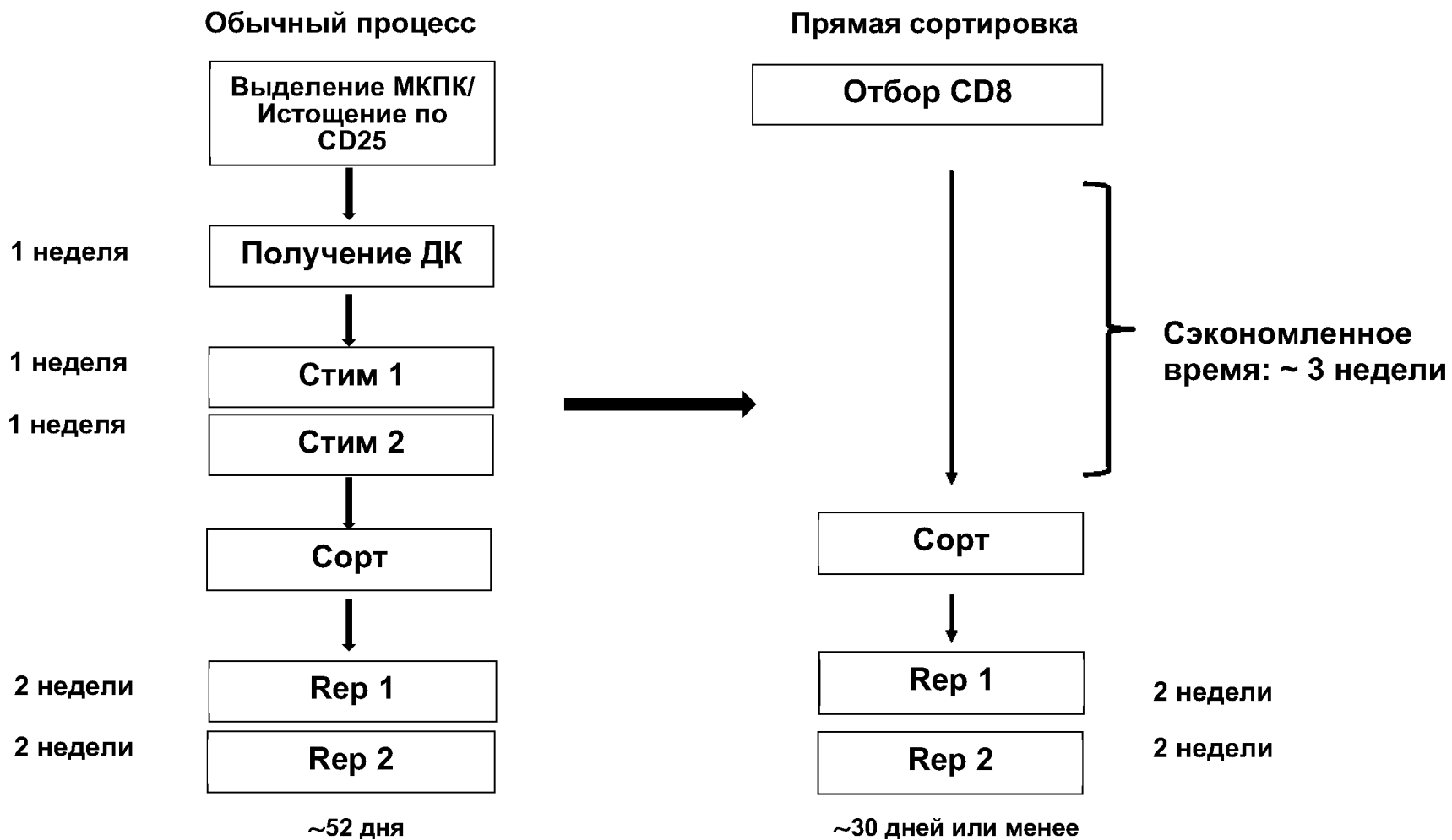
54. Композиция, включающая пептид-специфические Т-клетки, полученная с помощью способа по любому из пп. 1–53.

55. Композиция по п. 54, дополнительно включающая адъювант.

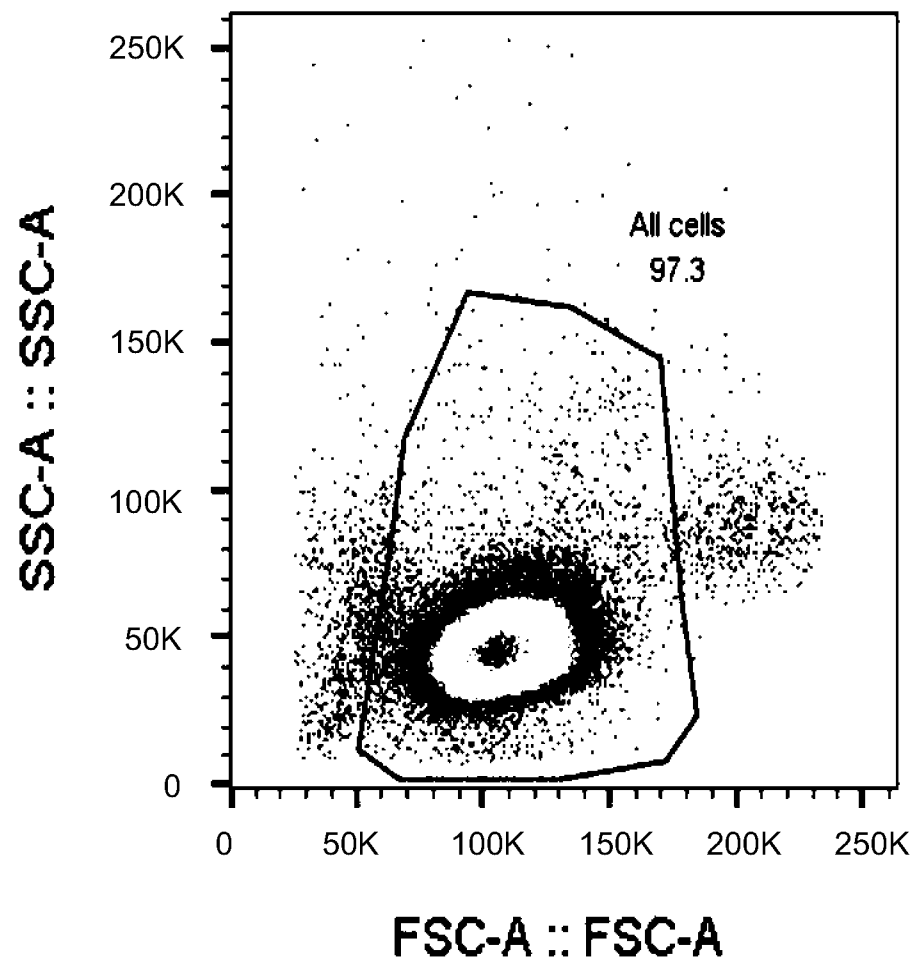
56. Композиция по п. 55, где адъювант выбран из следующего: антитело к CD40, имиквимод, резиквимод, ГМ-КСФ, циклофосфамид, интерферон-альфа, интерферон-бета, CpG олигонуклеотиды, поли-(I:C), РНК, силденафил, составы из твердых микрочастиц на основе поли(лактид когликолида) (PLG), виросомы, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-21 и ИЛ-23.

57. Способ лечения пациента, имеющего раковое заболевание, включая введение указанному пациенту композиции по любому из пп. 54–56, где указанное раковое заболевание выбрано из гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечноклеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПРЖ), рака предстательной железы (РПРЖ), рака

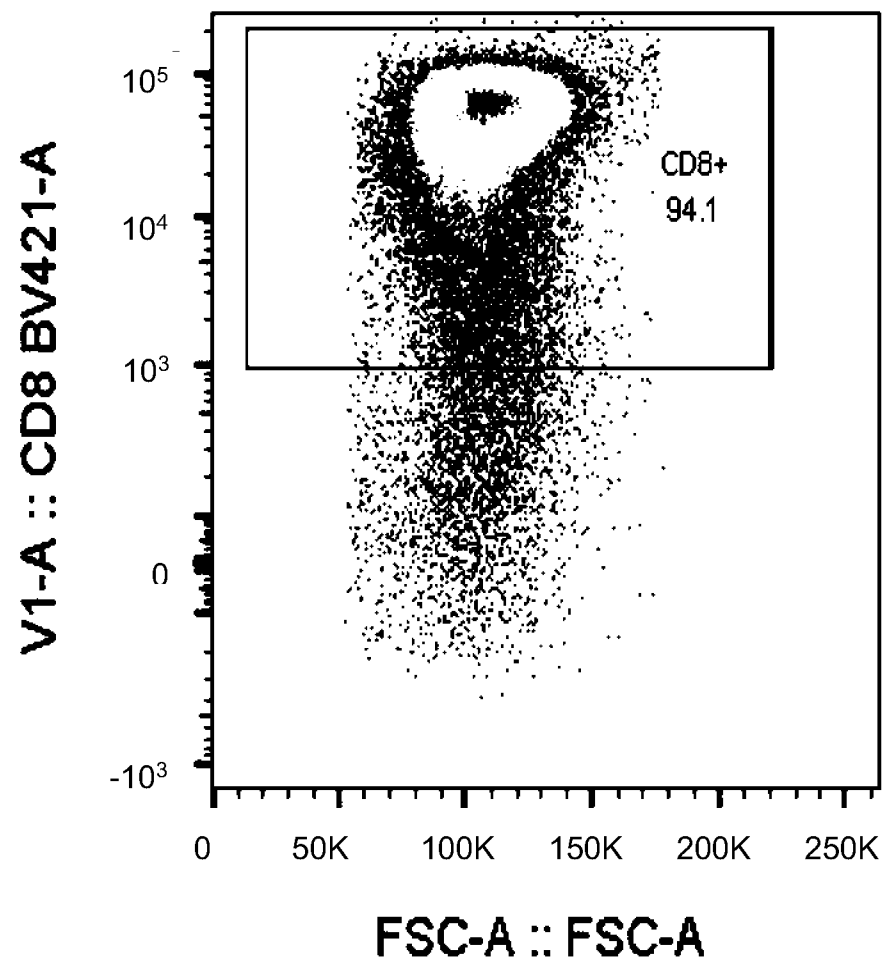
яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы (РМЖ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП) и рака матки (РЭМ). 41. Композиция по любому из пп. 37-39 для применения в лечении ракового заболевания у пациента, где композиция вводится указанному пациенту, и где указанное раковое заболевание выбрано из гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечноклеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПРЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы (РМЖ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (НМРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП) и рака матки (РЭМ).



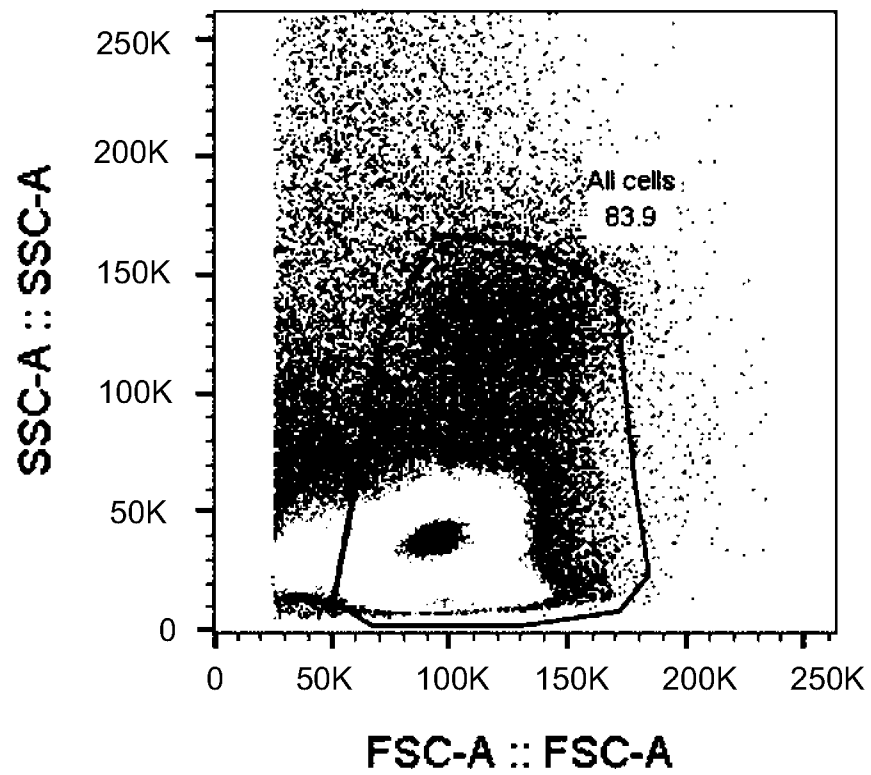
ФИГ. 1



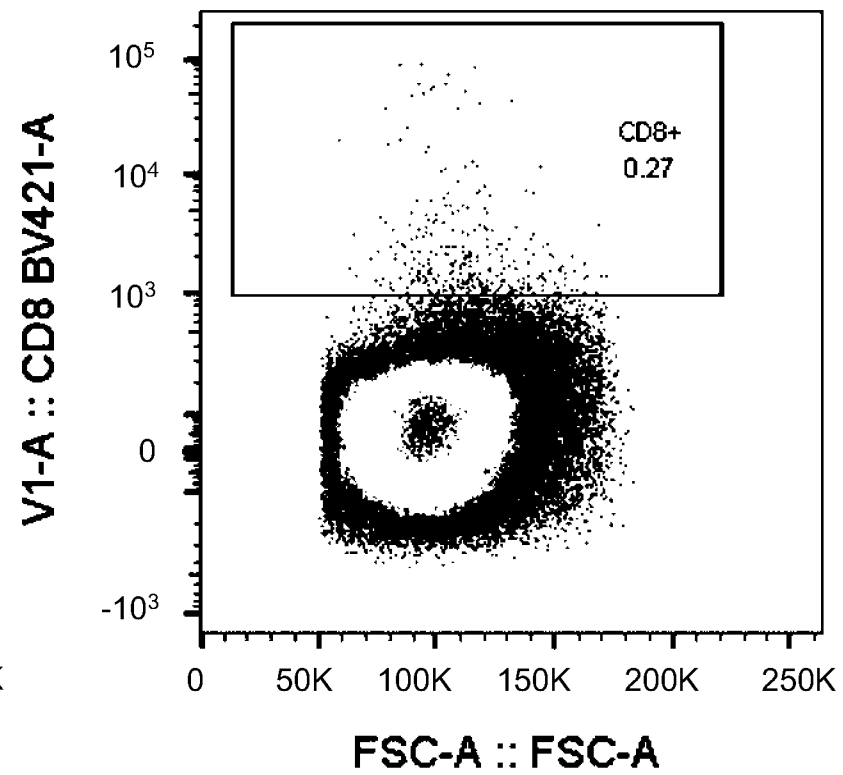
ФИГ. 2А



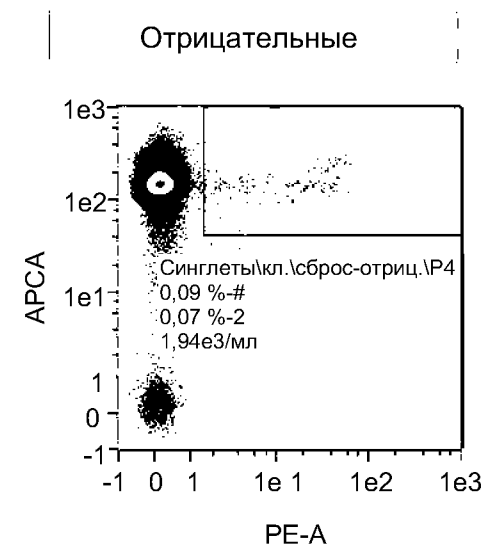
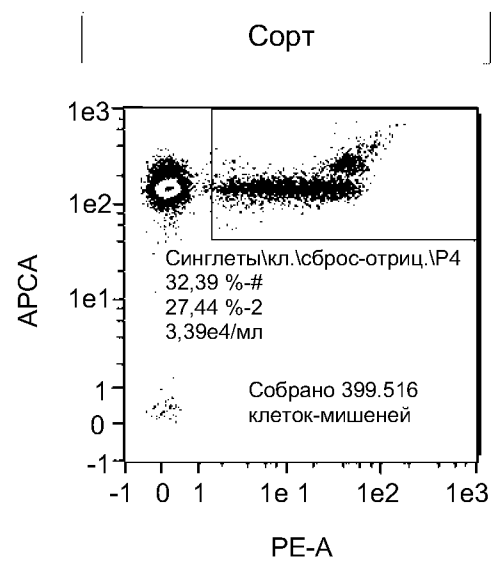
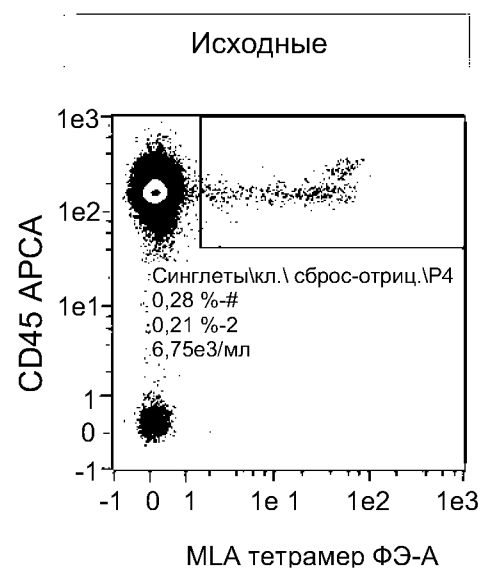
ФИГ. 2В



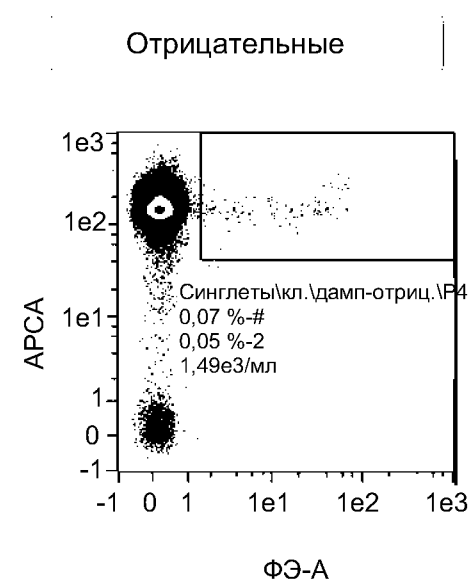
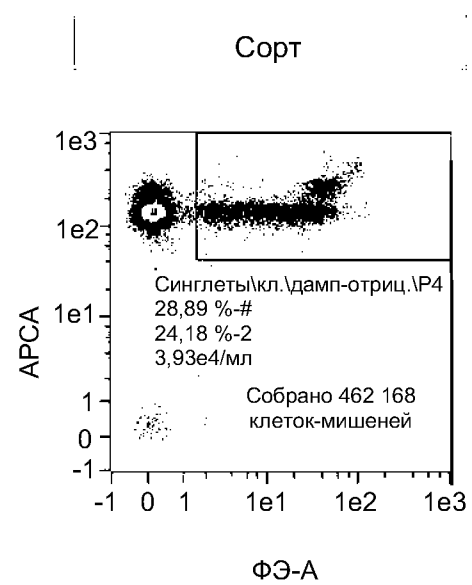
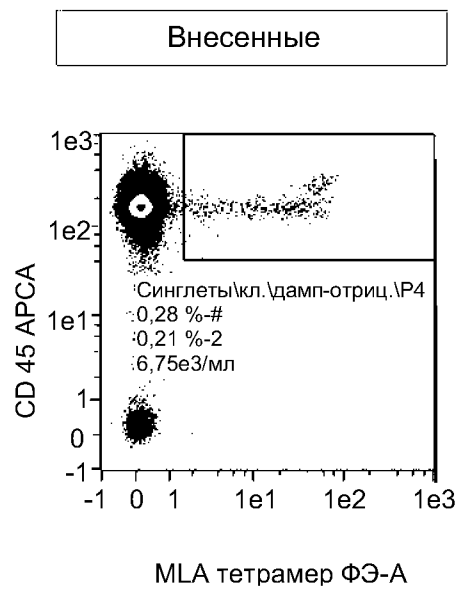
ФИГ. 2С



ФИГ. 2D

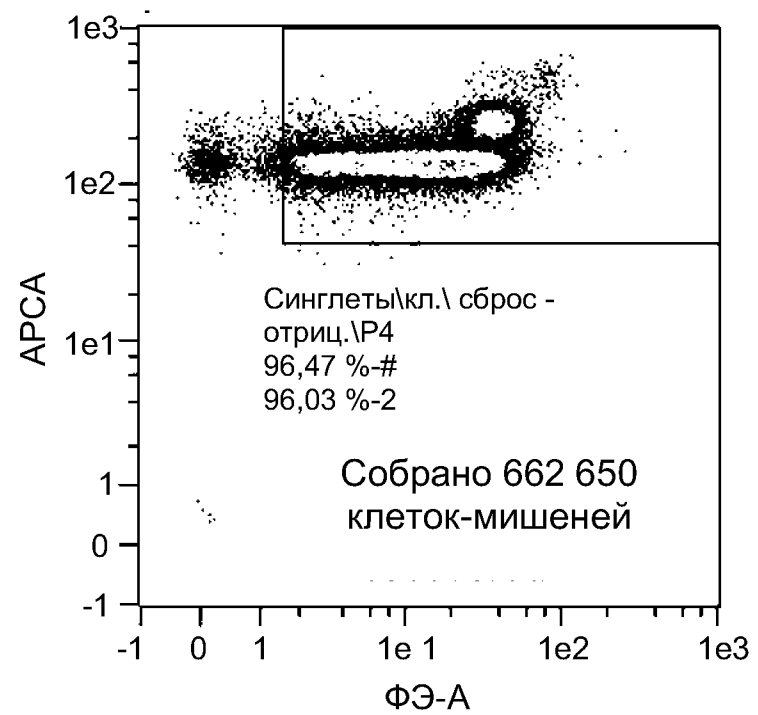


ФИГ. 3

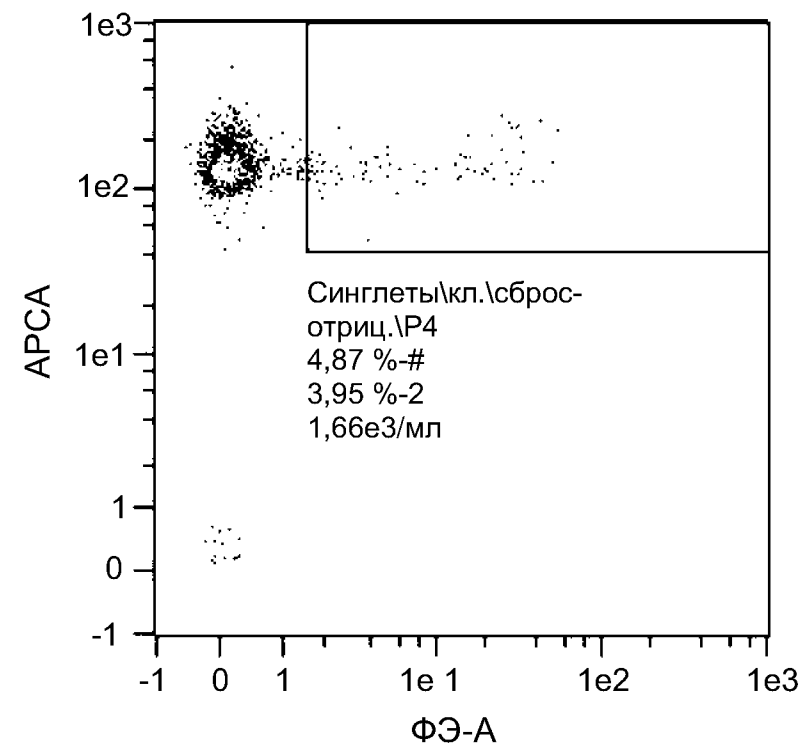


ФИГ. 4

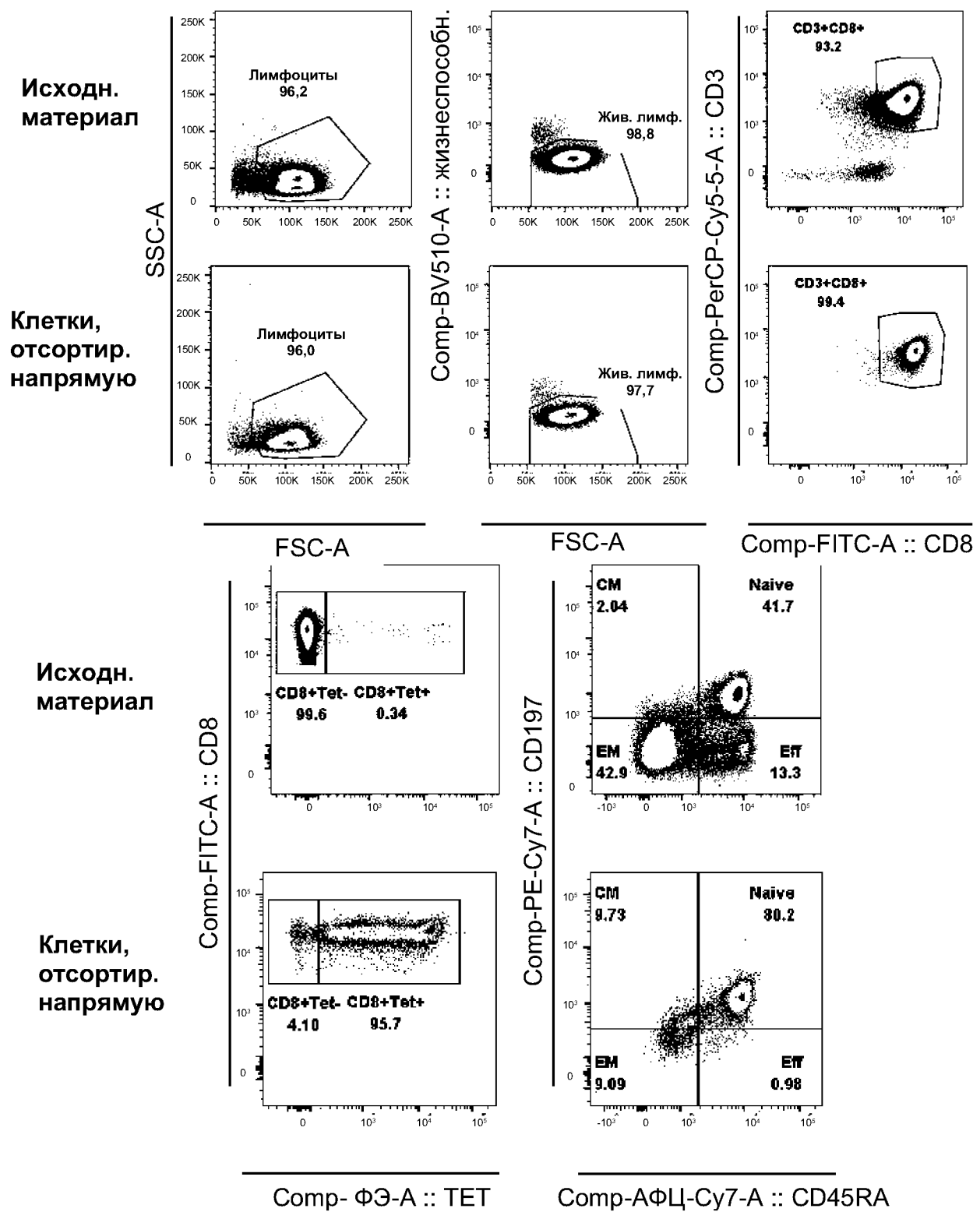
Сорт



Отрицательные



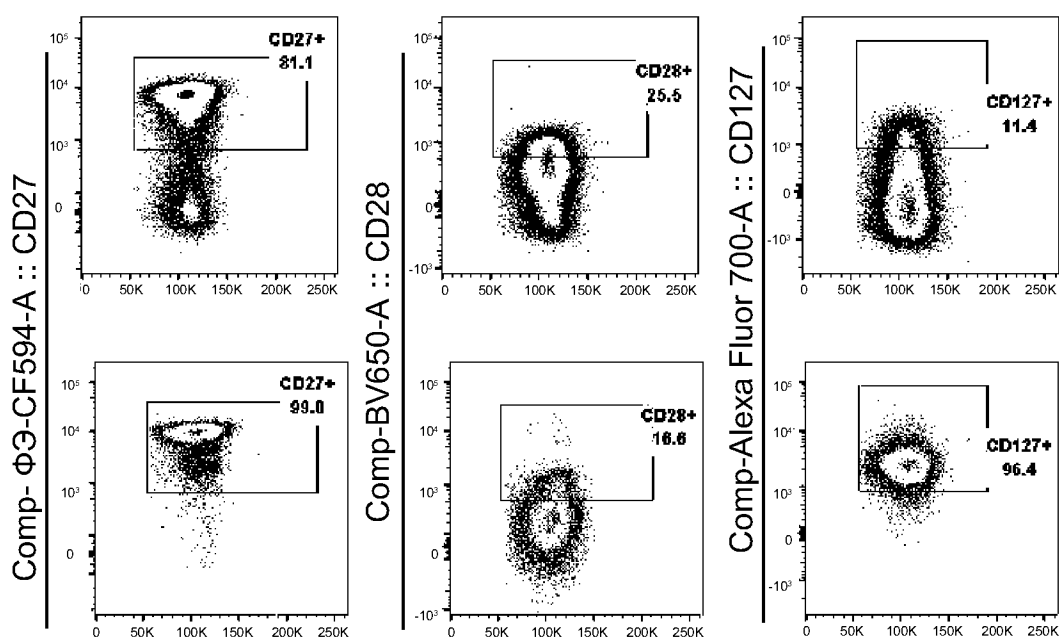
ФИГ. 5



ФИГ. 6А

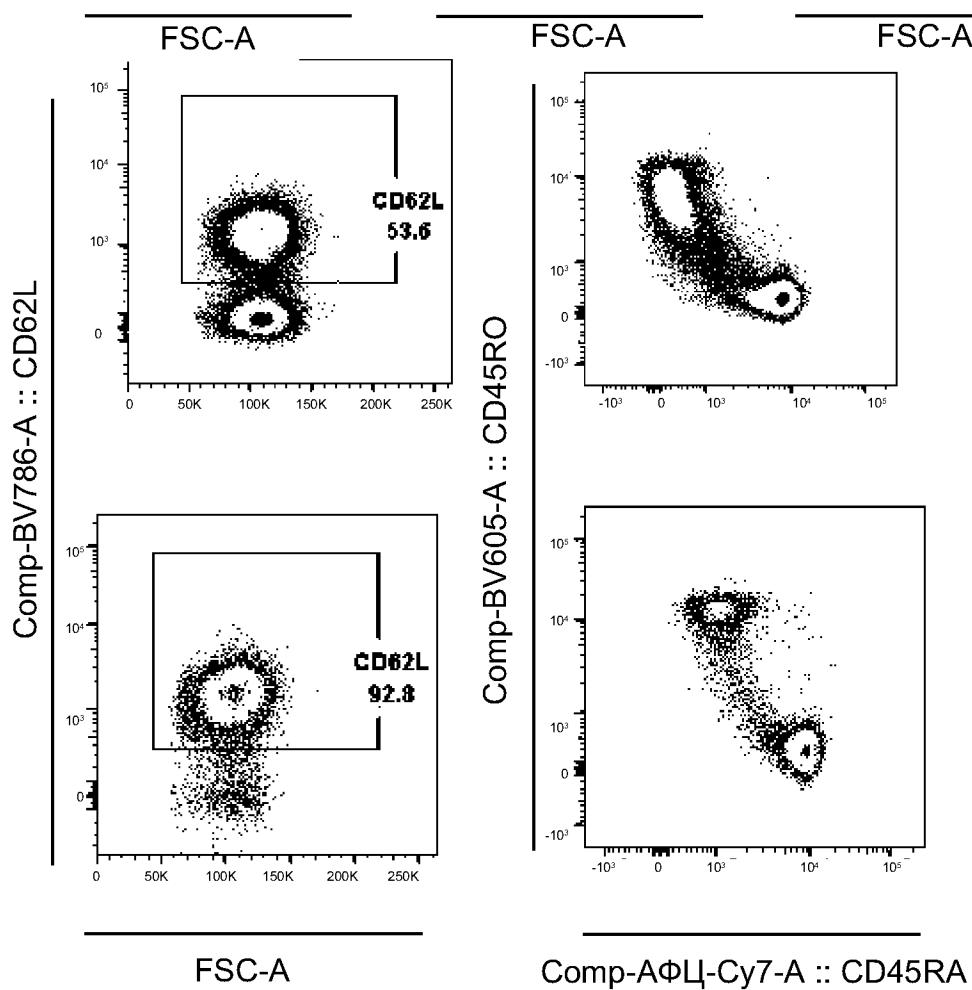
Исходн.
материал

Клетки,
отсортир.
напрямую

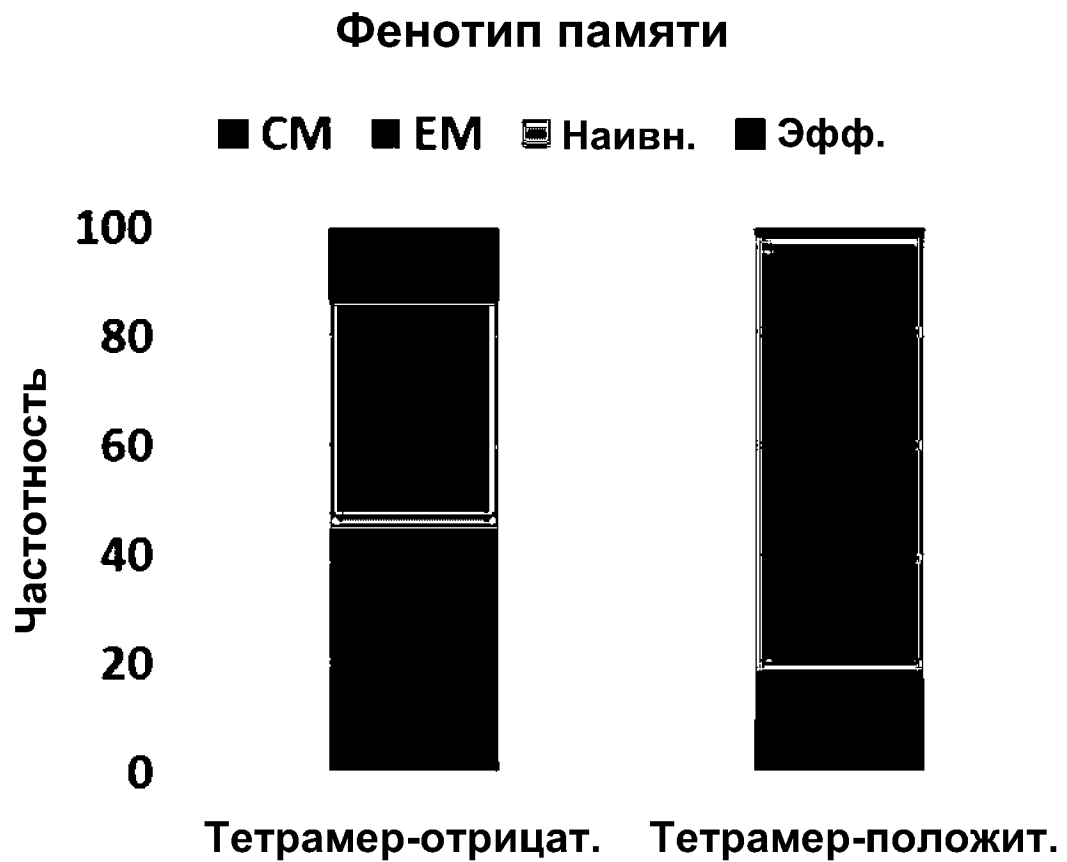


Исходн.
материал

Клетки,
отсортир.
напрямую

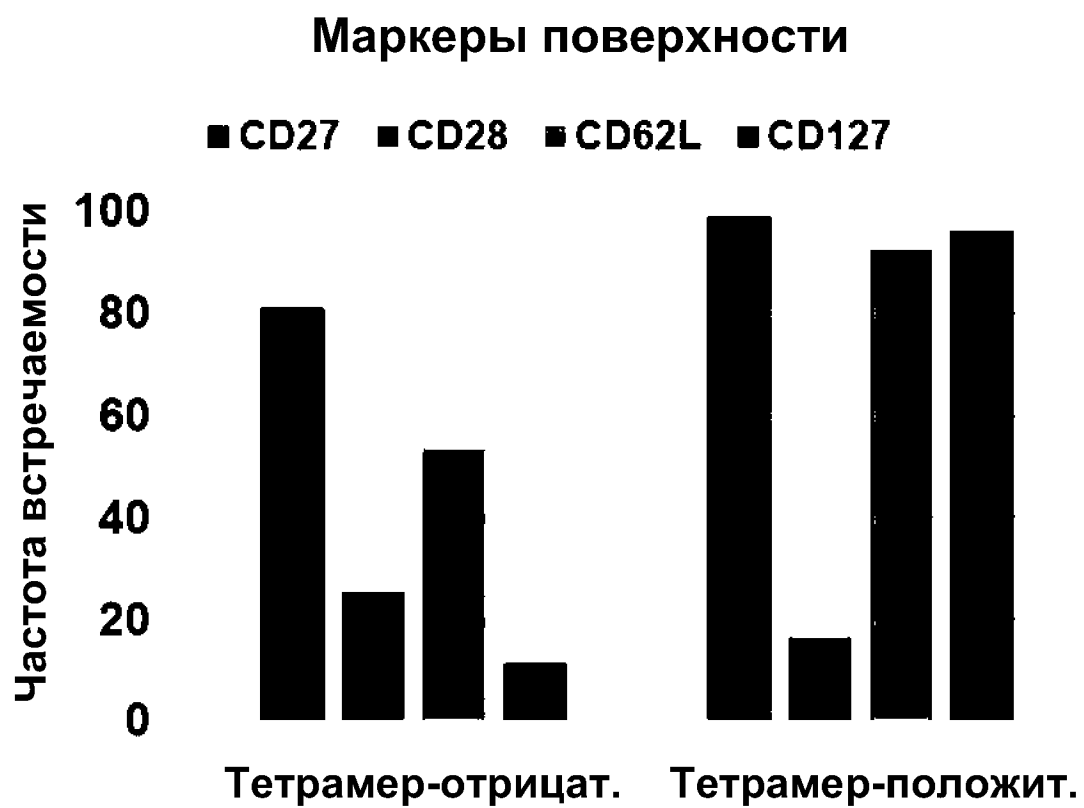


ФИГ. 6В

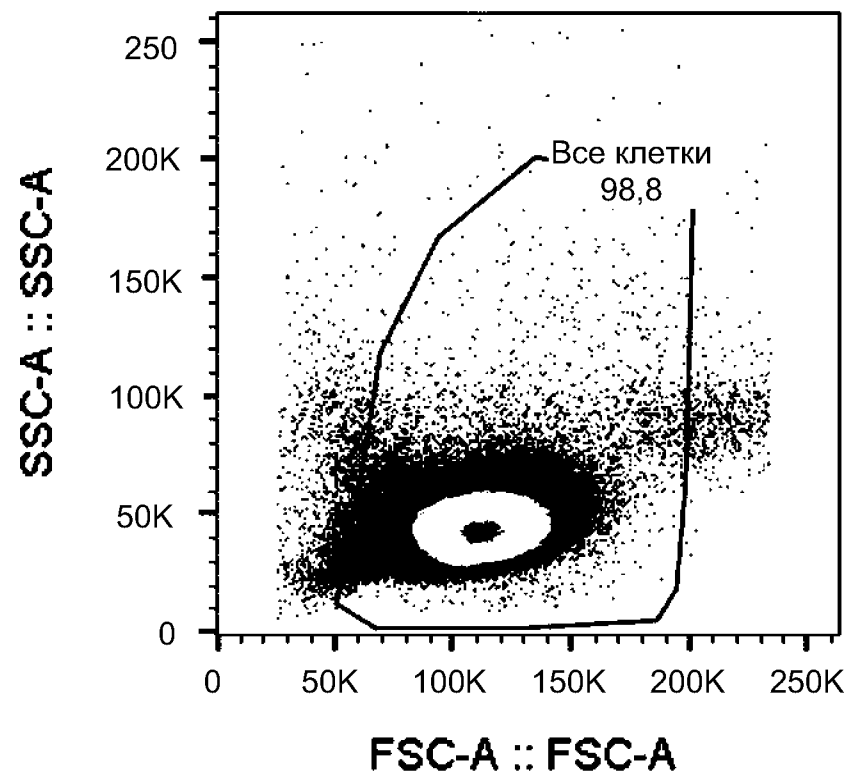


ЕМ – ЭП эффекторная память CM – ЦП центральная память

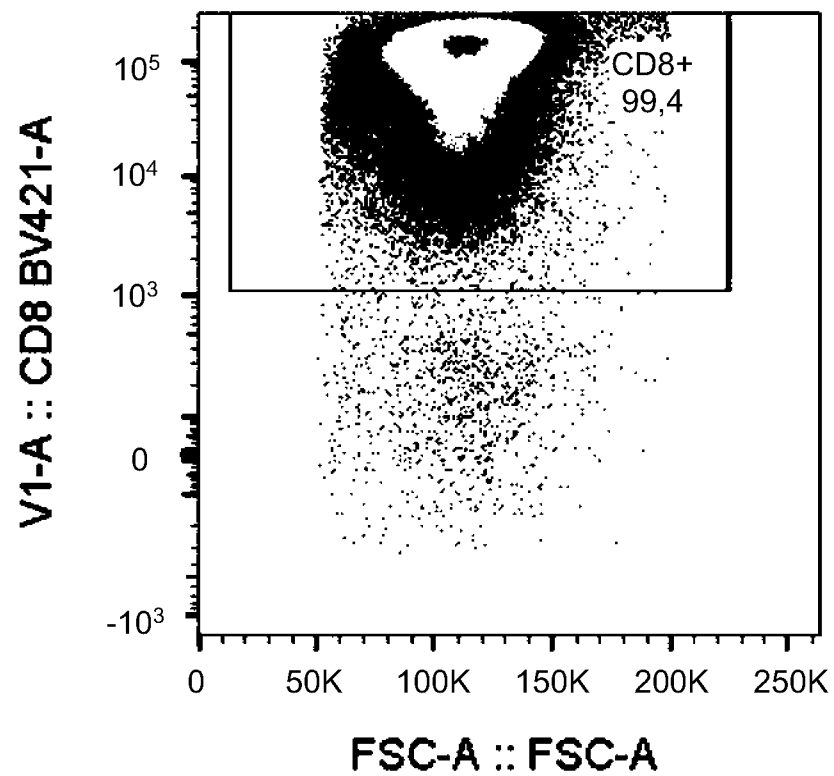
ФИГ. 7



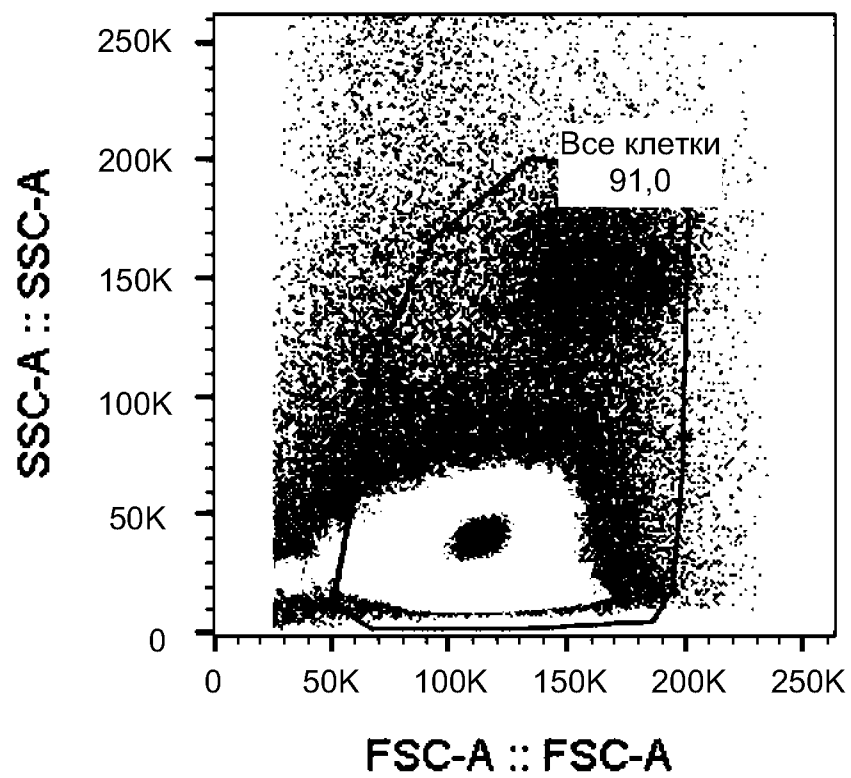
ФИГ. 8



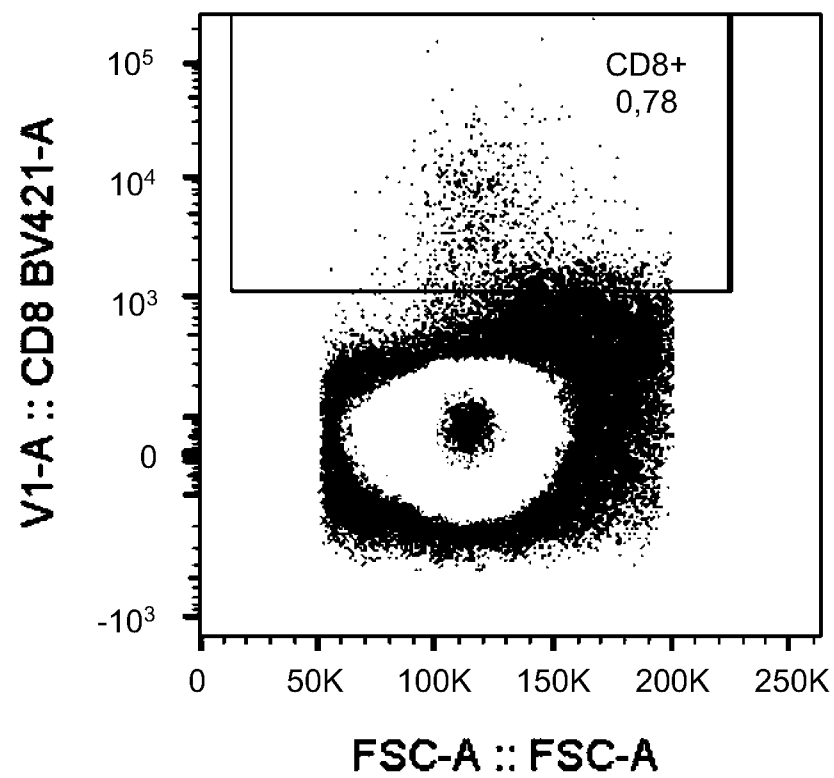
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



ФИГ. 9C

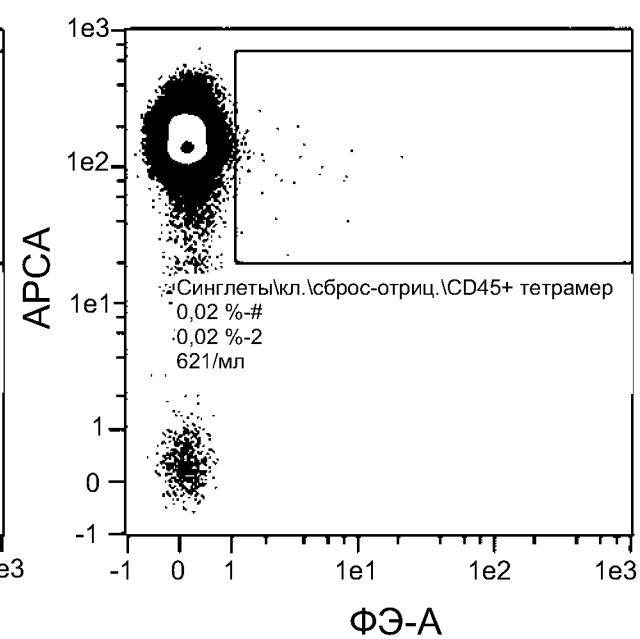
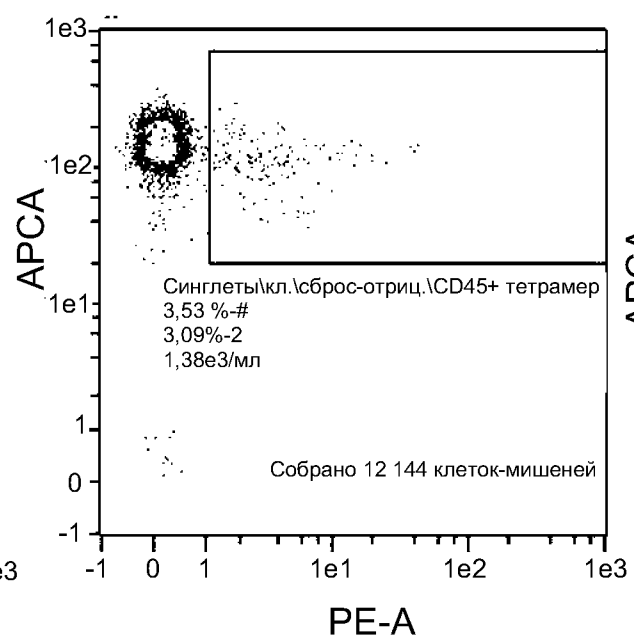
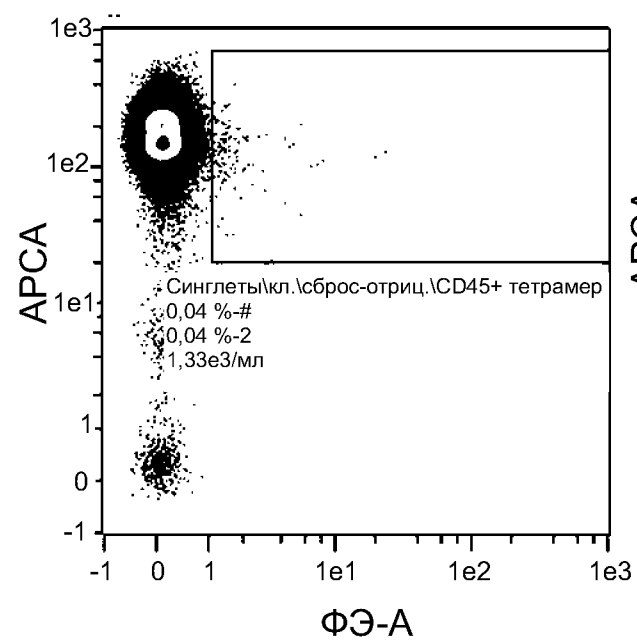


ФИГ. 9D

Исходные

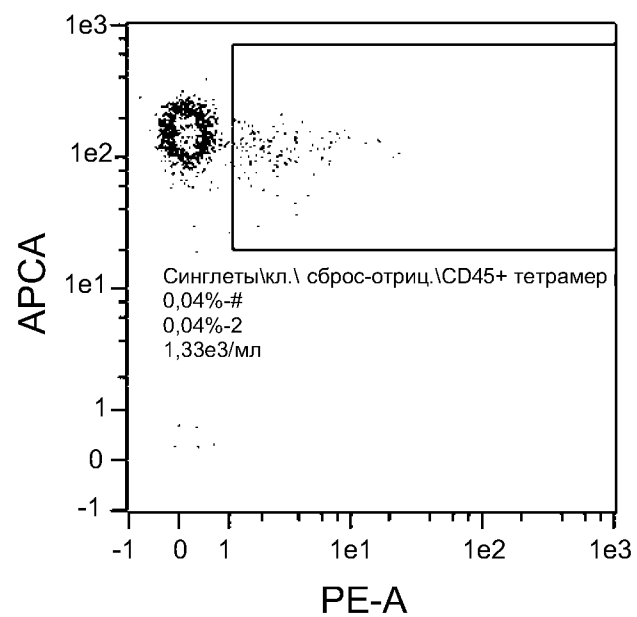
Сорт

Отрицательные

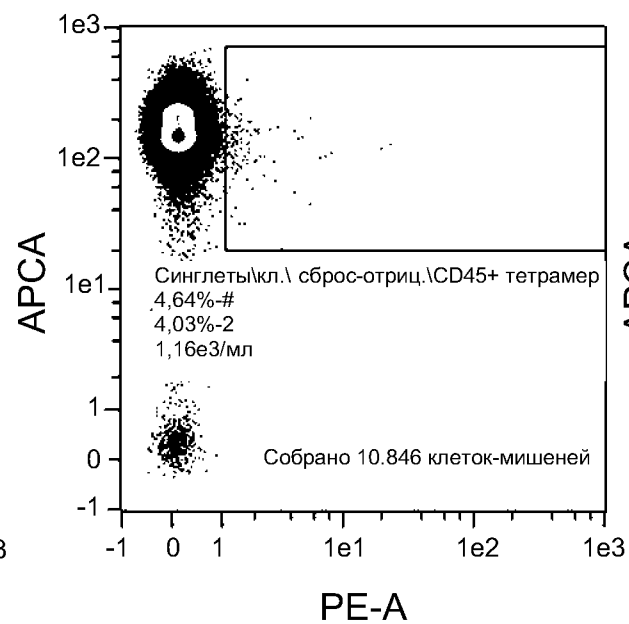


ФИГ. 10

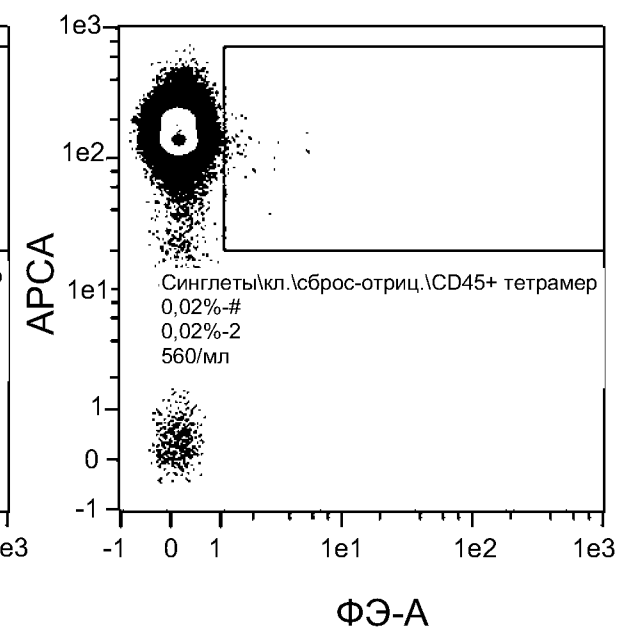
Исходные



Сорт



Отрицательные

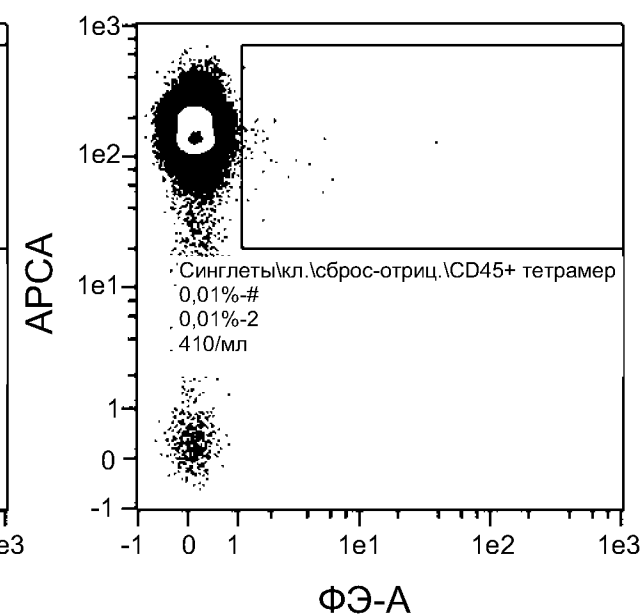
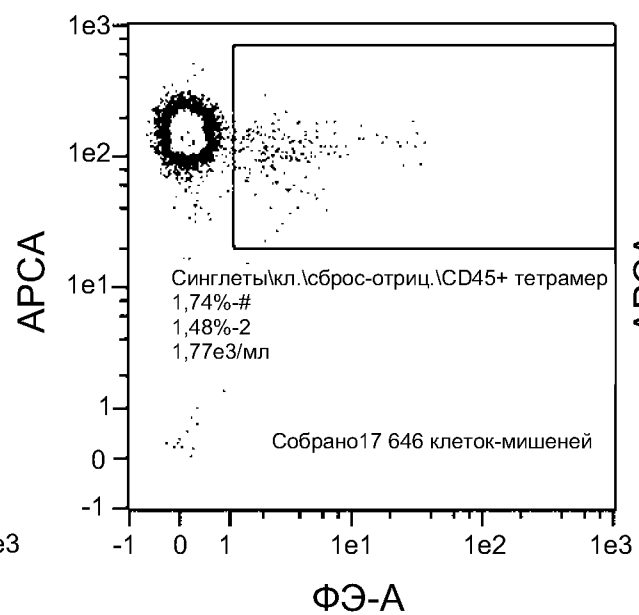
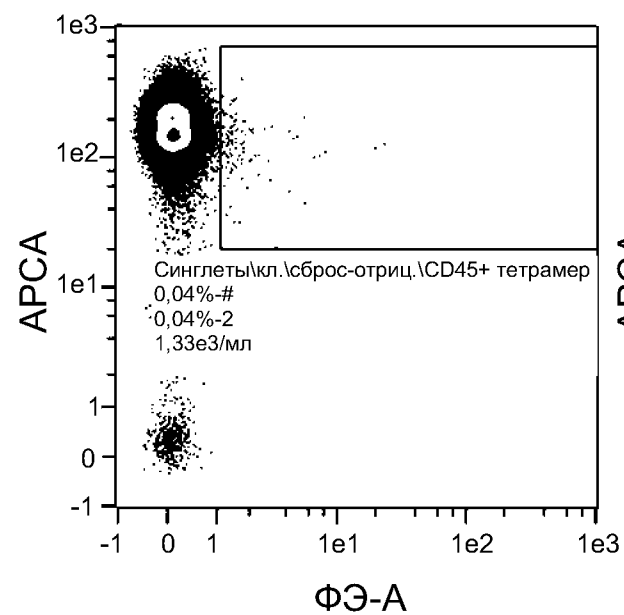


ФИГ. 11

Исходные

Сорт

Отрицательные

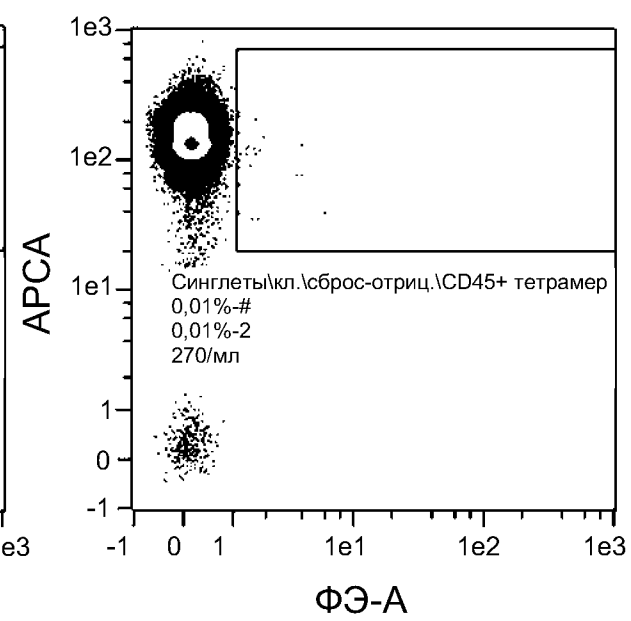
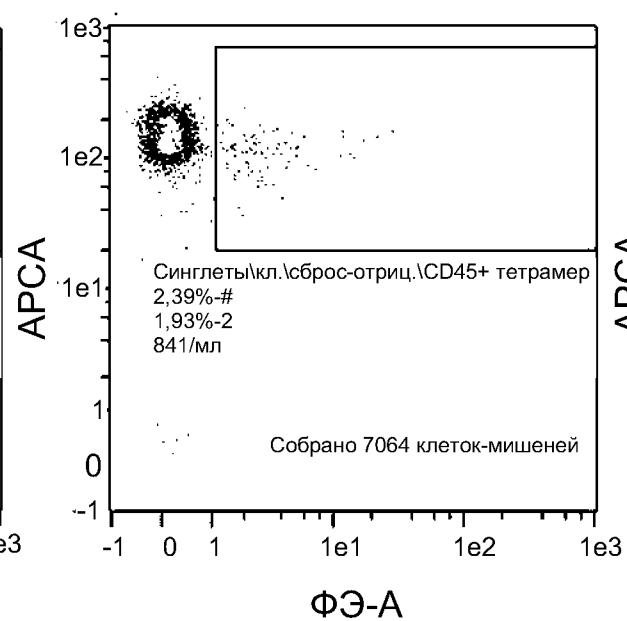
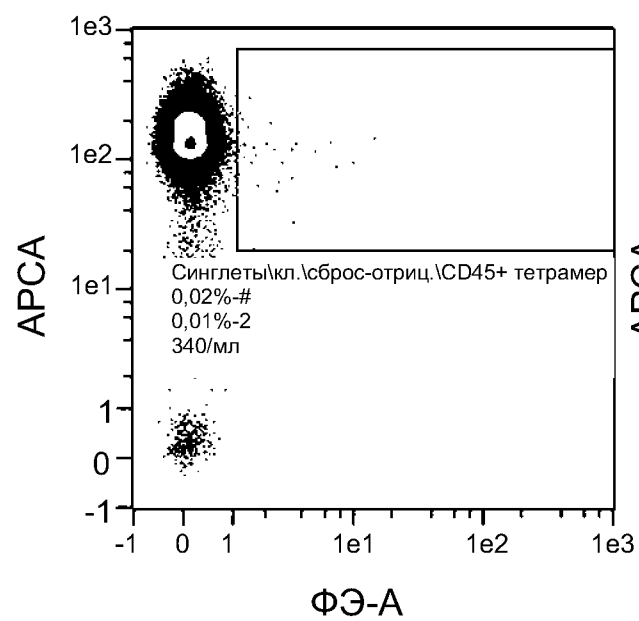


ФИГ. 12

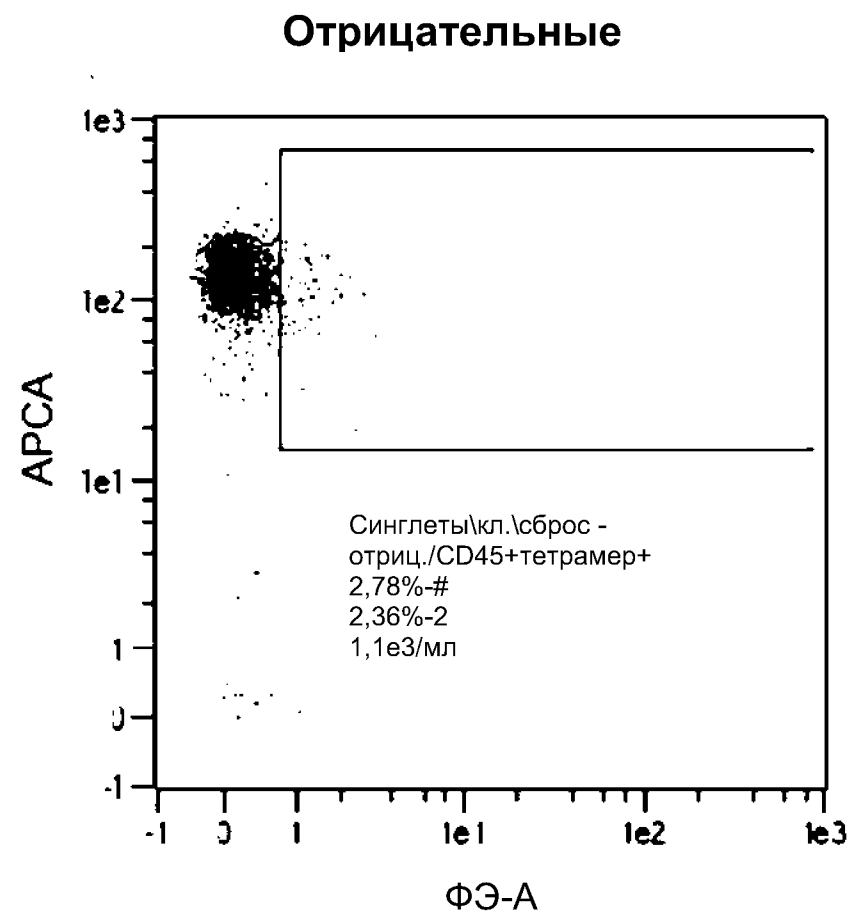
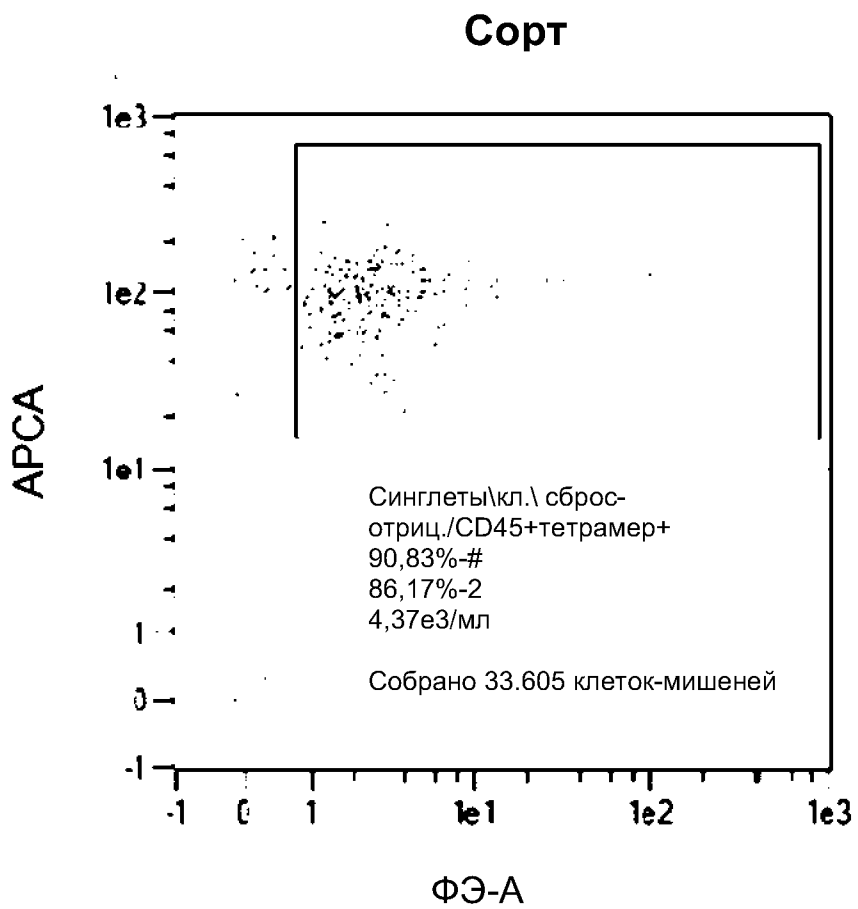
Исходные

Сорт

Отрицательные

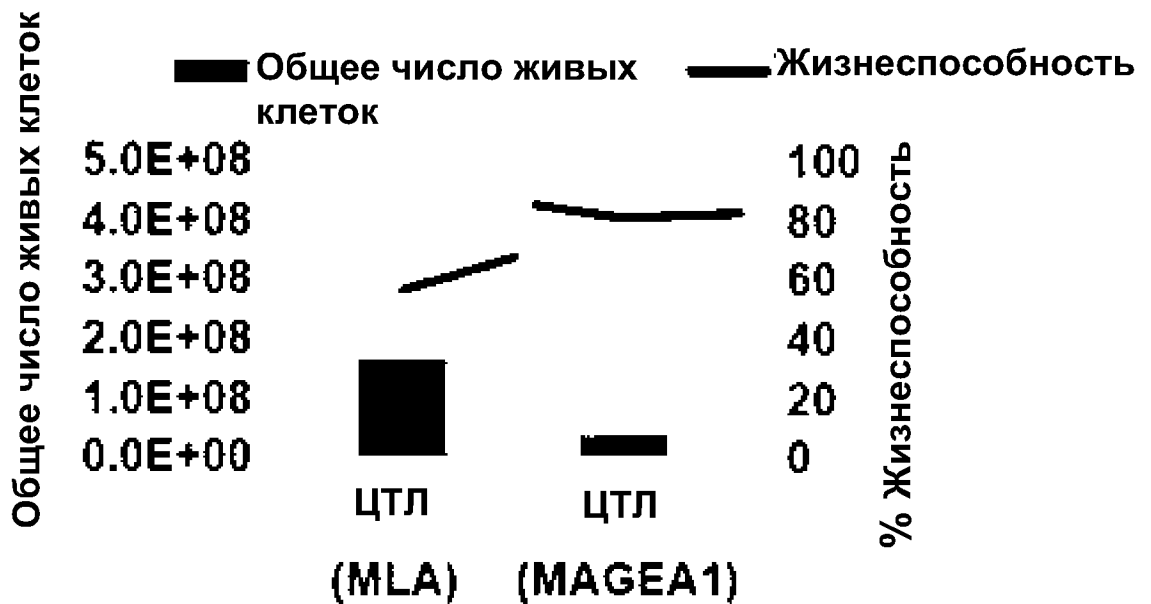


ФИГ. 13

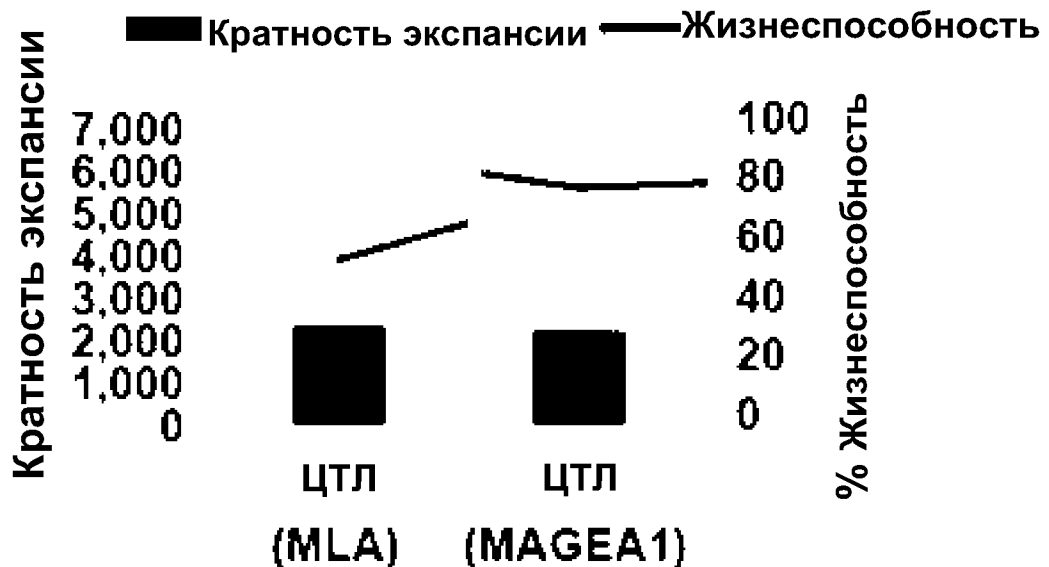


ФИГ. 14

REP1: Общее число живых клеток

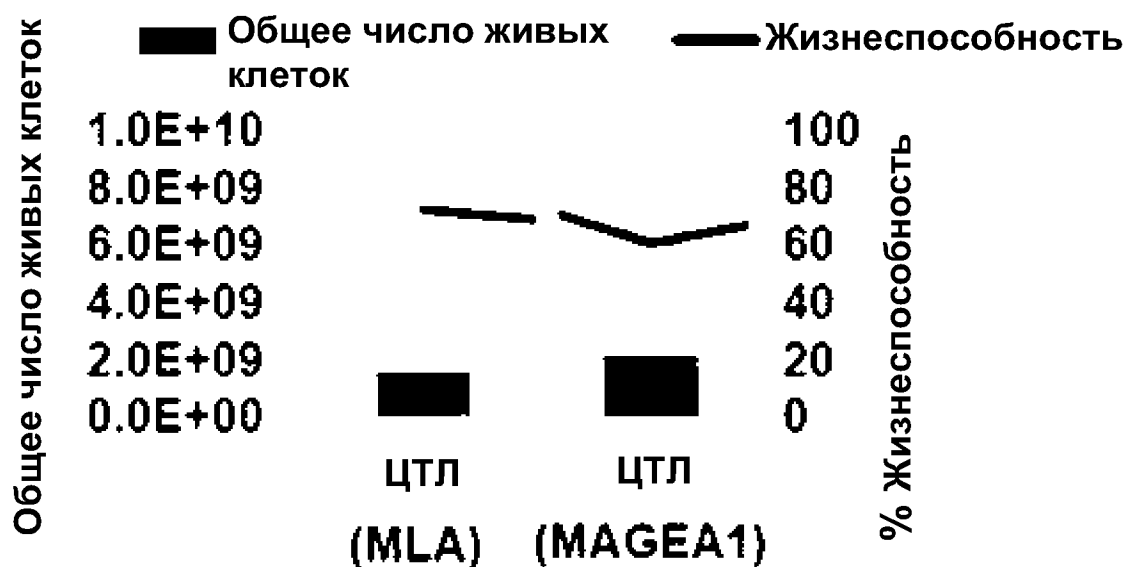


REP1: Кратность экспансии

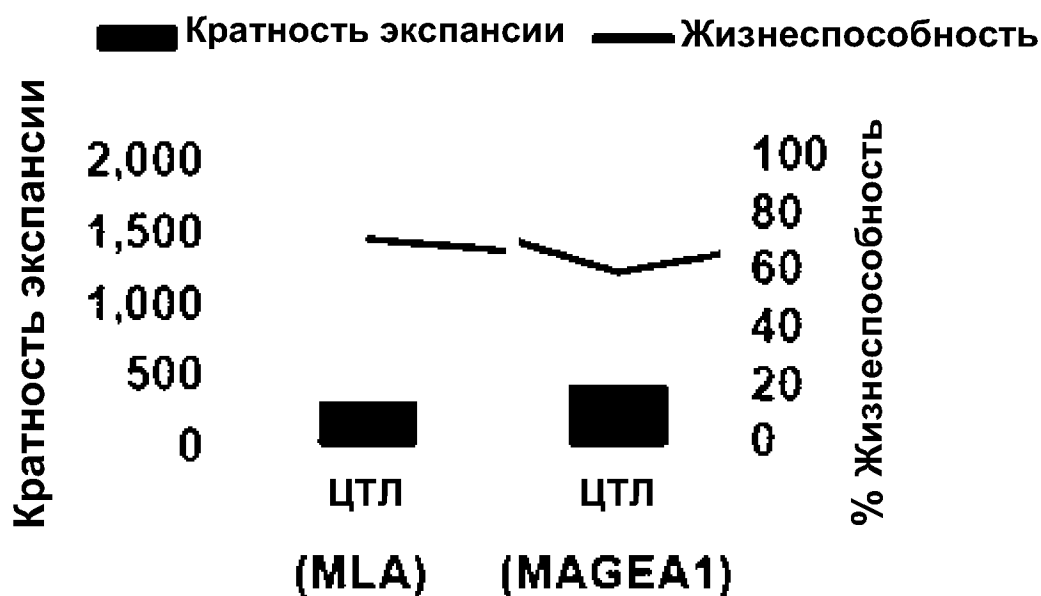


ФИГ. 15А

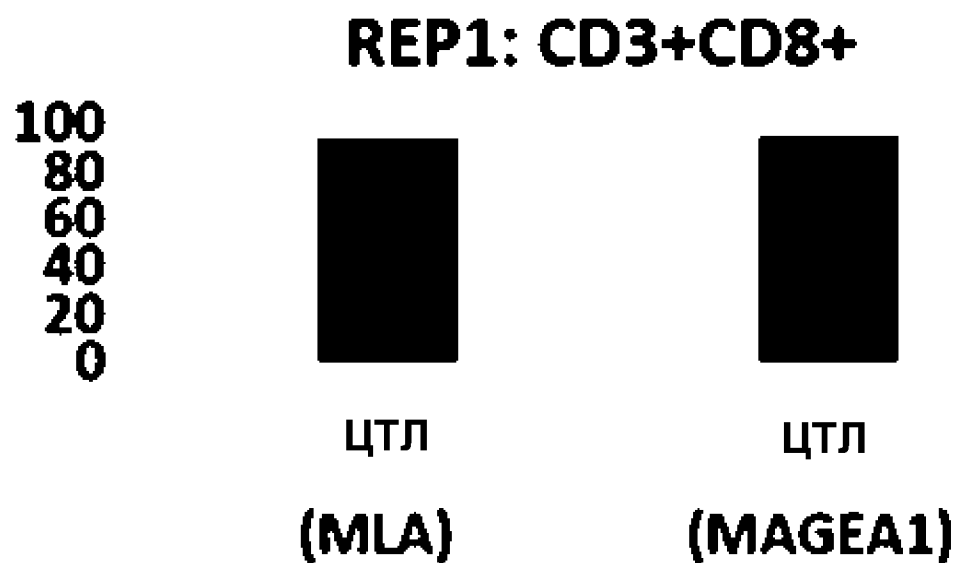
REP2: Общее число живых клеток



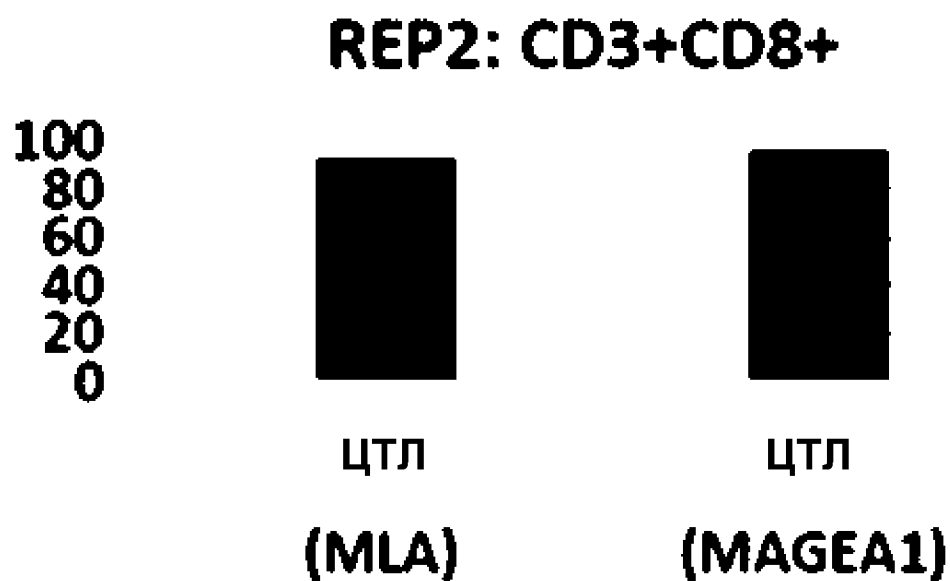
REP2: Кратность экспансии



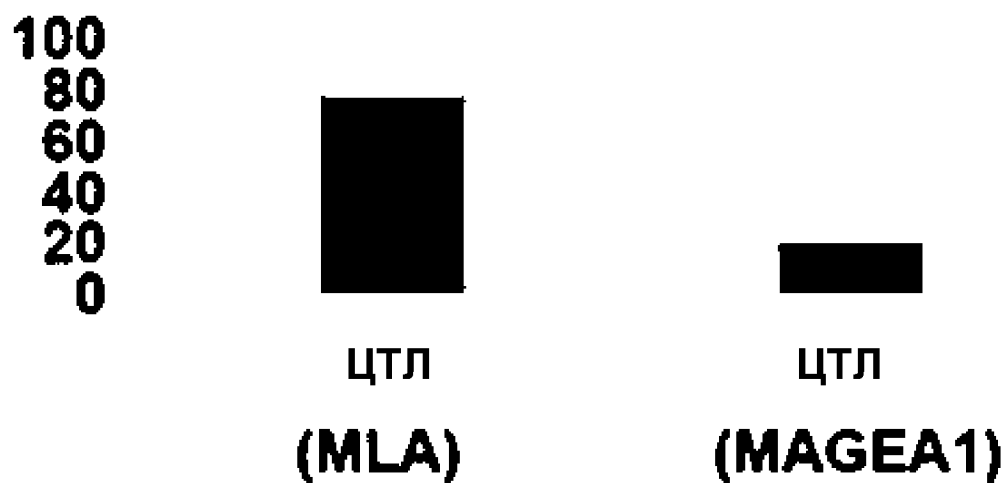
ФИГ. 15В



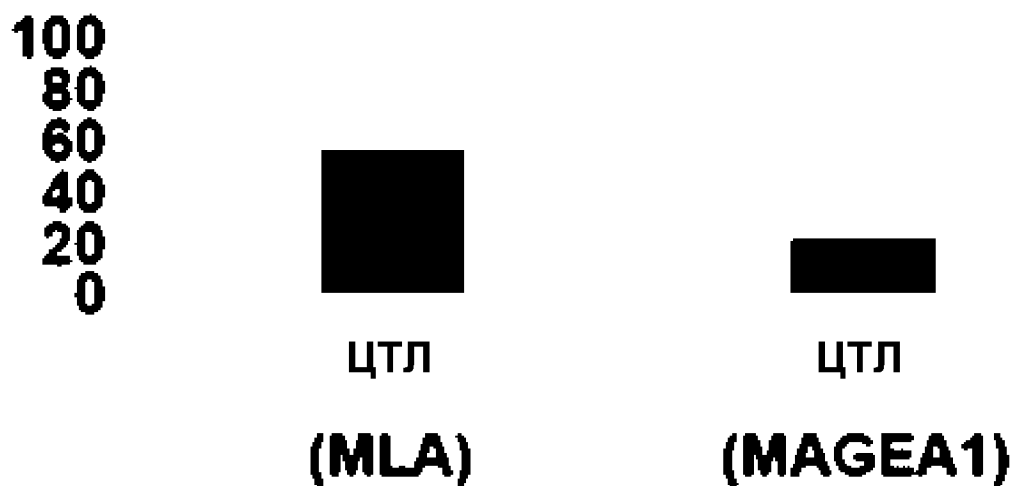
ФИГ. 16А



ФИГ. 16В

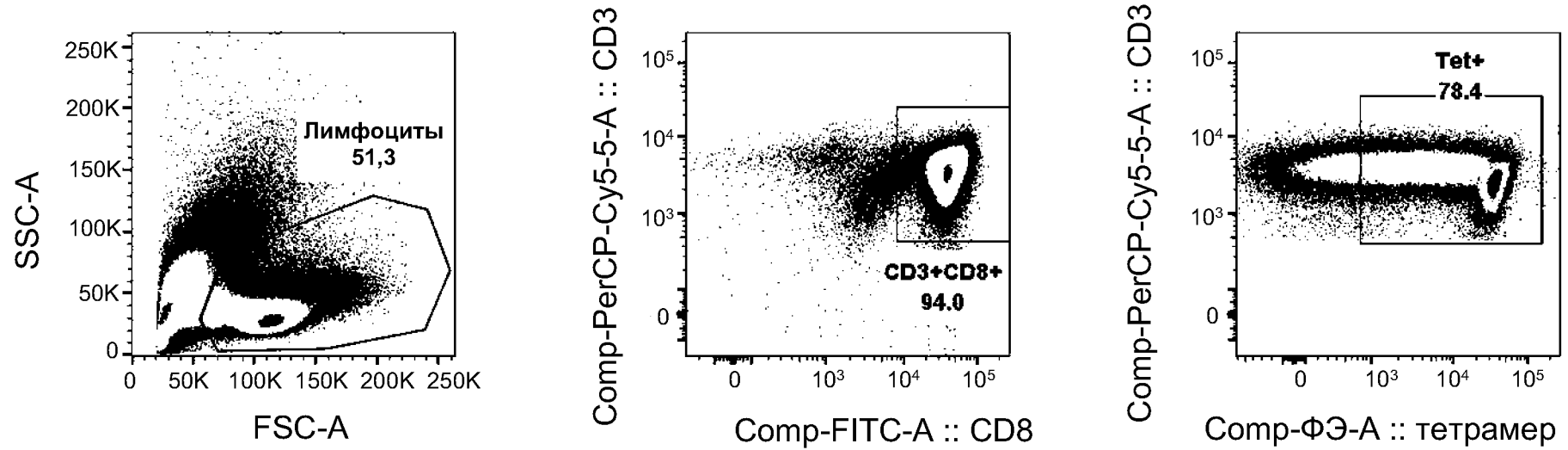
REP1: CD8+Tet+

ФИГ. 17А

REP2: CD8+Tet+

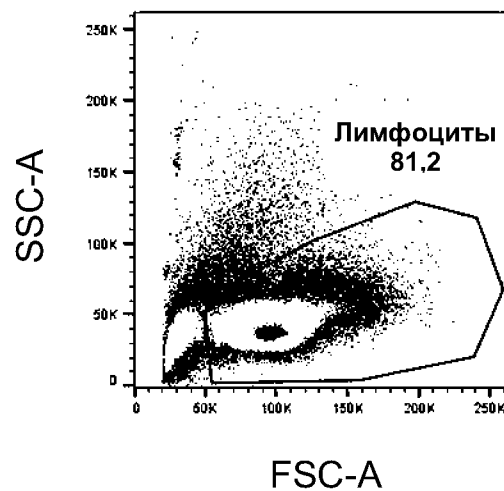
ФИГ. 17В

REP1

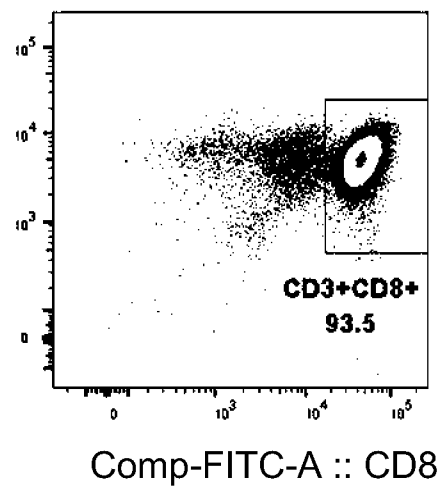


MLA (ЦТЛ)

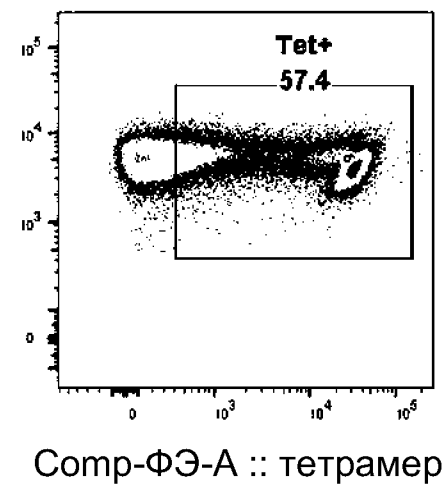
ФИГ. 18А



Comp-PerCP-Cy5-5-A :: CD3



Comp-PerCP-Cy5-5-A :: CD3

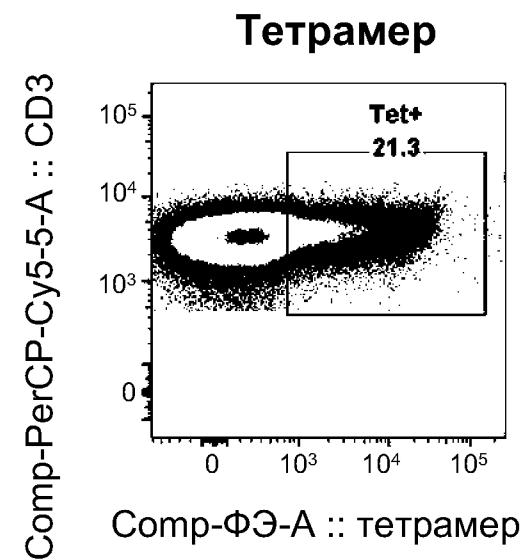
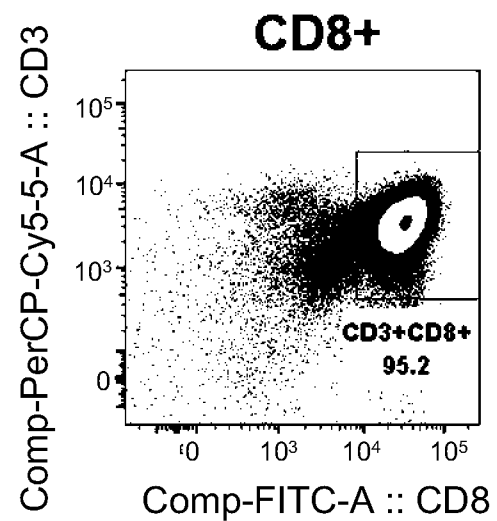
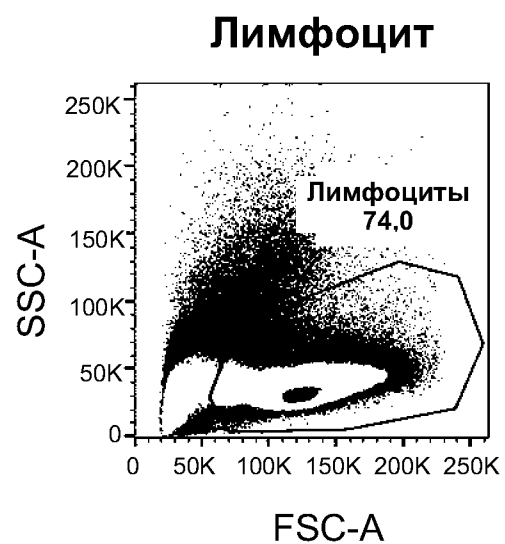


REP2

MLA (ЦТЛ)

ФИГ. 18В

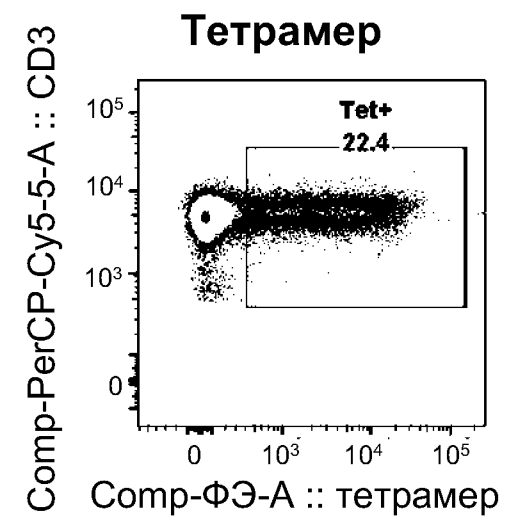
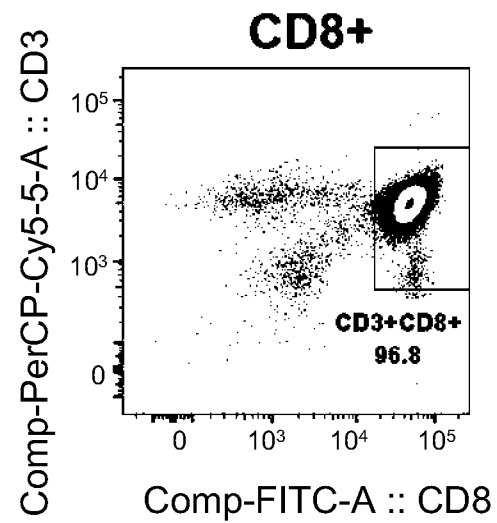
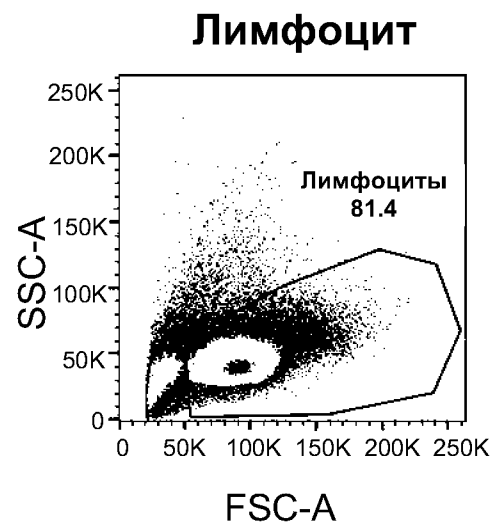
REP1



Ag001-02 (ЦТЛ)

ФИГ. 19А

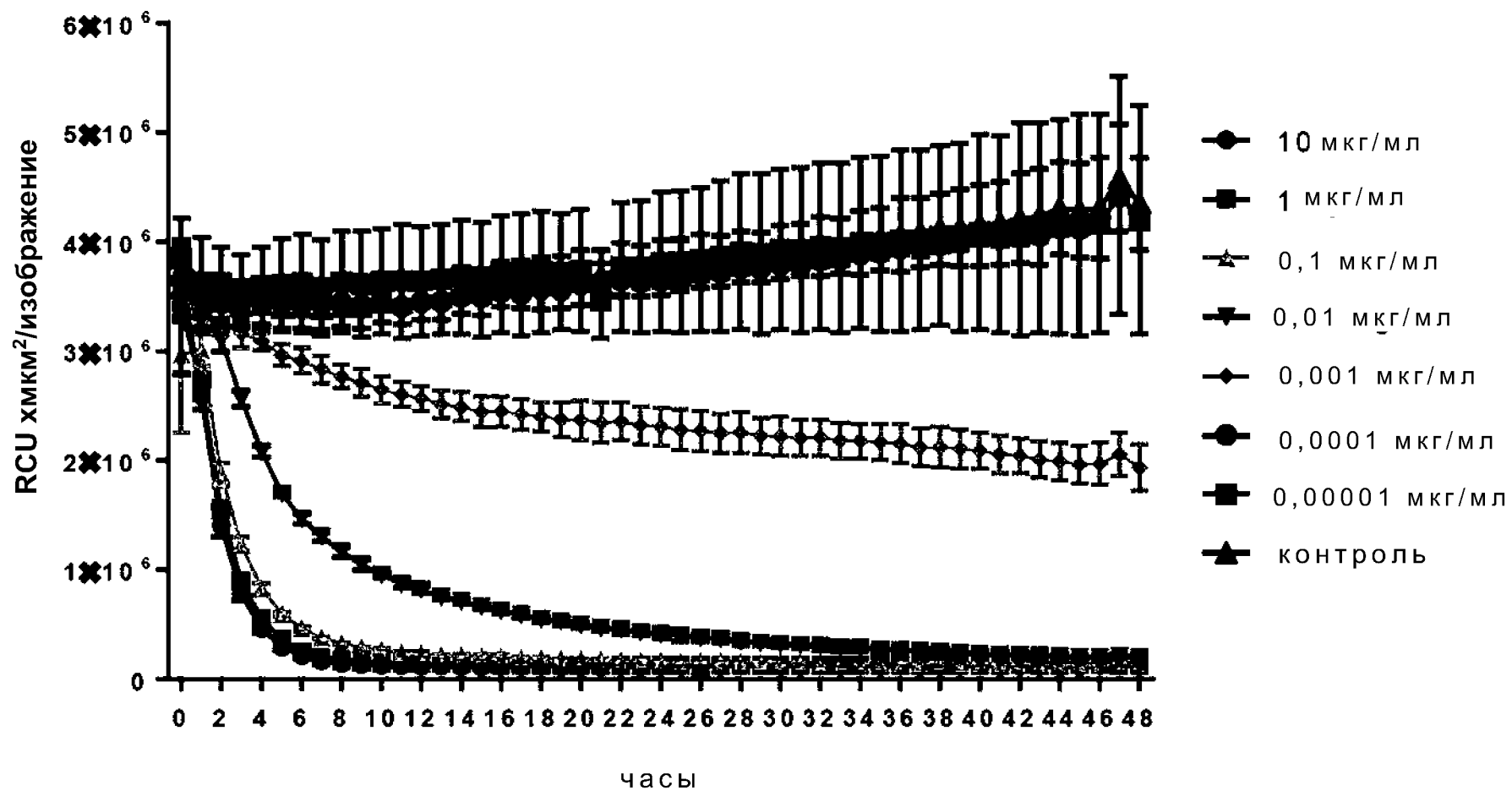
REP2



Ag001-02 (ЦТЛ)

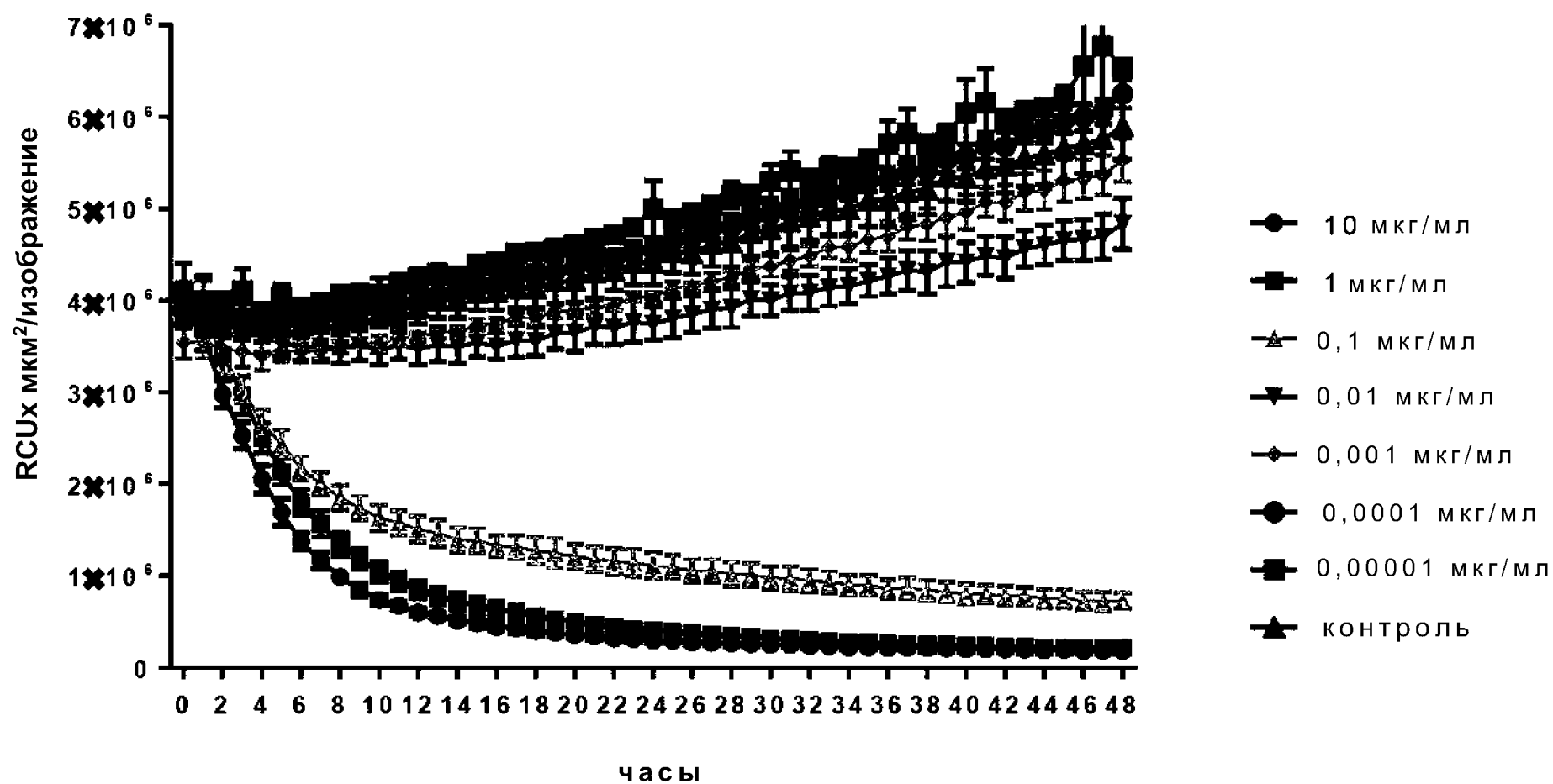
ФИГ. 19В

MLA ЦТЛ контроль

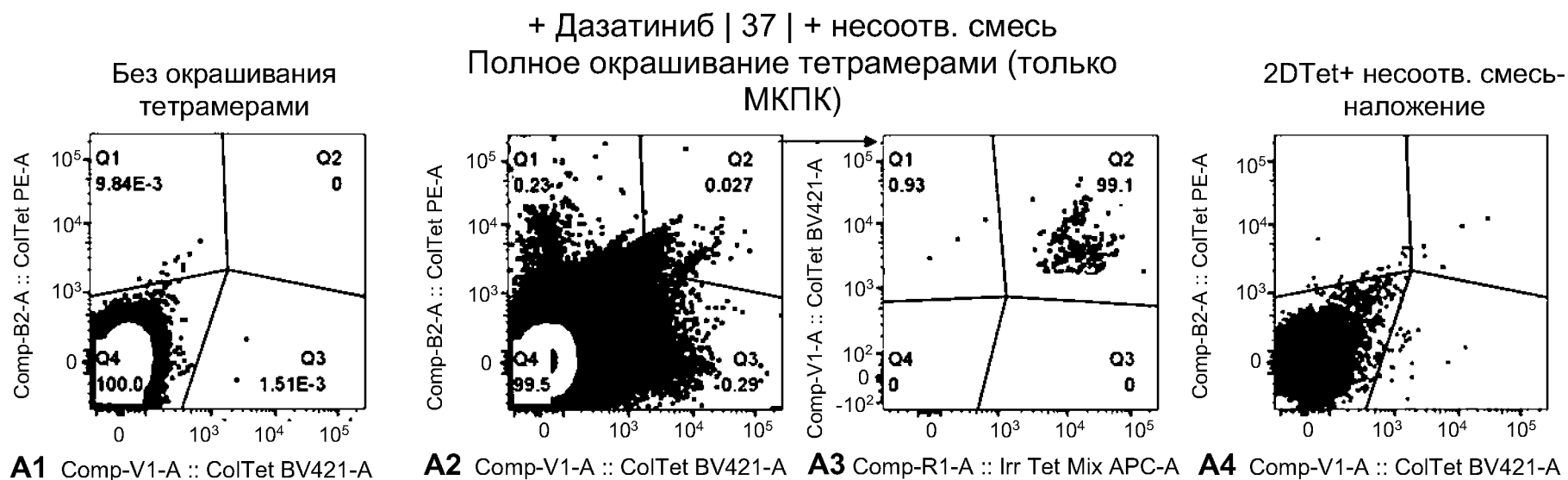


ФИГ. 20А

MAGEA1 ЦТЛ контроль

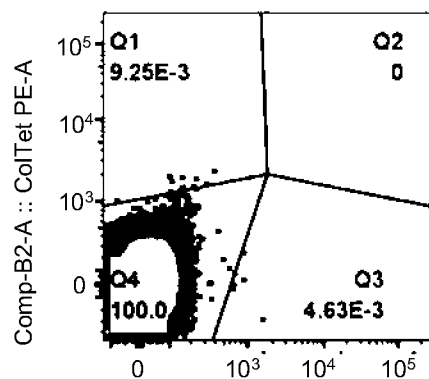


ФИГ. 20В

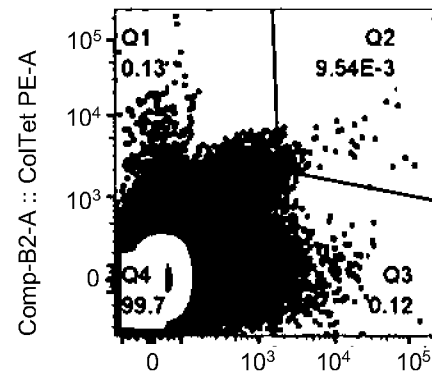


ФИГ. 21А

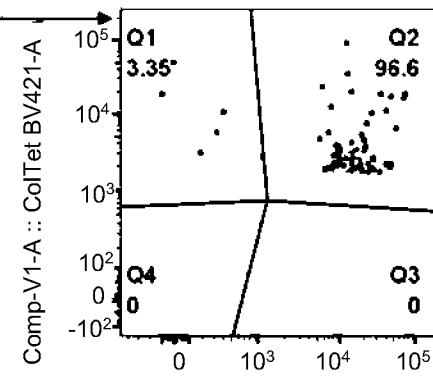
Дазатиниб | КТ | несоотв. смесь



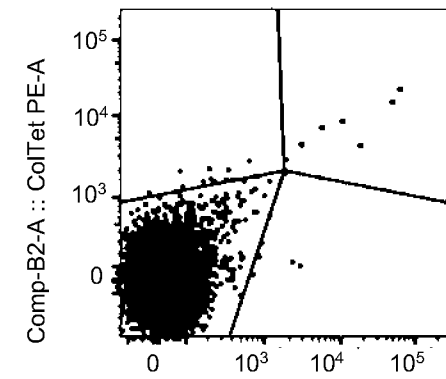
B1 Comp-V1-A :: ColTet BV421-A



B2 Comp-V1-A :: ColTet BV421-A



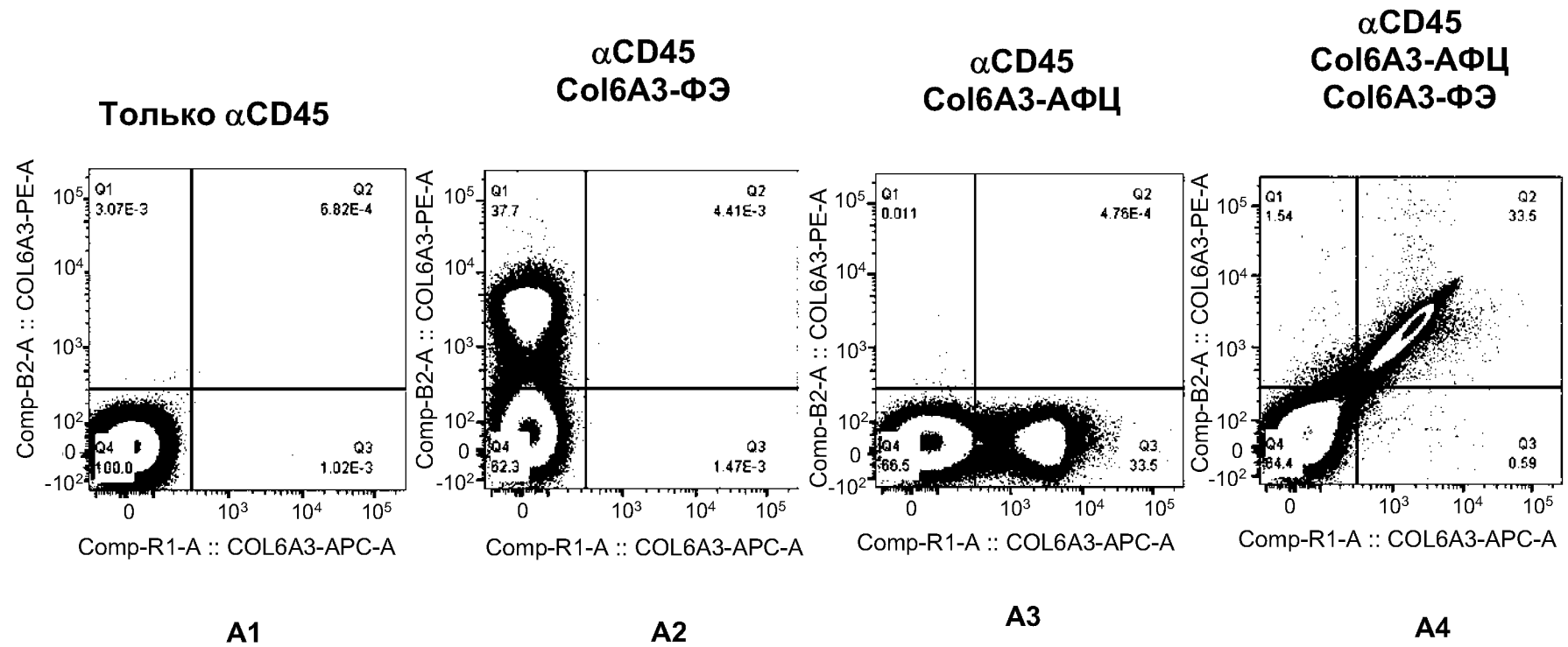
B3 Comp-R1-A :: Irr Tet Mix APC-A



B4 Comp-V1-A :: ColTet BV421-A

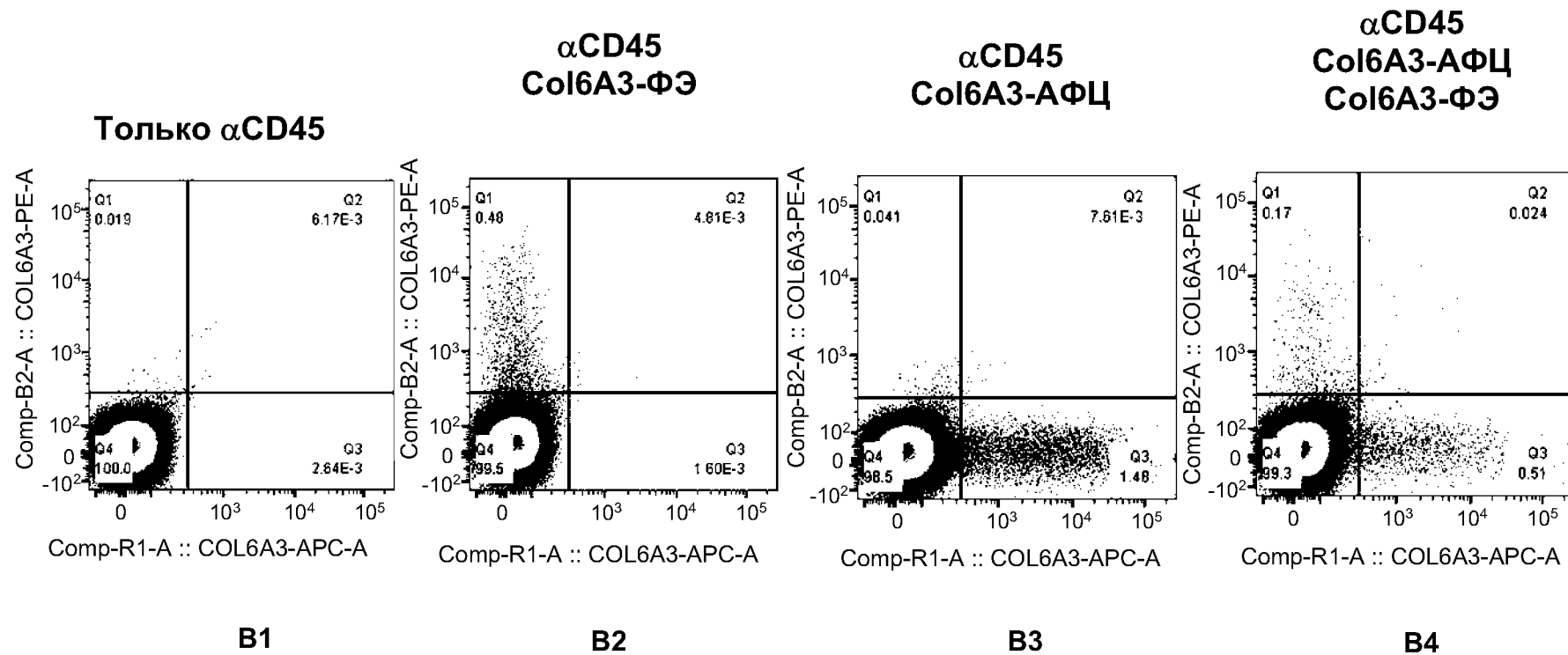
ФИГ. 21В

α Col6A3 Т-клетки



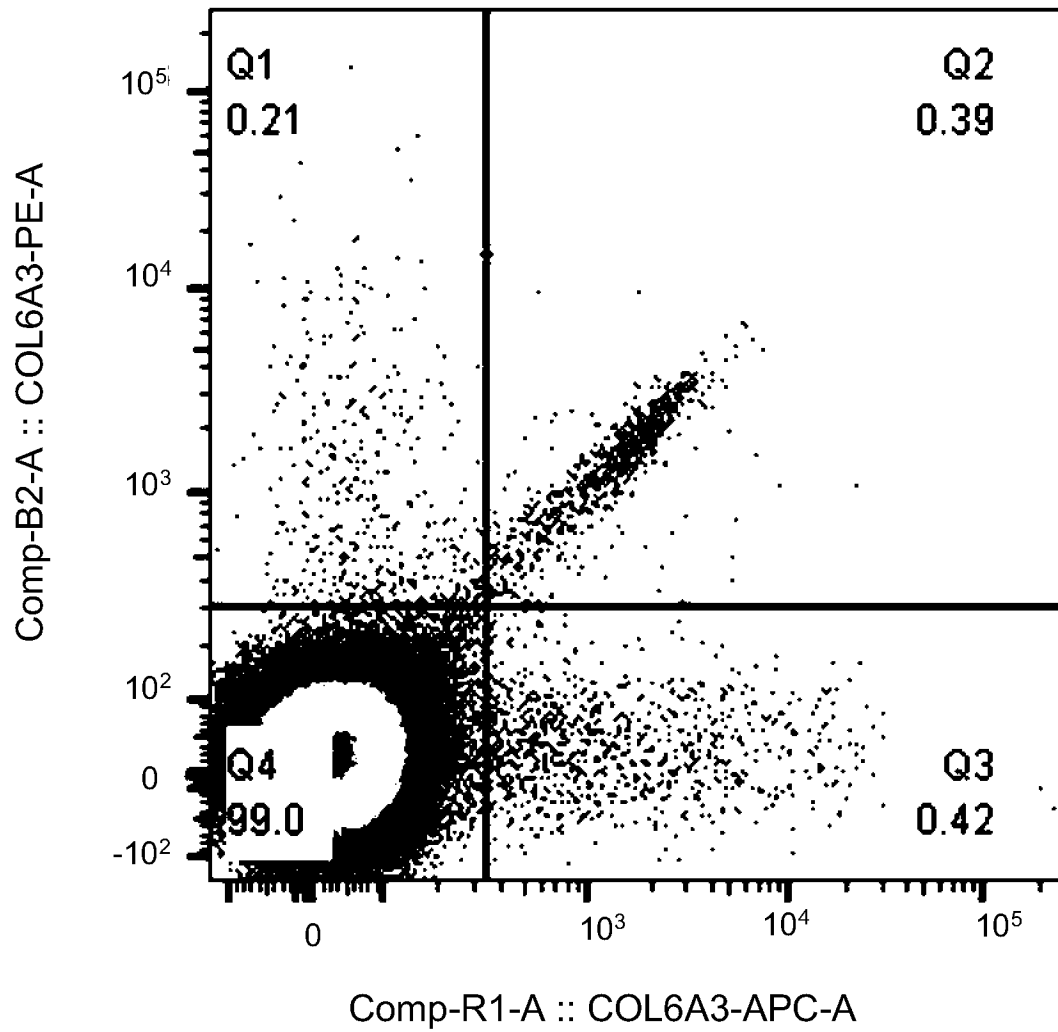
ФИГ. 22А

α MLA Т-клетки



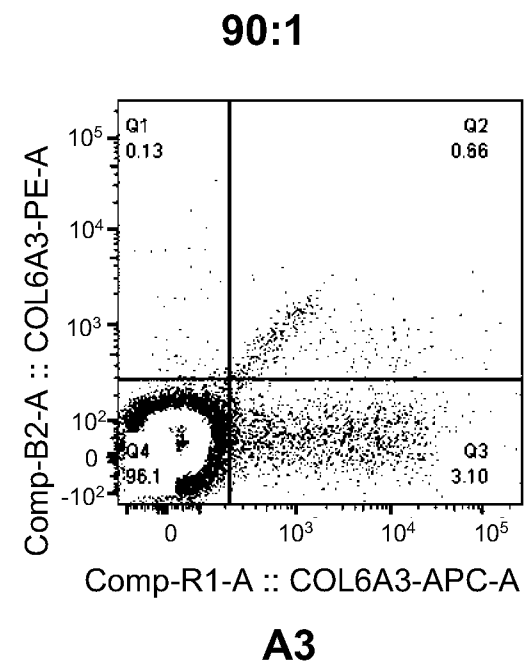
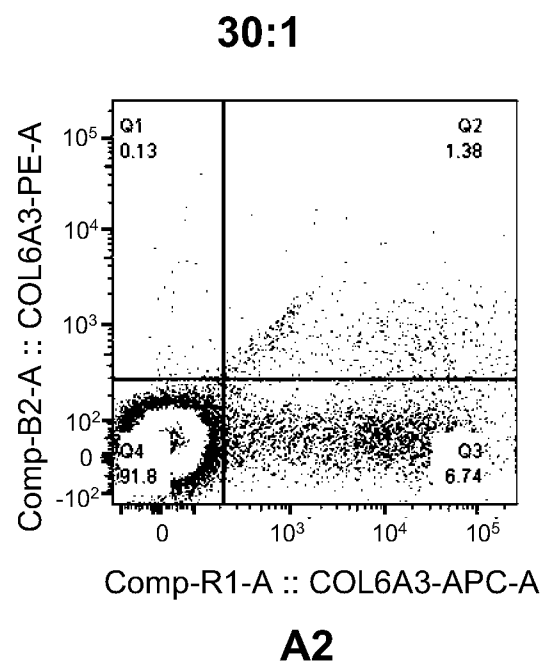
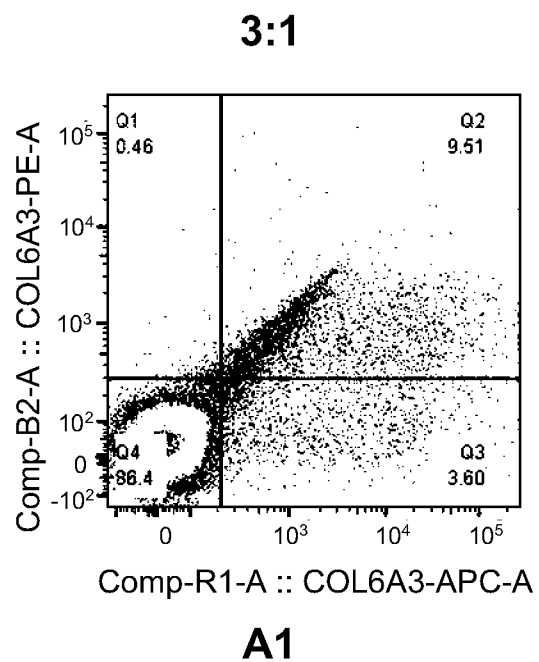
ФИГ. 22В

**Смесь 10:1 окрашенных MLA
Т-клеток с окрашенными
Col6A3 Т-клетками**



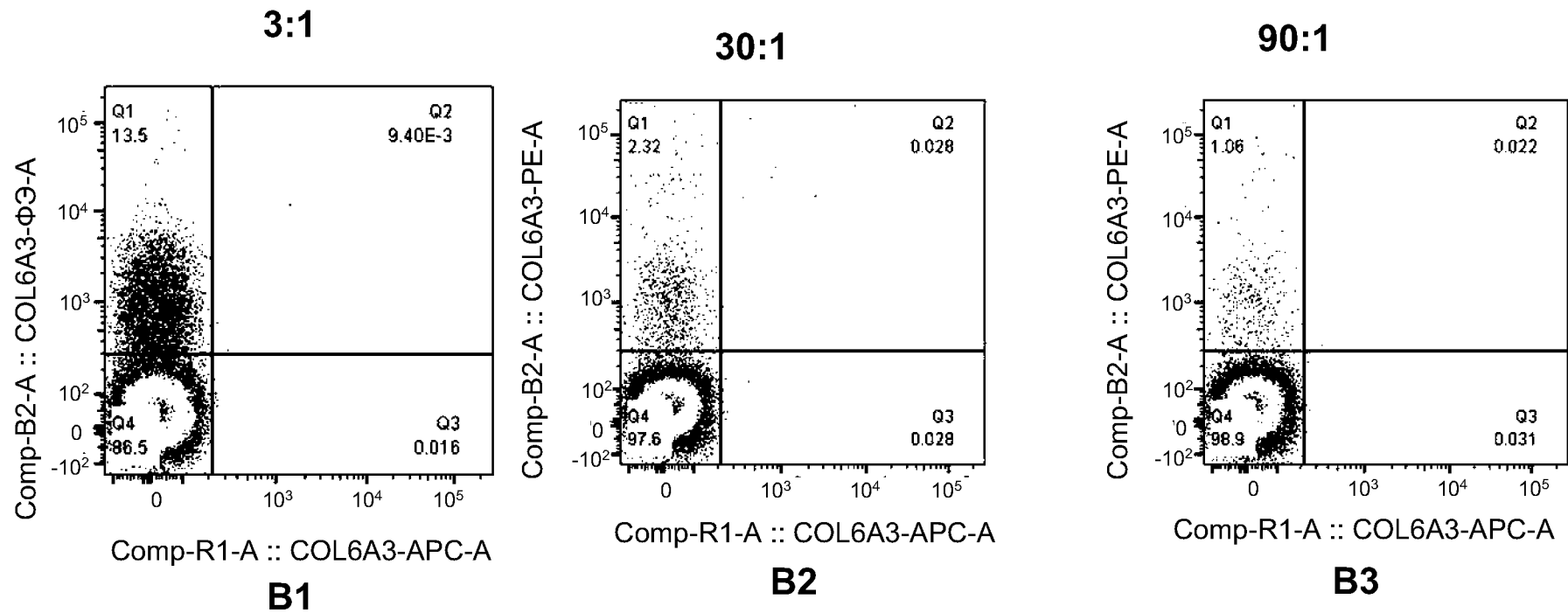
ФИГ. 22С

α CD45
Col6A3-АФЦ и ФЭ

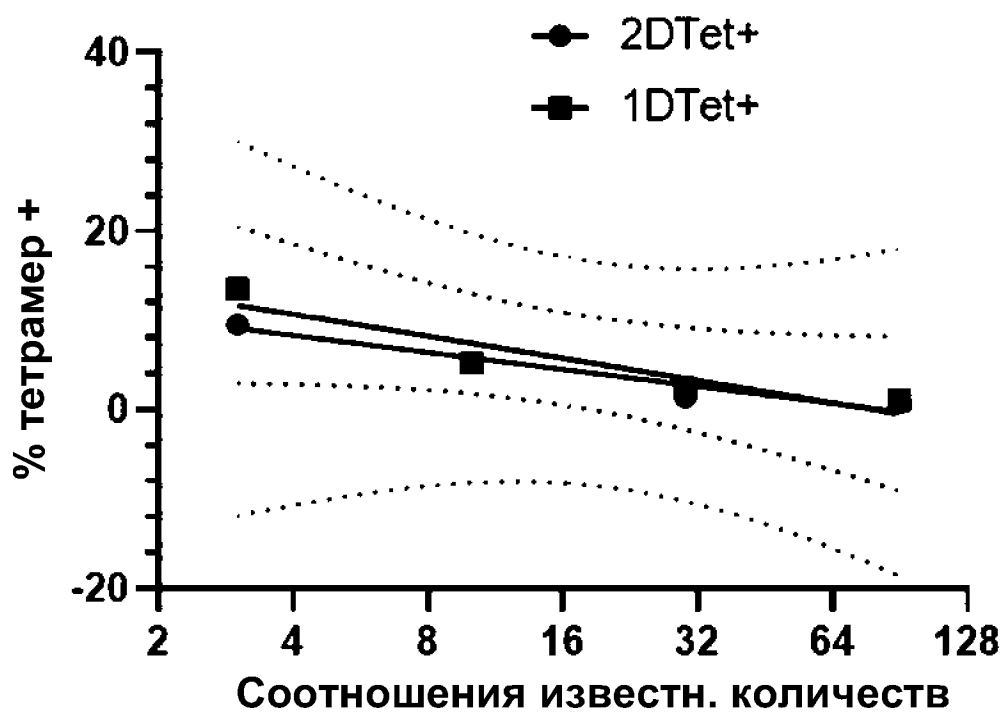


ФИГ. 23А

α CD45
Col6A3-ФЭ



ФИГ. 23В

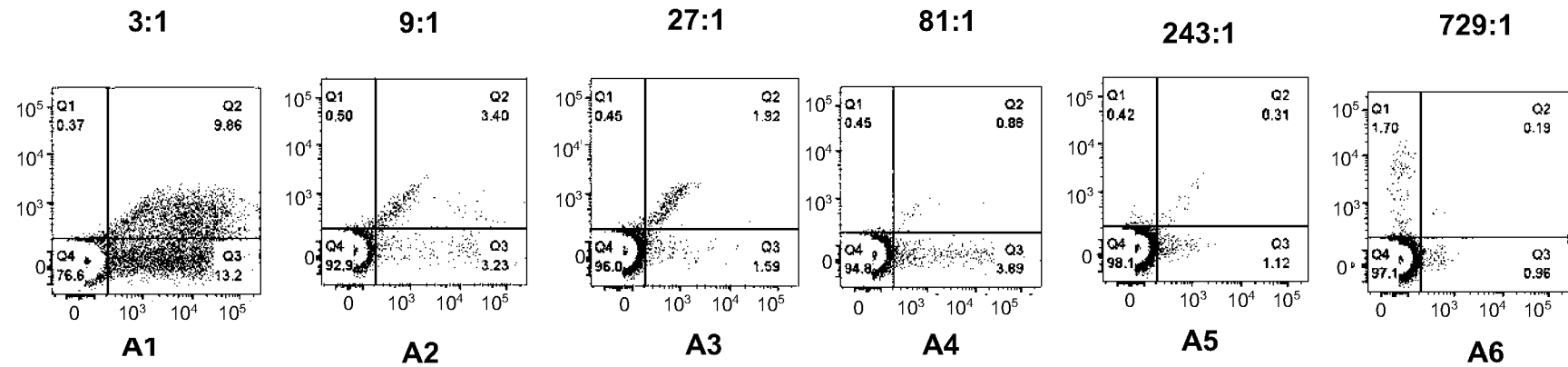


	2DTet+	1DTet+
R-квадрат	0,9394	0,8756

ФИГ. 23С

Comp-B2-A :: Col6A3-ФЭ-А

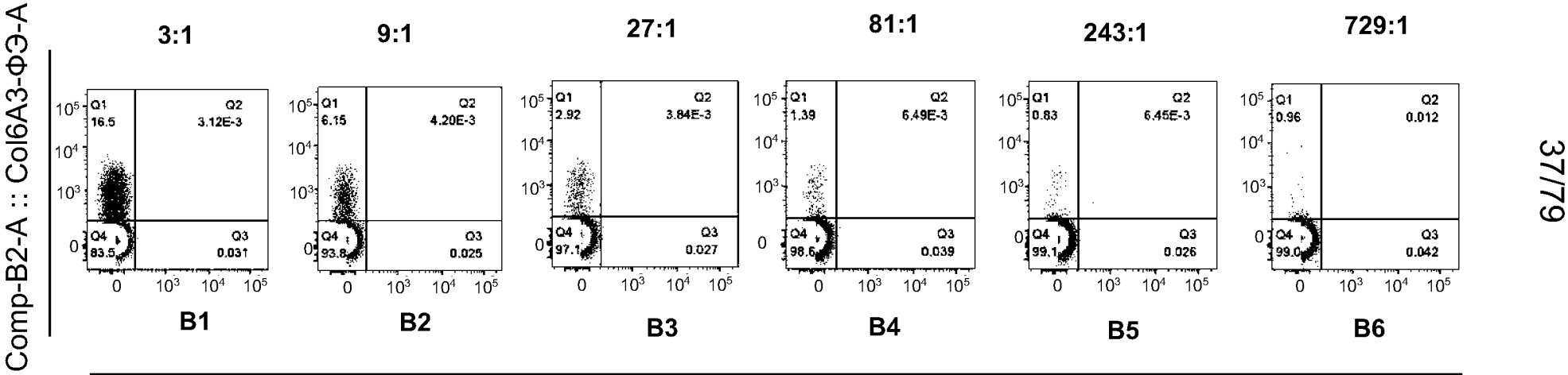
α CD45
Col6A3-АФЦ и ФЭ



Comp-R1-A :: COL6A3-APC-A

ФИГ. 24А

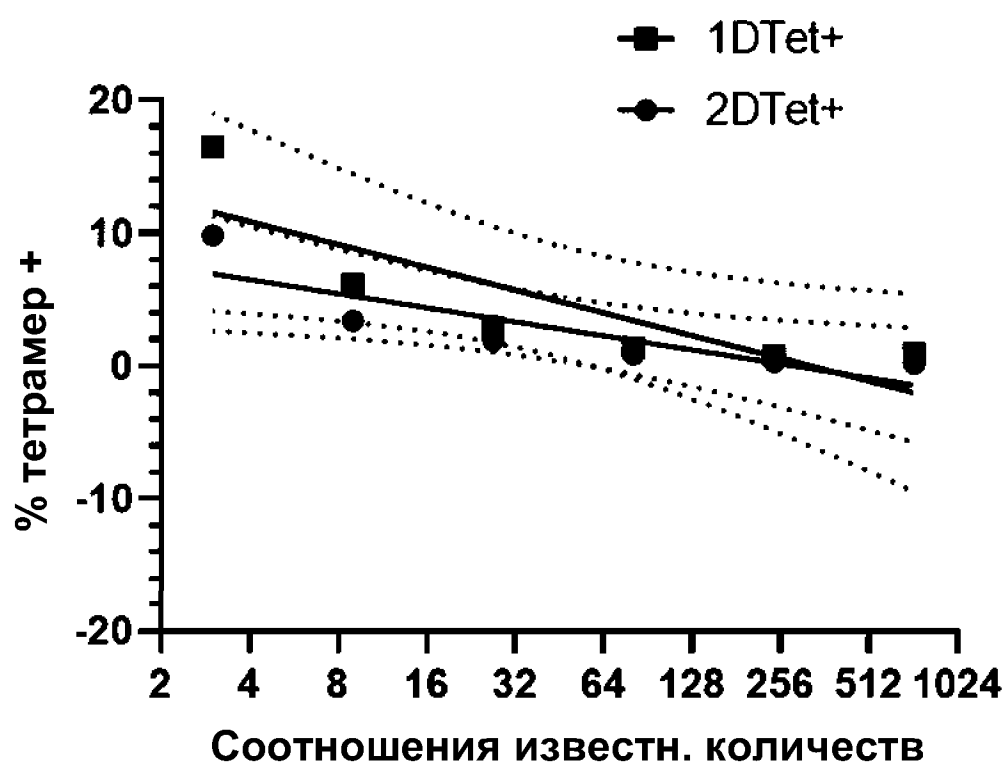
α CD45
Col6A3-ФЭ



Comp-R1-A :: COL6A3-APC-A

ФИГ. 24В

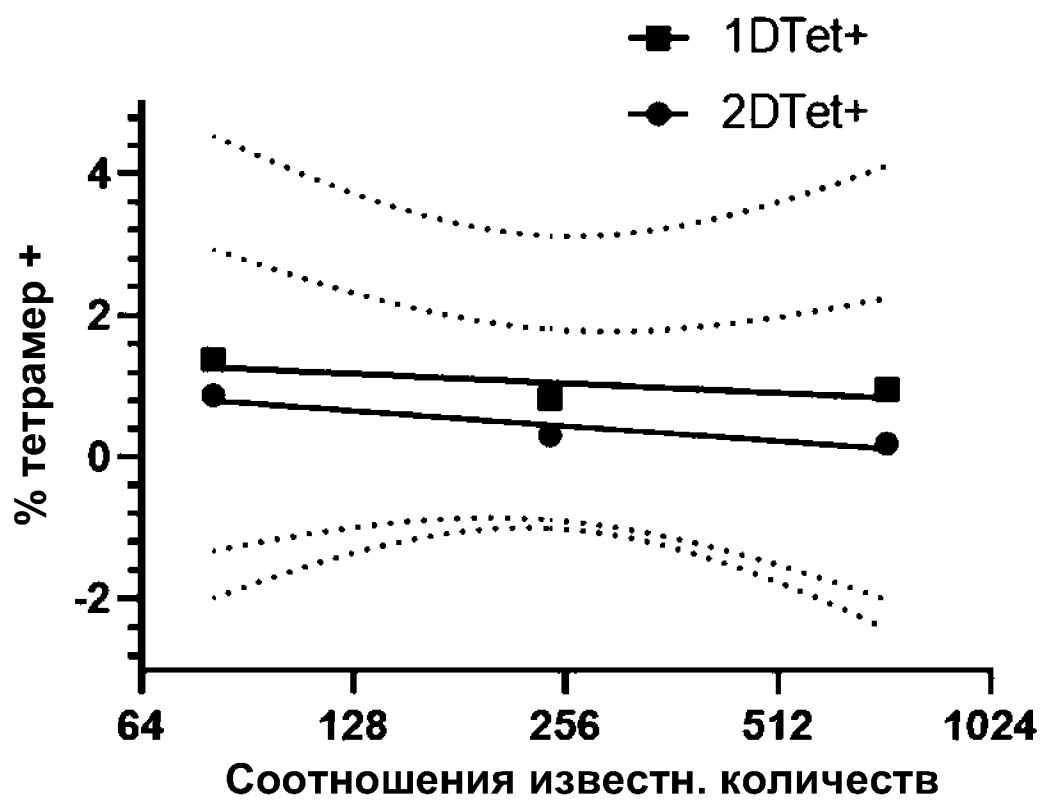
Все разведения



	2DTet+	1DTet+
R-квадрат	0,7265	0,7021

ФИГ. 24С

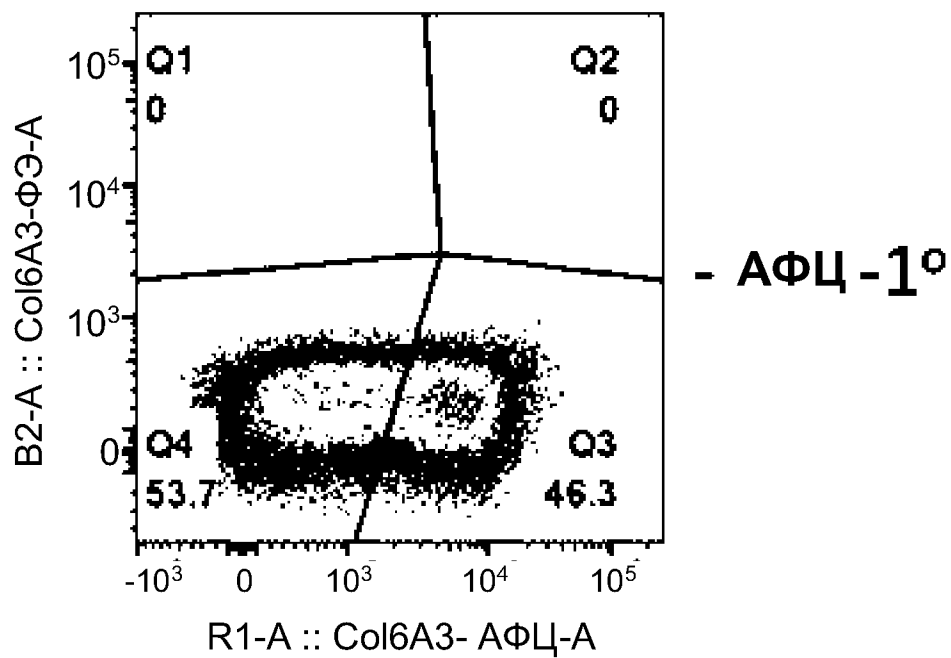
Низкие разведения



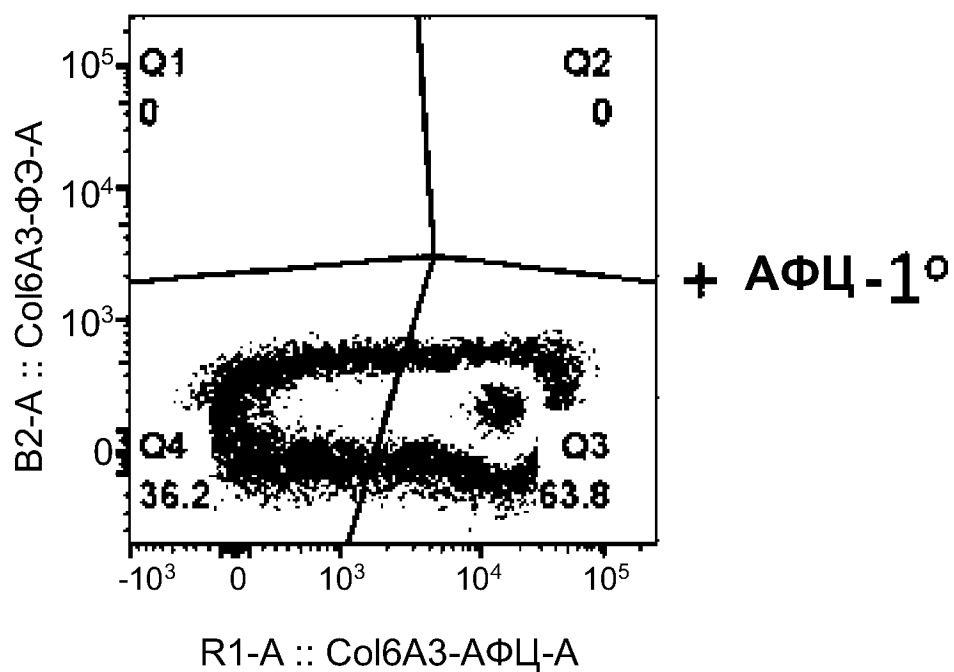
	2DTet+	1DTet+
R-квадрат	0,8758	0,5381

ФИГ. 24D

A1 **α COL6A3 Т-клетки**
APC-Tet



A2

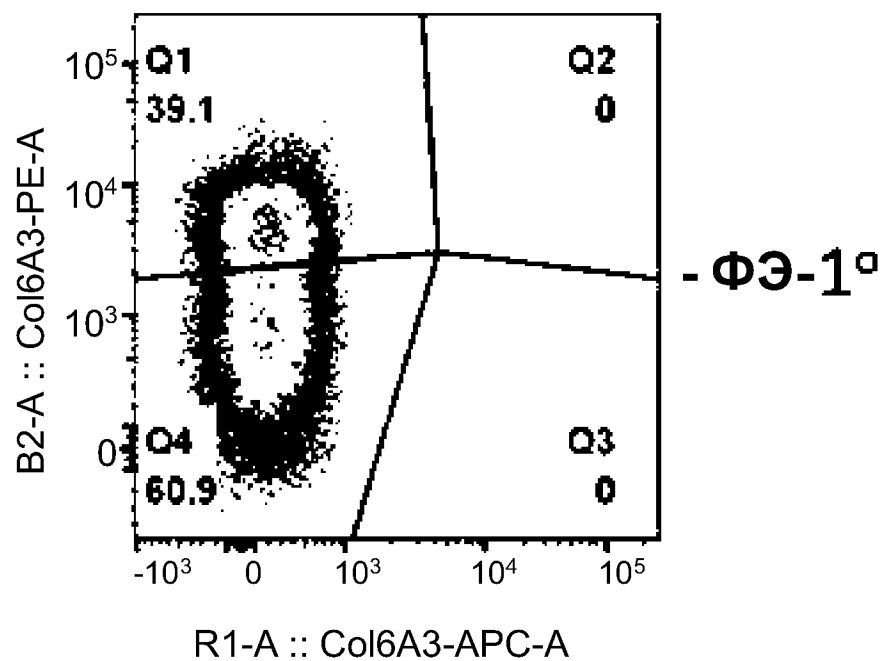


ФИГ. 25А

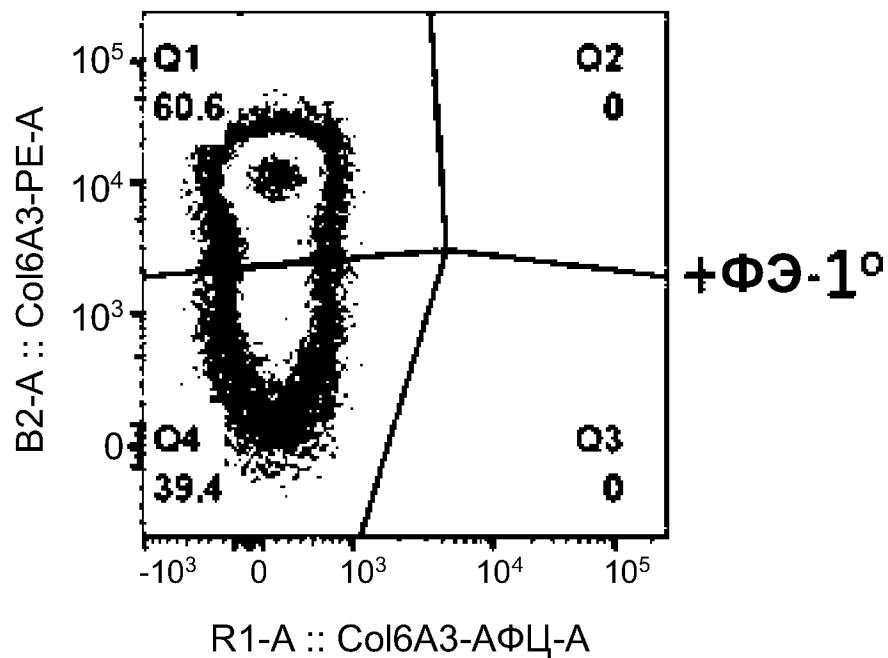
B1

 α COL6A3 T-клетки

PE-Tet



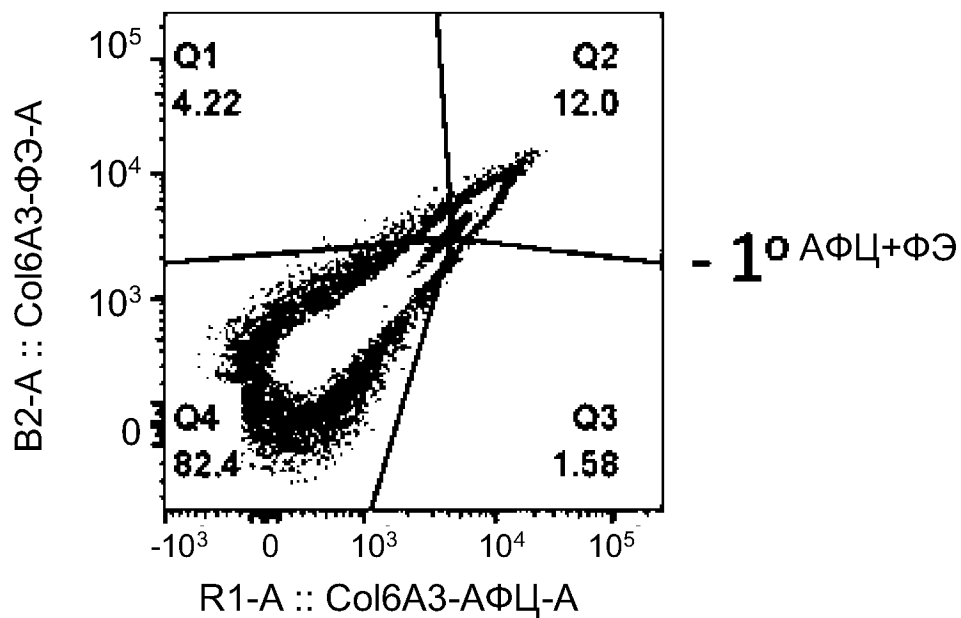
B2



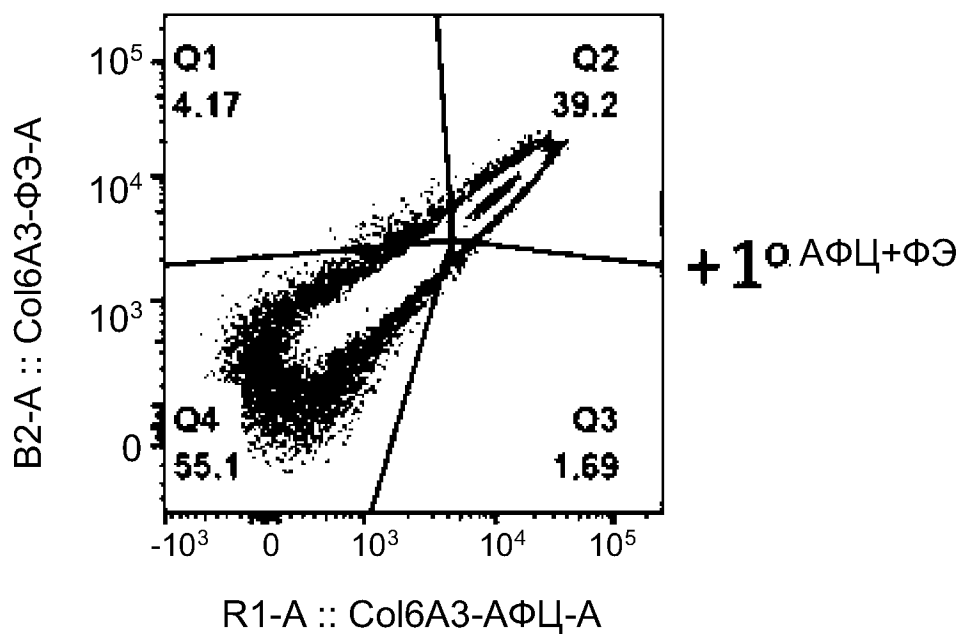
ФИГ. 25В

с1 α COL6A3 T-клетки

2DTet^{АФЦ+ФЭ}

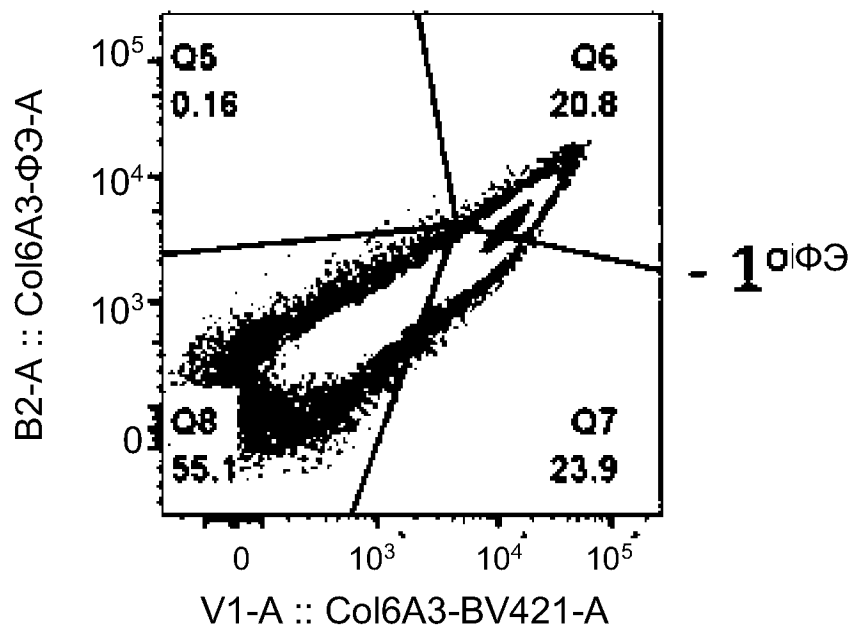


с2

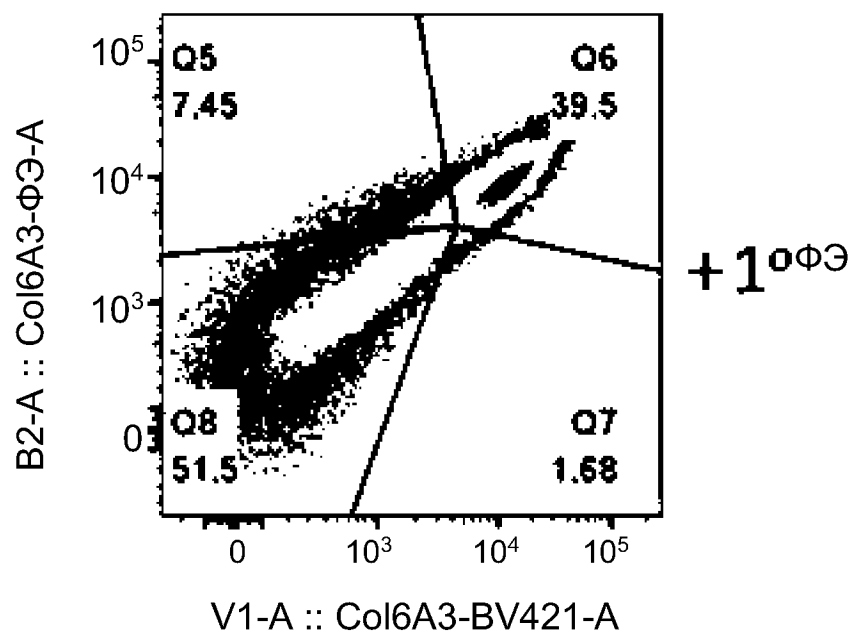


ФИГ. 25С

D1

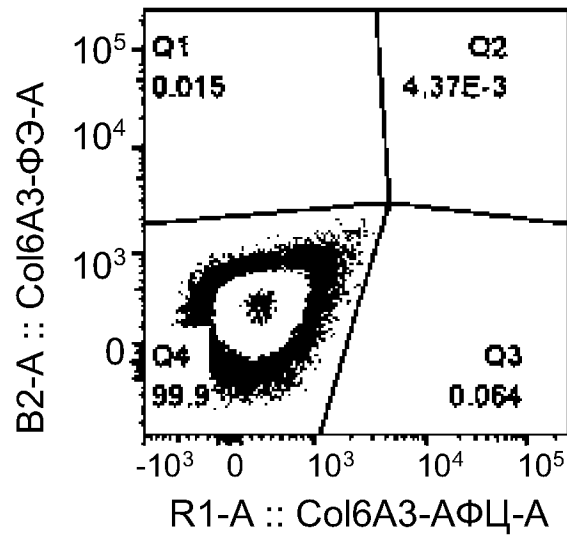
 α COL6A3 T-клетки2DTet^{BV421}+ФЭ

D2

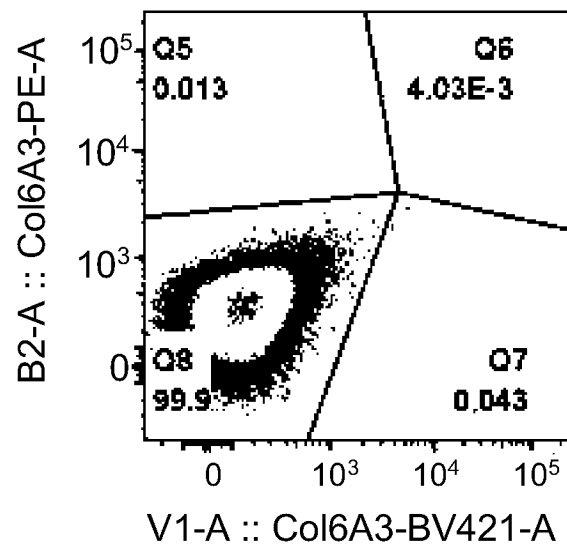


ФИГ. 25D

E1

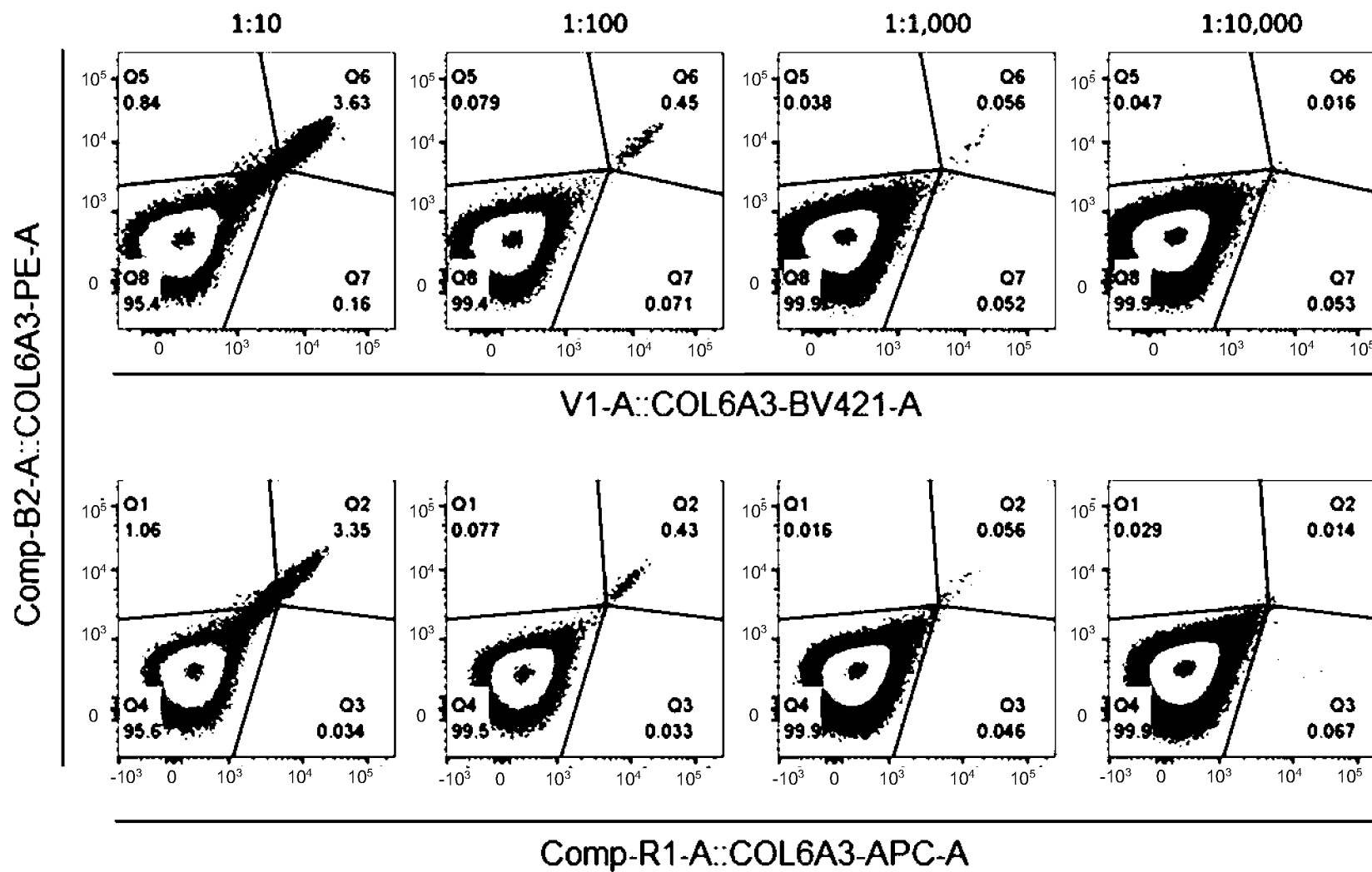
 α MLAT-клетки2DTet^{AФЦ+ФЭ} + 1^{oAФЦ+ФЭ}

E2

 α MLAT-клетки2DTet^{ФЭ+BV421} + 1^{ФЭ}

ФИГ. 25Е

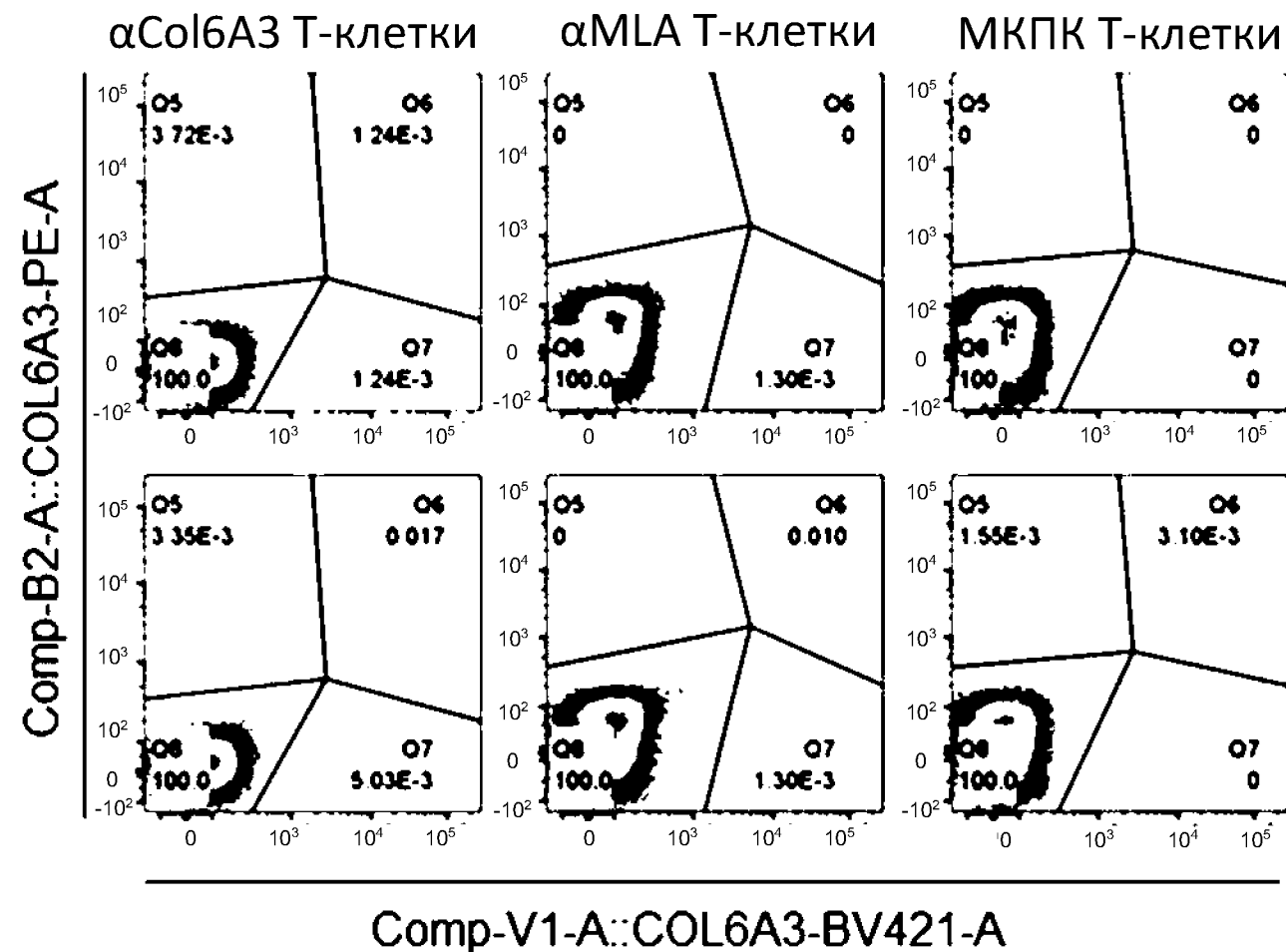
Добавка α Col6A3 в известн.кол-ве в α MLA T-клетки



ФИГ. 26

Без использования
суспензии молоко-в-
масле для
окрашивания
тетрамерами

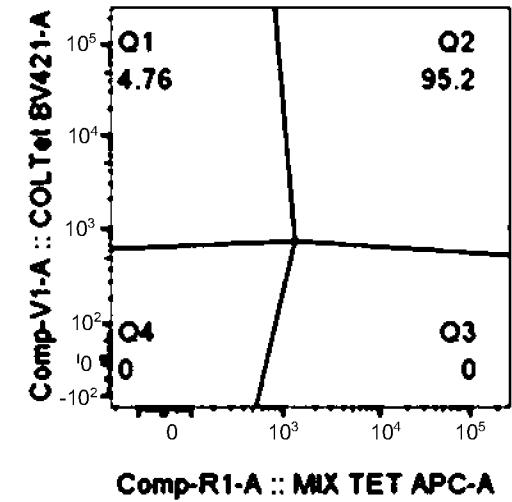
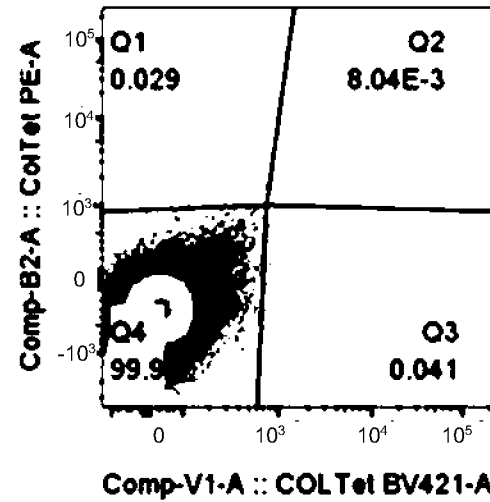
5% суспензия
молоко-в-масле для
окрашивания
тетрамерами



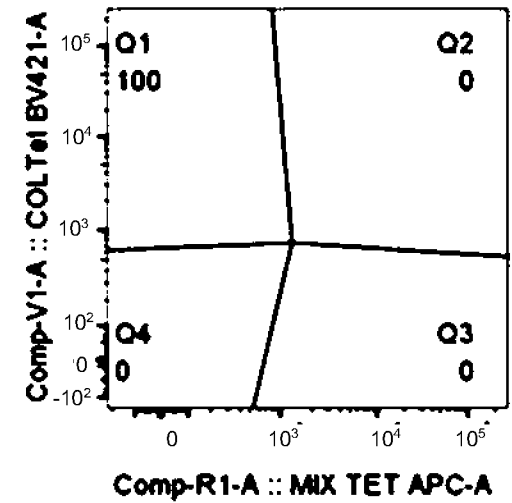
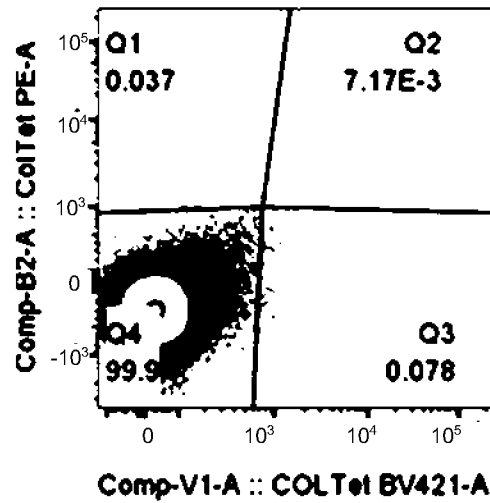
ФИГ. 27

Комнатная температура

С несоответств.
смесью

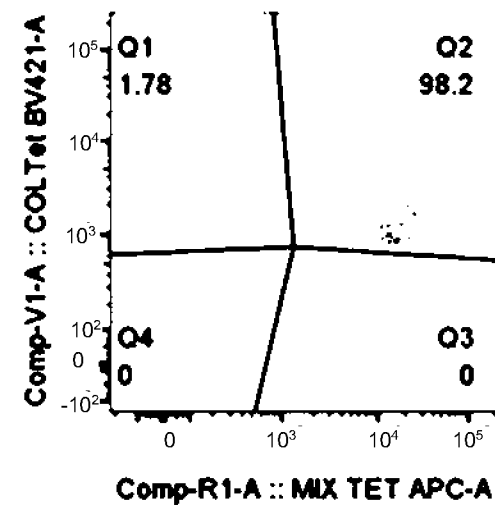
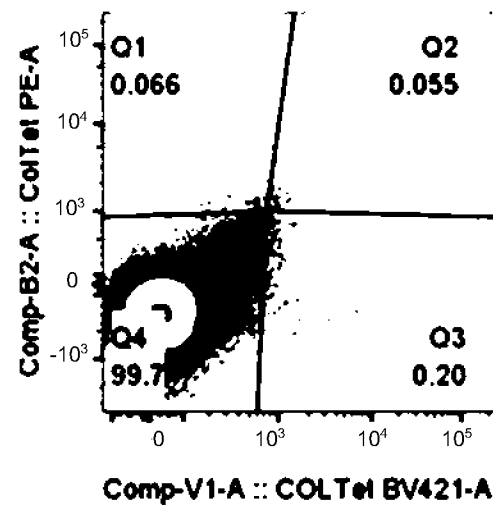


Без несоответств.
смеси

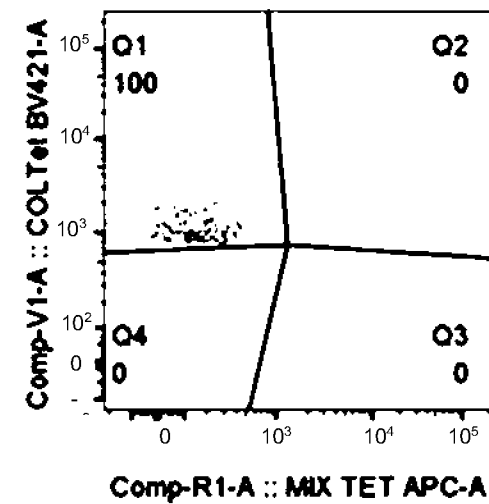
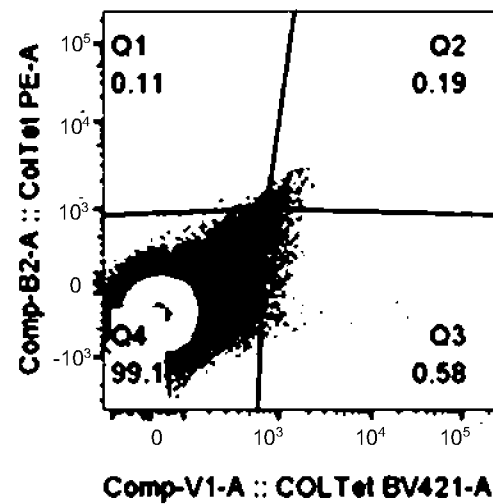


ФИГ. 28А

С несоответств.
смесью

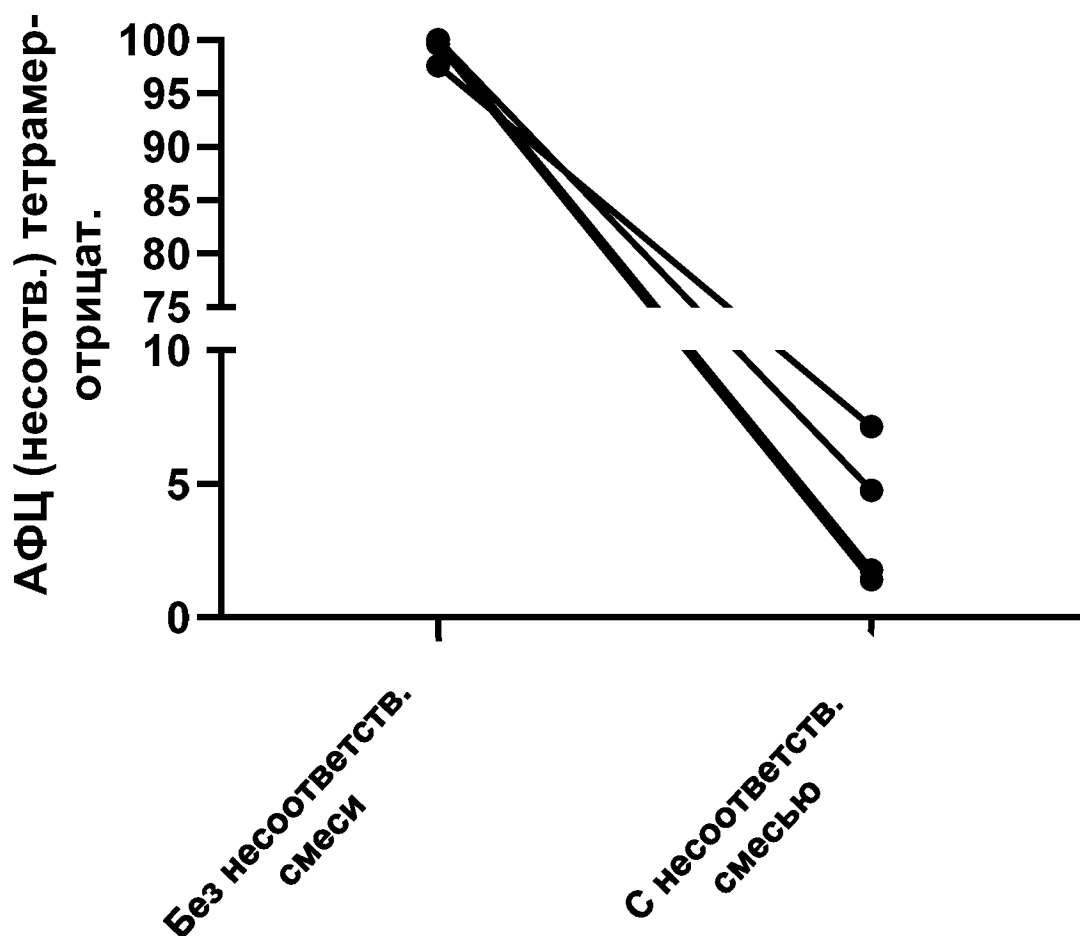


Без несоответств.
смеси



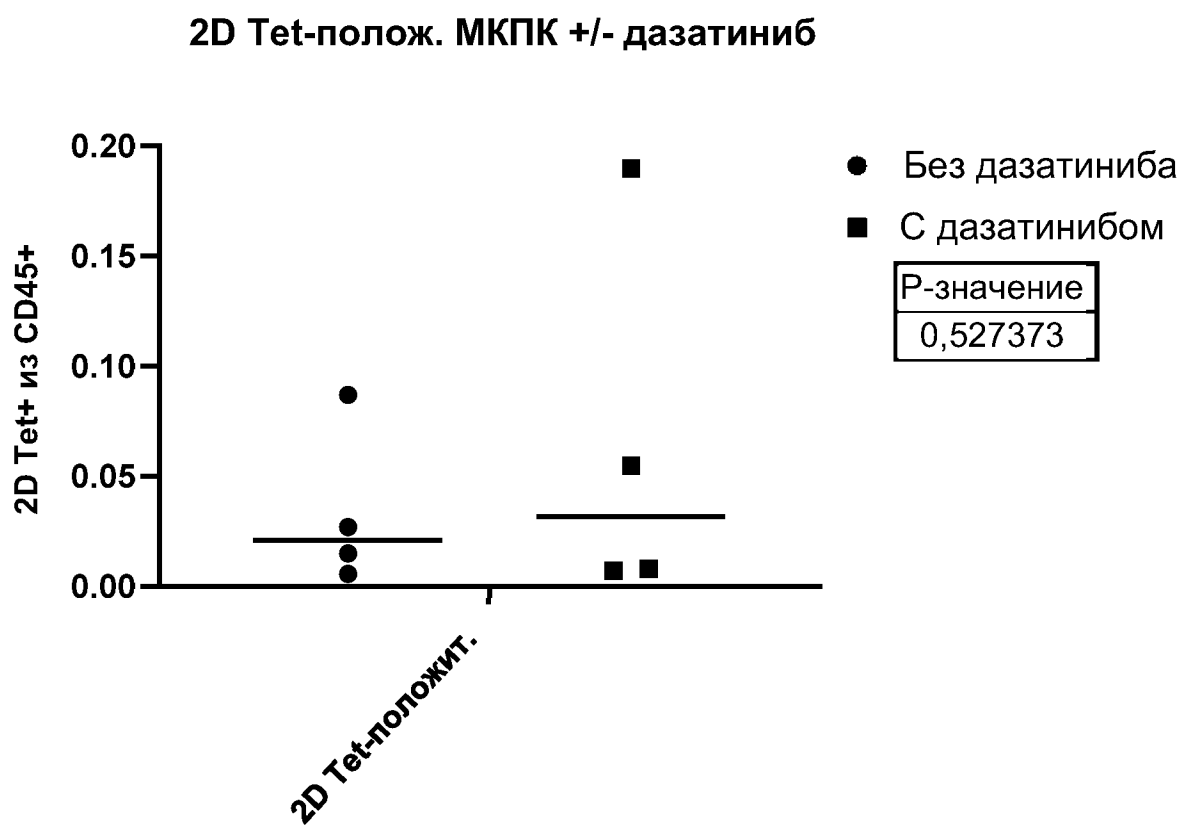
ФИГ. 28В

МКПК 2D Tet + смесь тетр. с несоотв. пепт. тетрамеров



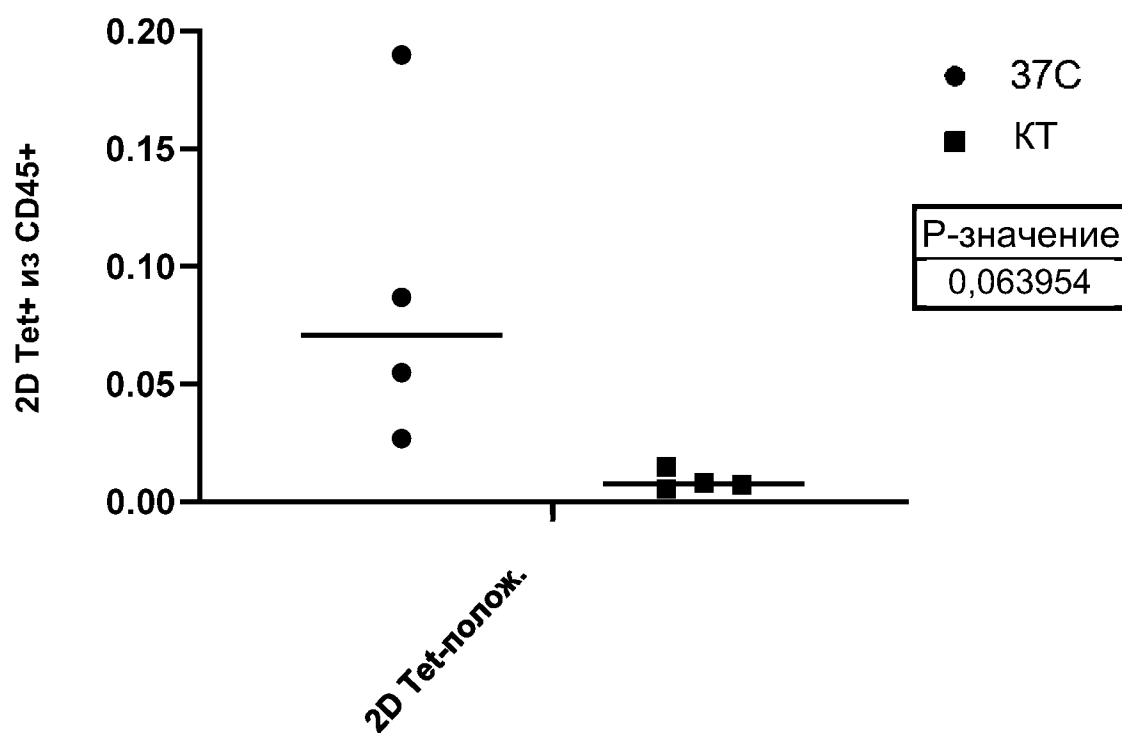
Условие	Среднее значение несоотв. тетрамер-отриц из 2D Tet-положит
Без несоотв. смеси	99.3% (+/- 1.14)
С несоотв. смесью	3.77% (+/- 2.7)

ФИГ. 28С



ФИГ. 29

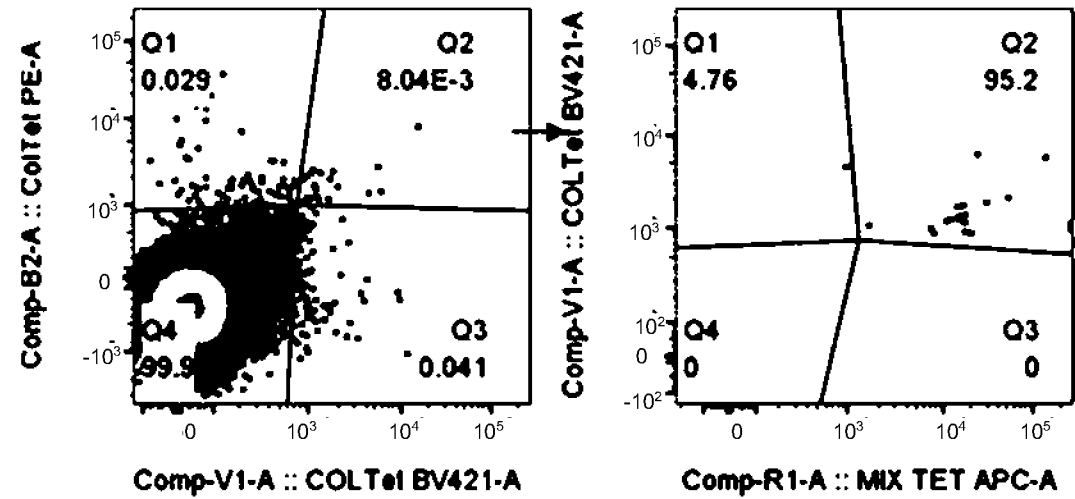
2D Tet-полож. МКПК при 37 °С в сравн. с КТ



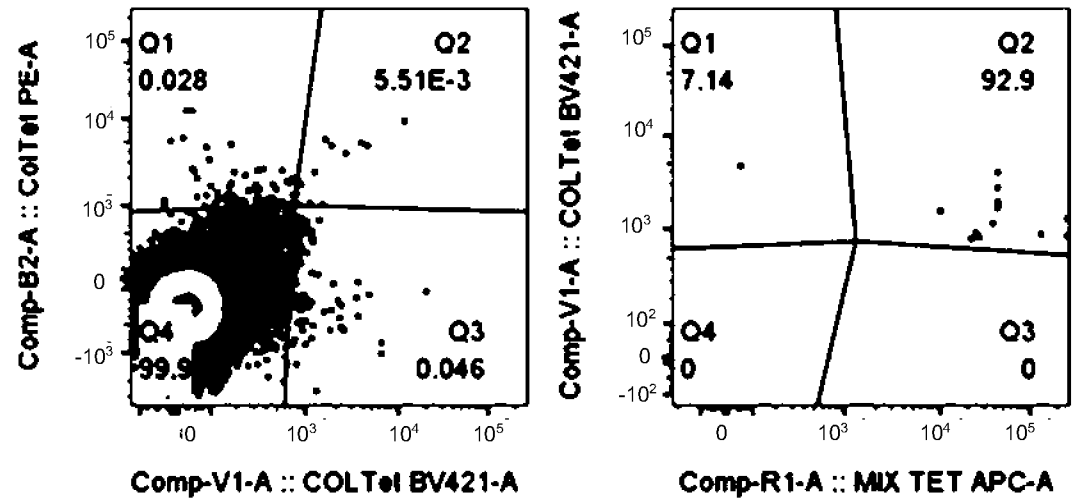
ФИГ. 30

Комн. темпер.+ несоотв. смесь

+ дазатиниб



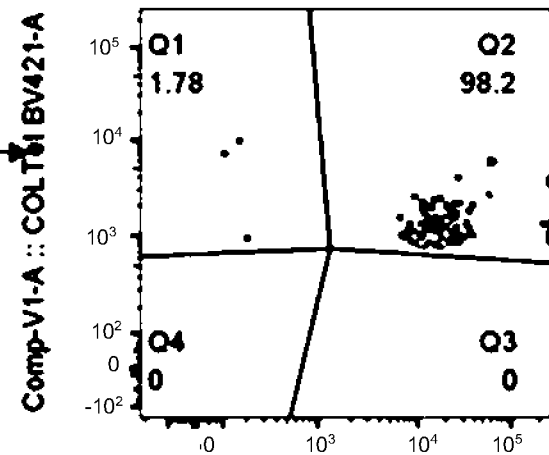
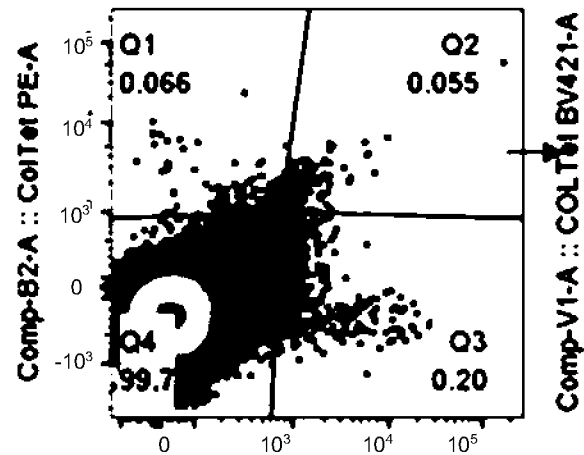
- дазатиниб



ФИГ. 31А

37 °C+ несоотв. смесь

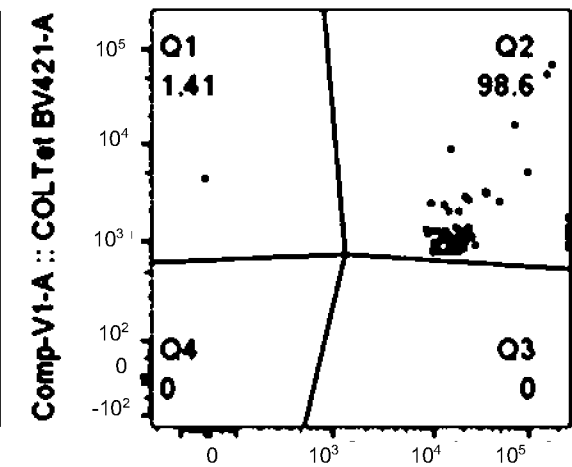
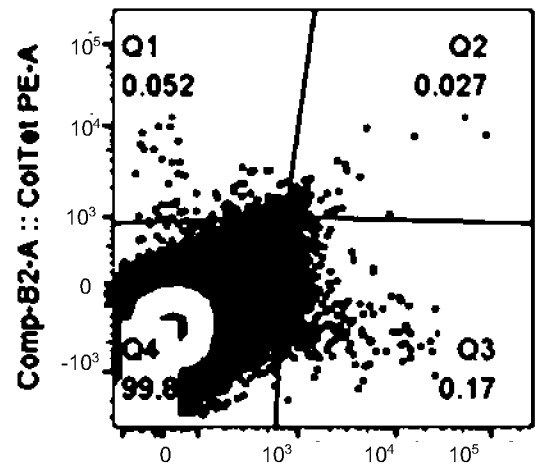
+ дазатиниб



Comp-V1-A :: COLtet BV421-A

Comp-R1-A :: MIX TET APC-A

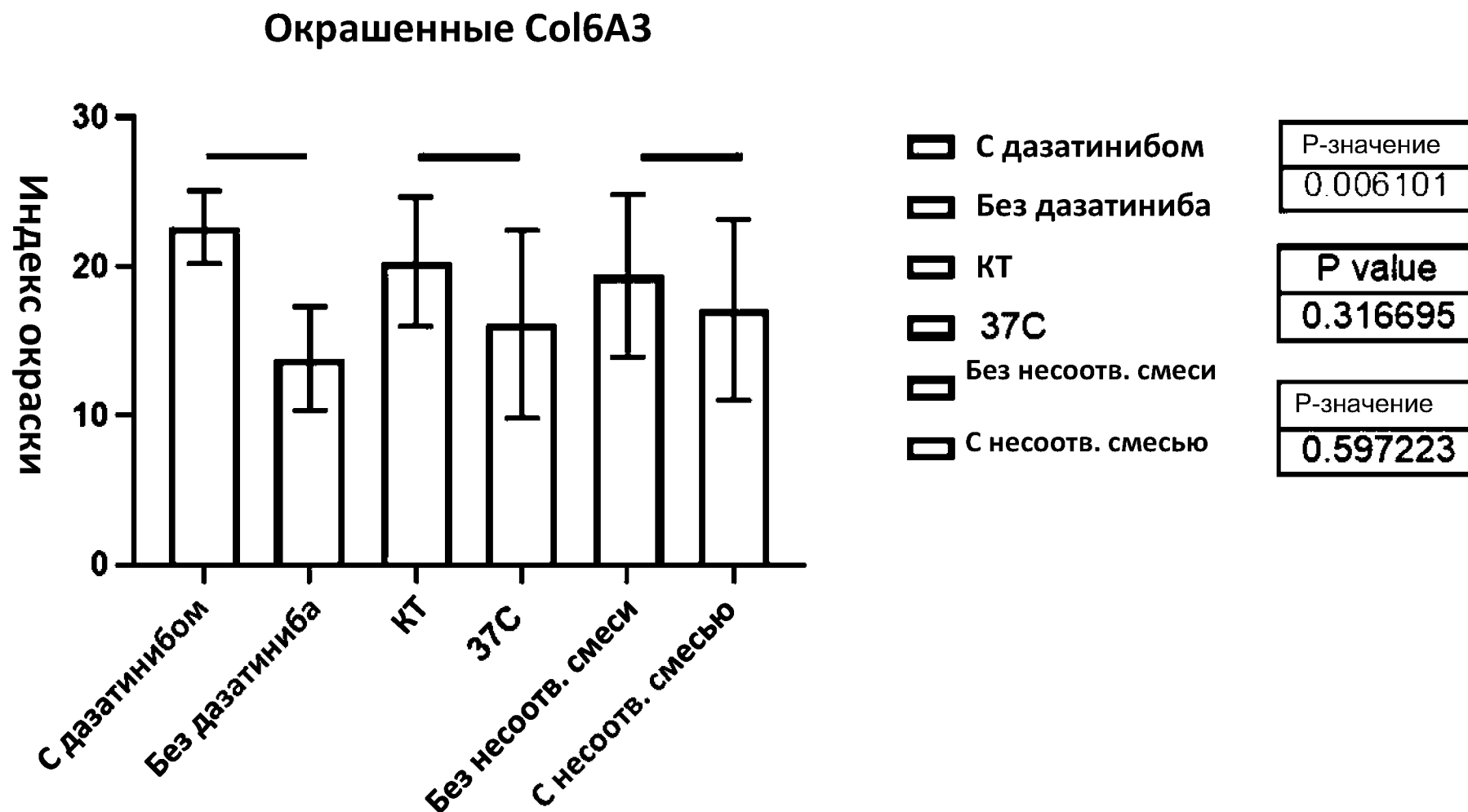
- дазатиниб



Comp-V1-A :: COLtet BV421-A

Comp-R1-A :: MIX TET APC-A

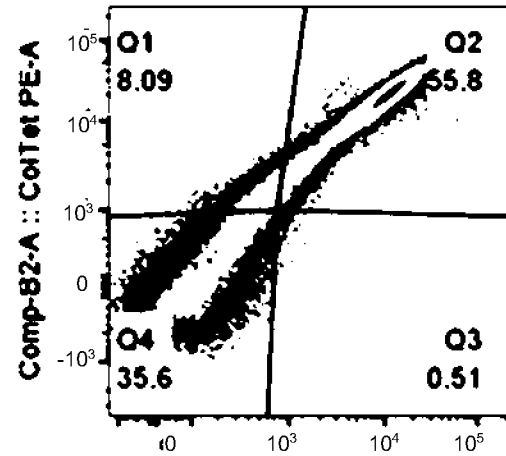
ФИГ. 31В



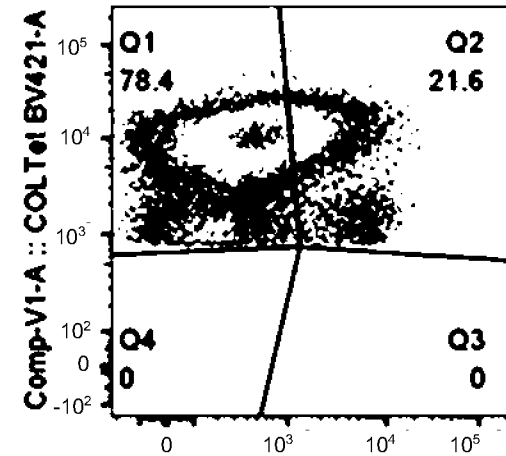
ФИГ. 32

Дазатиниб + несоотв. смесь

КТ
(SI = 24.0)

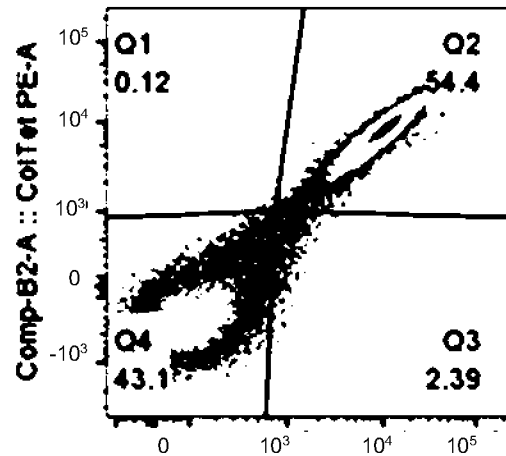


Comp-V1-A :: COLTel BV421-A

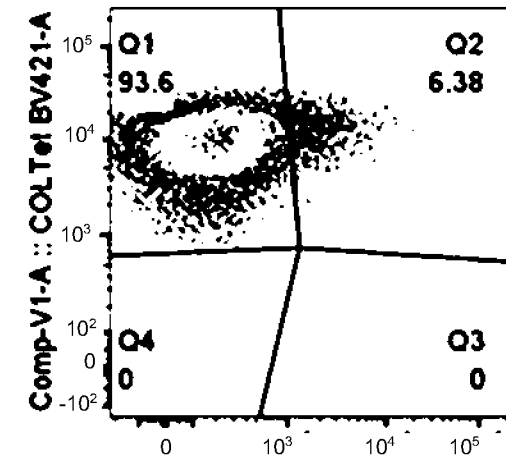


Comp-R1-A :: MIX TET APC-A

37°C
(SI = 19.0)



Comp-V1-A :: COLTel BV421-A

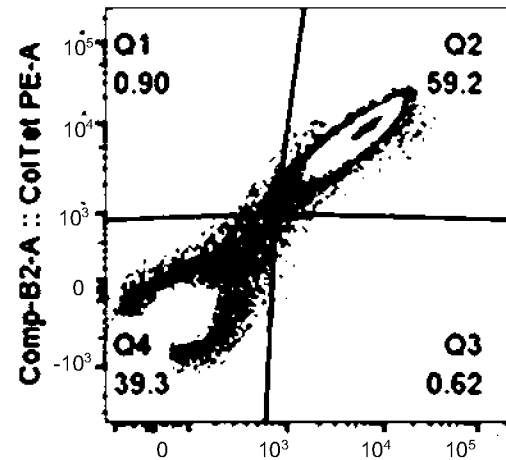


Comp-R1-A :: MIX TET APC-A

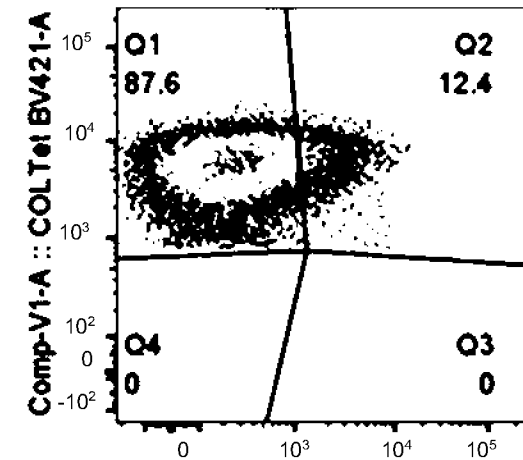
ФИГ. 33А

- Дазатиниб + несоотв. смесь

КТ
(SI = 15.9)

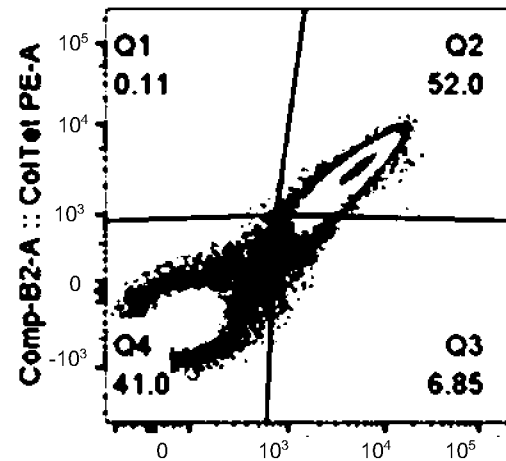


Comp-V1-A :: COLTel BV421-A

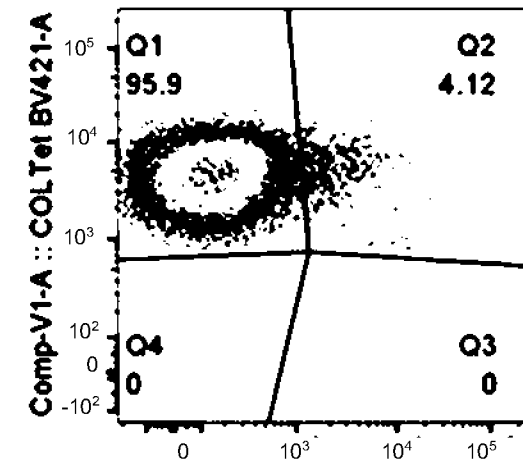


Comp-R1-A :: MIX TET APC-A

37°C
(SI = 9.49)



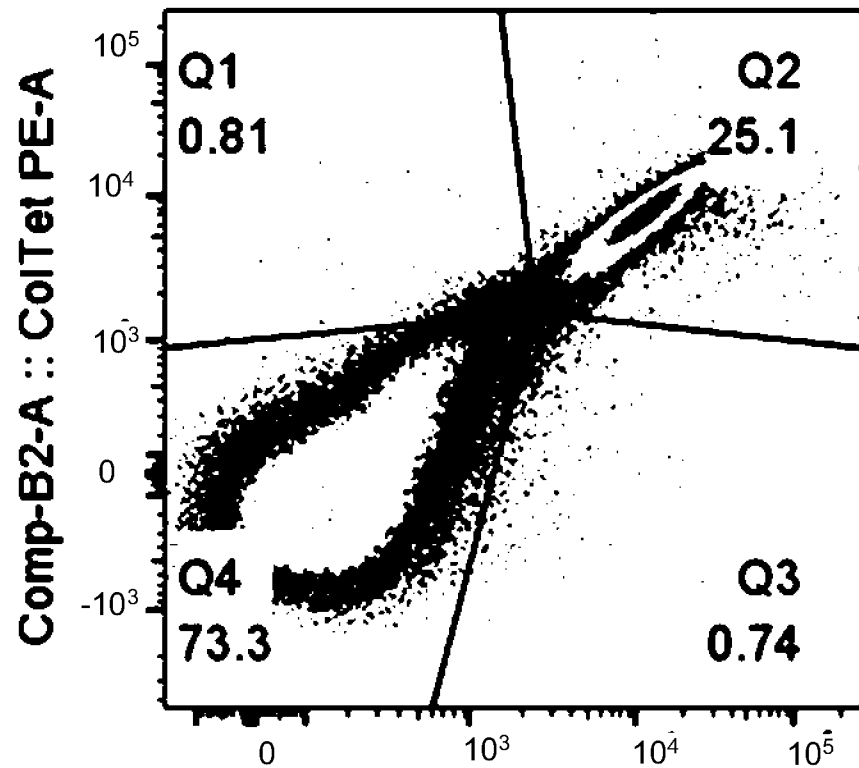
Comp-V1-A :: COLTel BV421-A



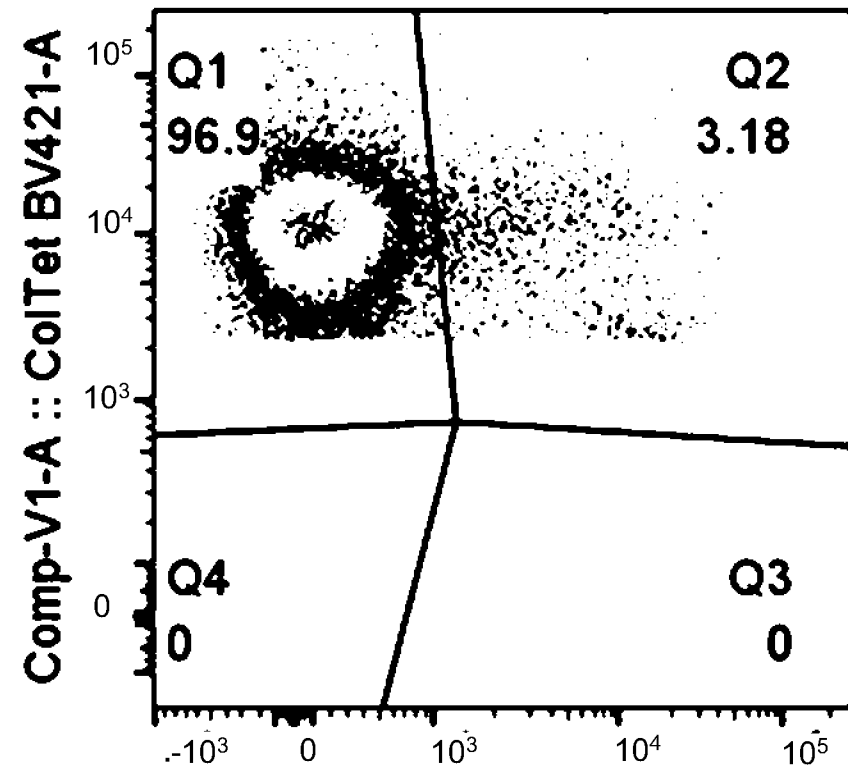
Comp-R1-A :: MIX TET APC-A

ФИГ. 33В

+ Дазатиниб [37] + несоотв. смесь | 15.6S. |.



Comp-V1-A :: ColTet BV421-A



Comp-R1-A :: Irr Tet Mix APC-A

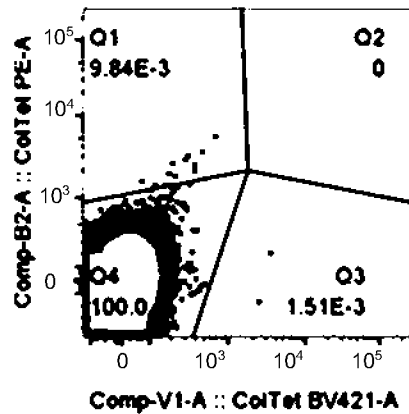
ФИГ. 34А

+ Дазатиниб [37] + несоотв. смесь

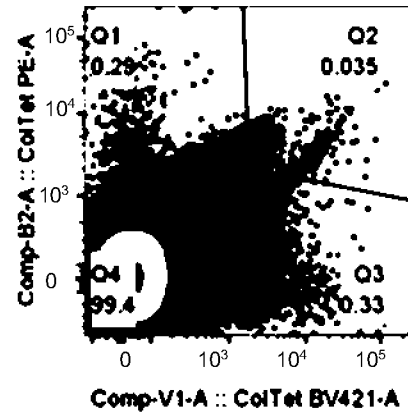
Полное окрашивание Tet (1:1e5 жив. кл. Col6A3 в МКПК)

Наложение 2DTet+
несоотв. смесь-

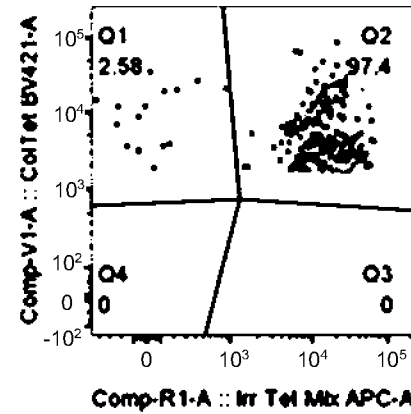
Без окрaш. Tet (МКПК)



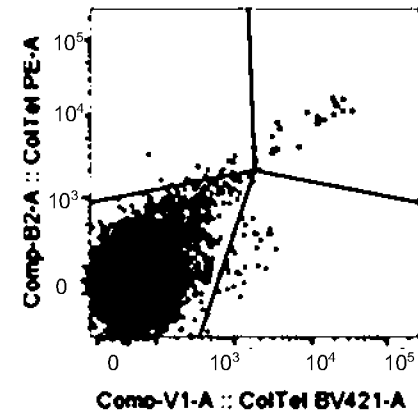
B1



B2



B3



B4

18 2DTet+ несоотв
смесь-
~ 1 в 1e5 CD45+

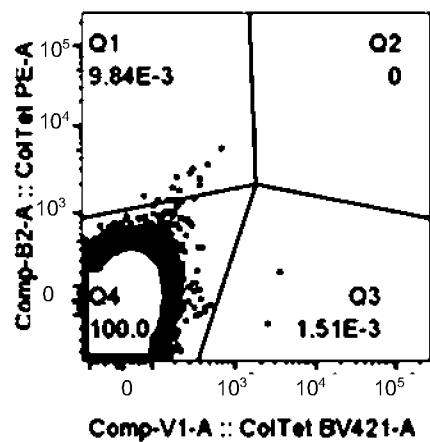
ФИГ. 34В

+ Дазатиниб [37] + несоотв. смесь

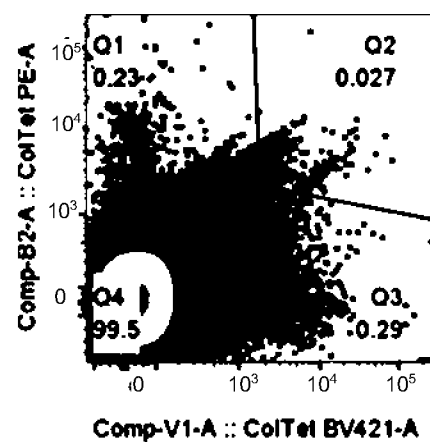
Без окрашивания тетр.

Полное окрашивание тетрамерами (только клетки МКПК)

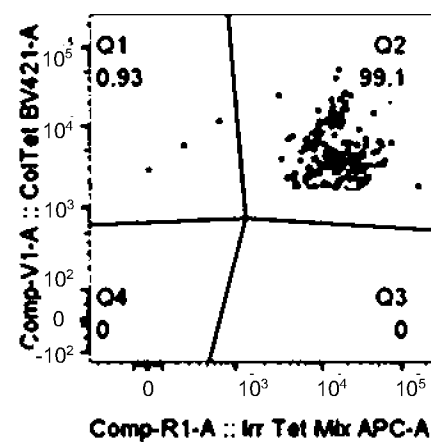
Наложение 2DTet+
несоотв. смесь-



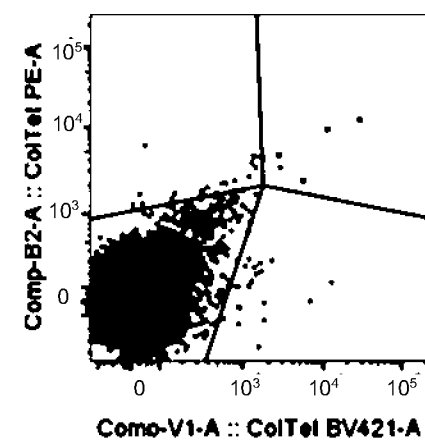
C1



C2



C3

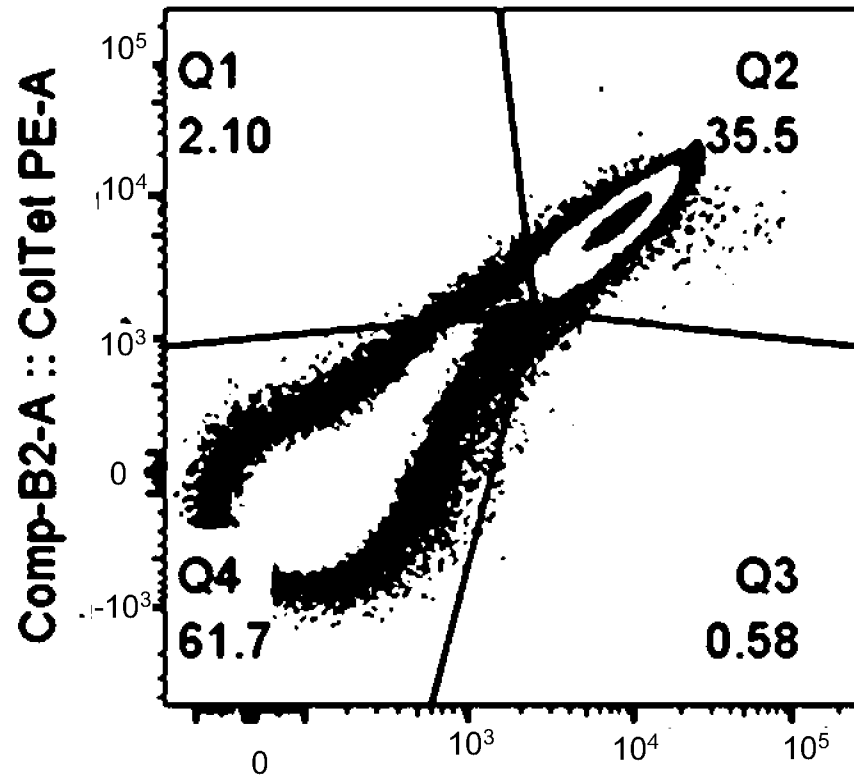


C4

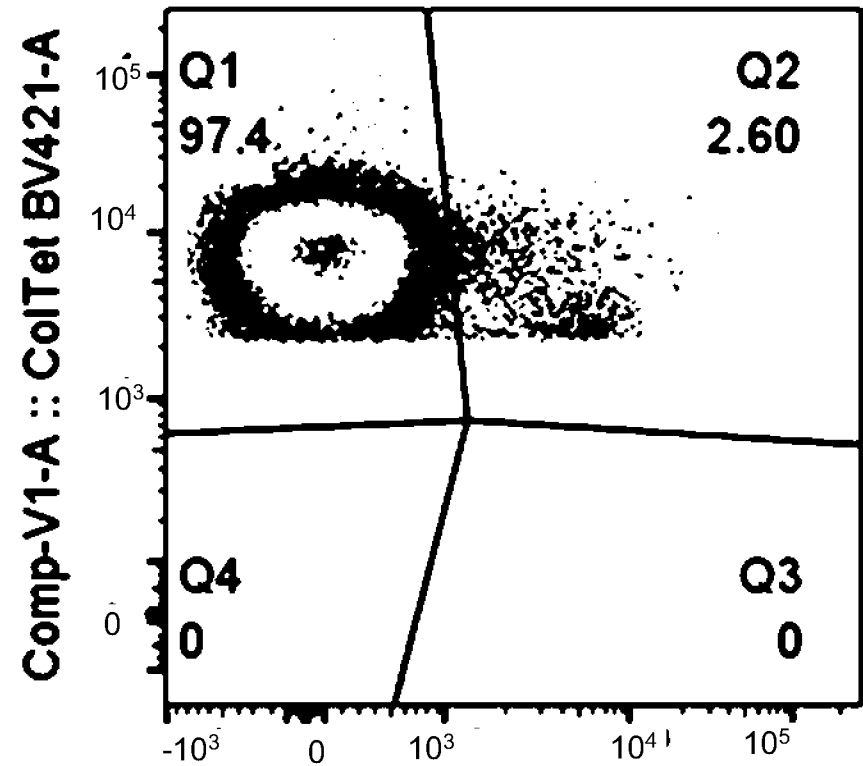
5 2DTet+ несоотв.
смесь-
~ 1 в 4e5 CD45+

ФИГ. 34С

- Дазатиниб |КТ| + несоотв. смесь | 10.2S. |.



Comp-V1-A :: ColTet BV421-A



Comp-R1-A :: Irr Tet Mix APC-A

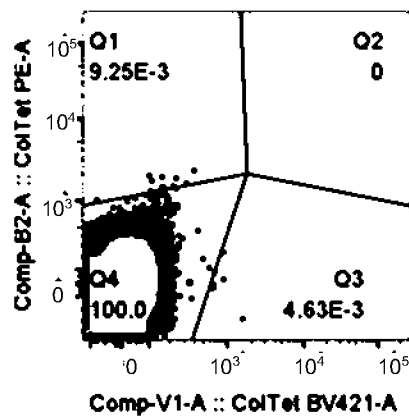
ФИГ. 35А

- Дазатиниб [КТ] + несоотв. смесь

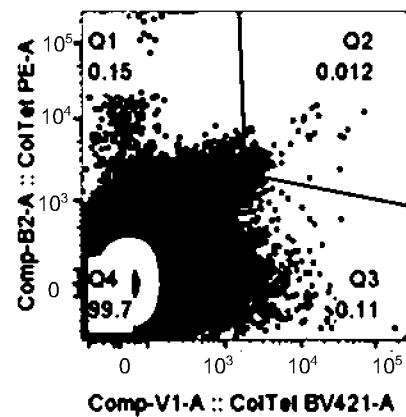
Без окрашивания тетр.
(МКПК)

Полное окрашивание Tet (1:1e5 жив. кл. Col6A3 в МКПК)

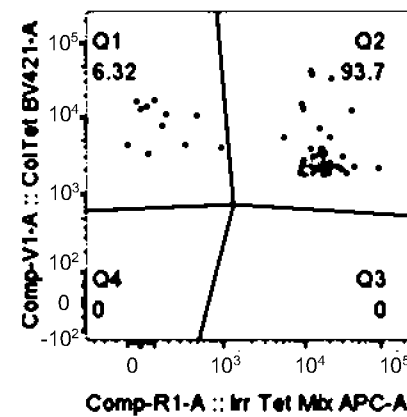
Наложение
2DTet+несоотв. см.-



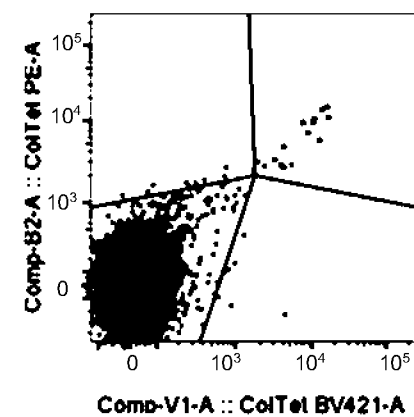
B1



B2



B3



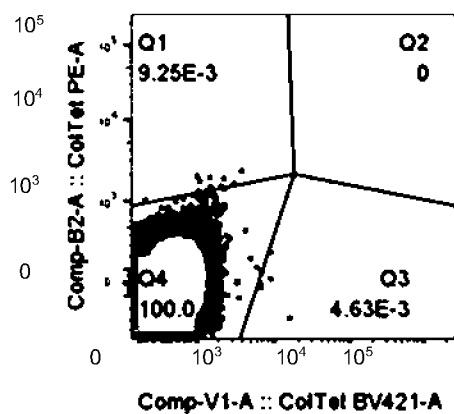
B4

12 2DTet+несоотв.
смесь-
~ 1 in 1.3e5 CD45+

ФИГ. 35В

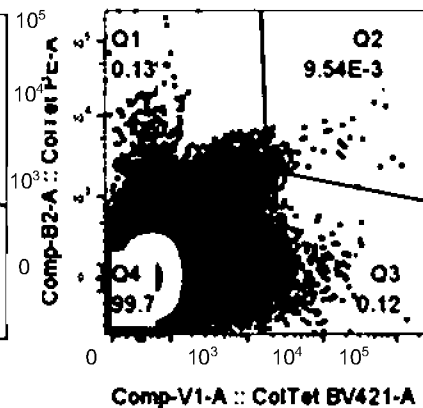
- Дазатиниб |КТ| + несоотв. смесь

Без окрашивания тетр.

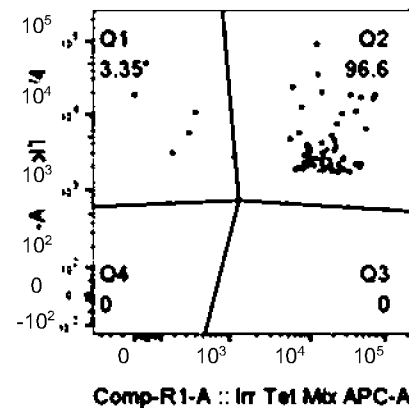


C1

Полное окрашивание Tet (только клетки МКПК)

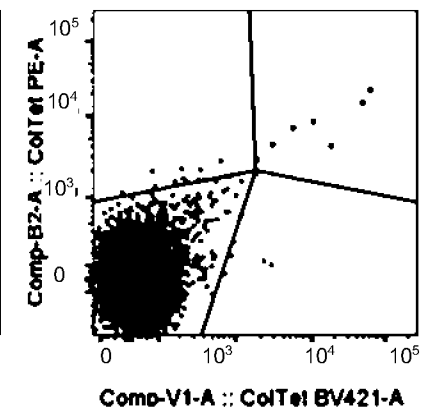


C2



C3

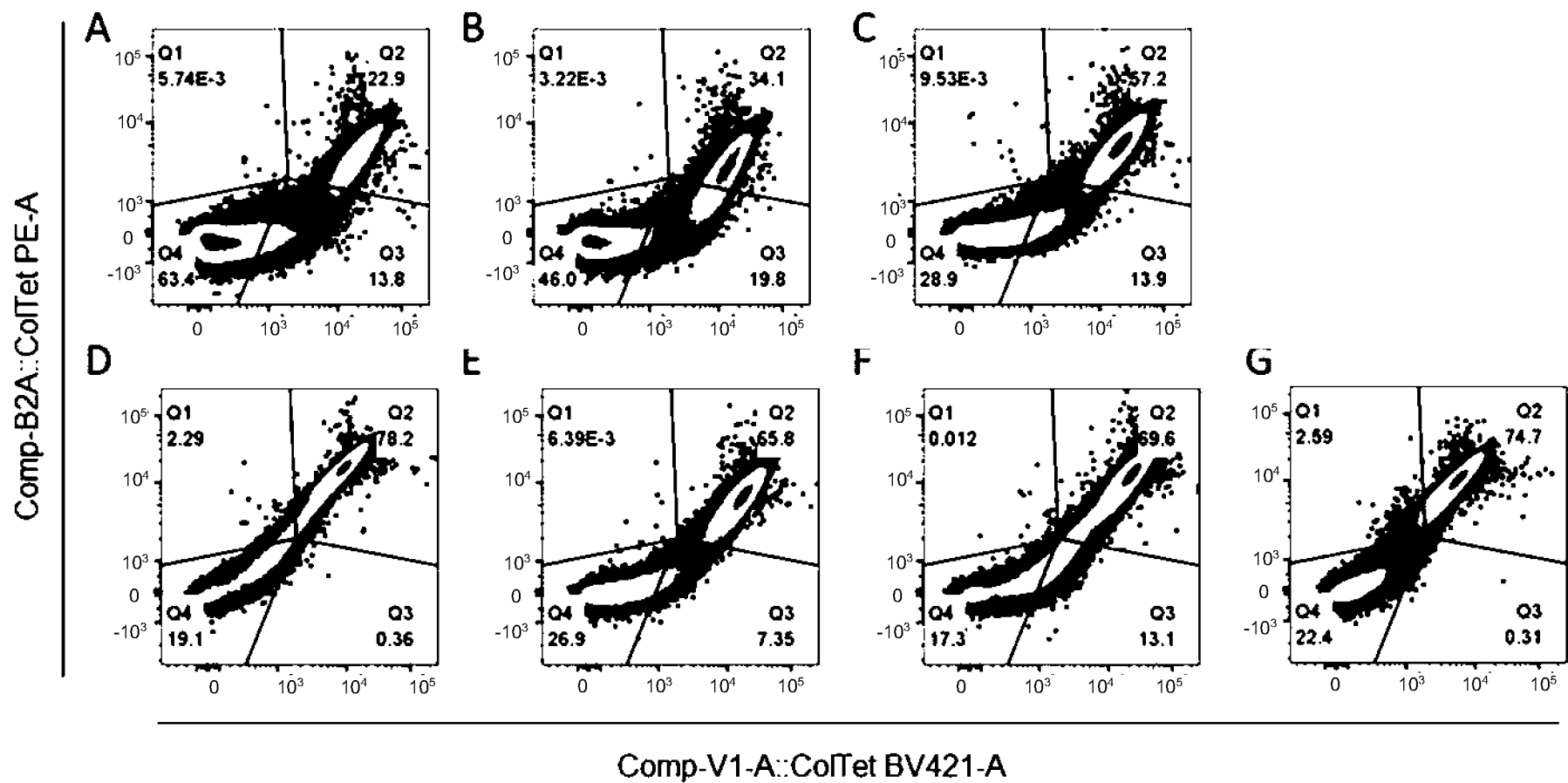
Наложение
2DTet+несоотв. смесь-



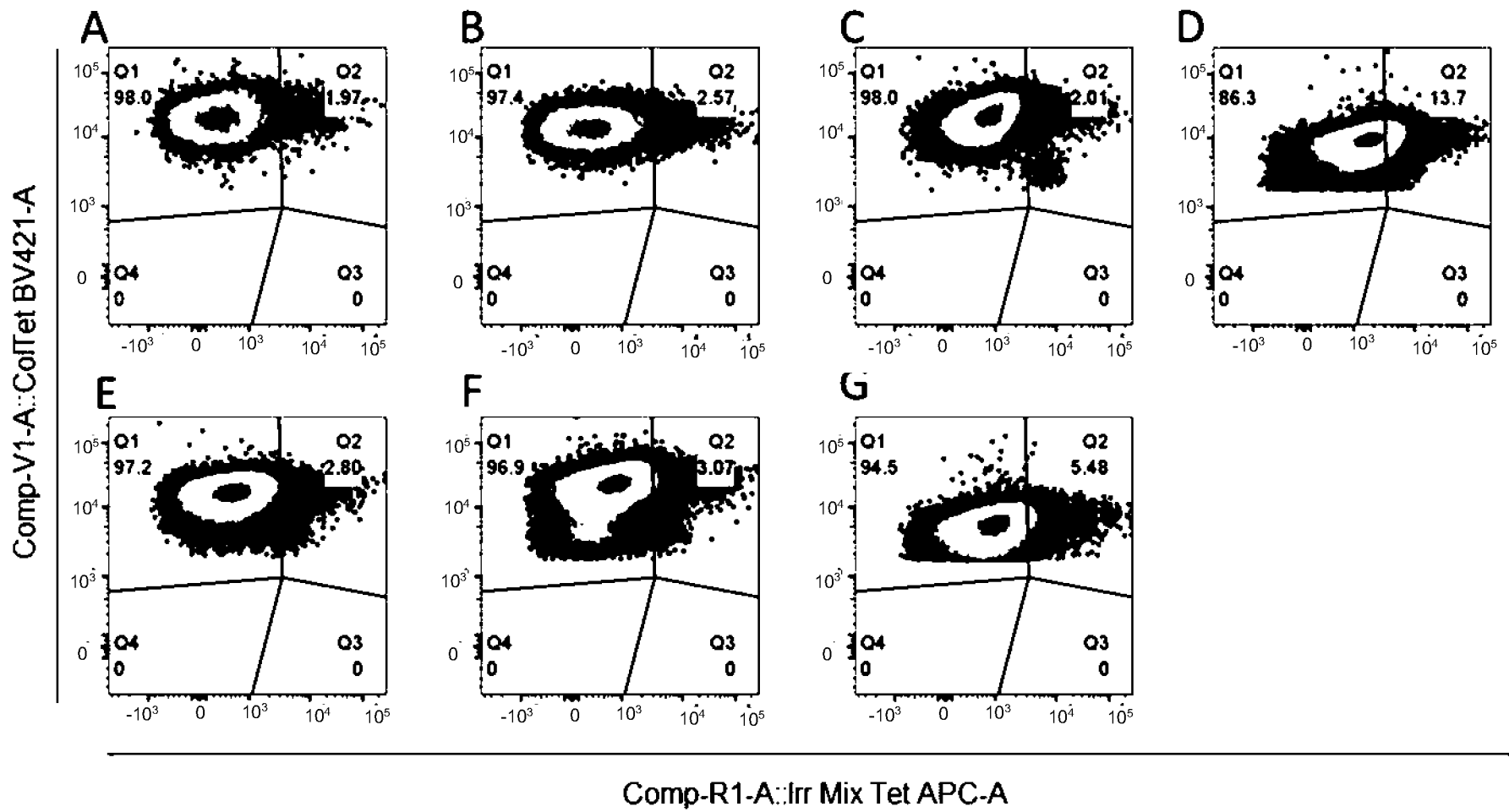
C4

6 2DTet+несоотв.
смесь-
~ 1 в 3e5 CD45+

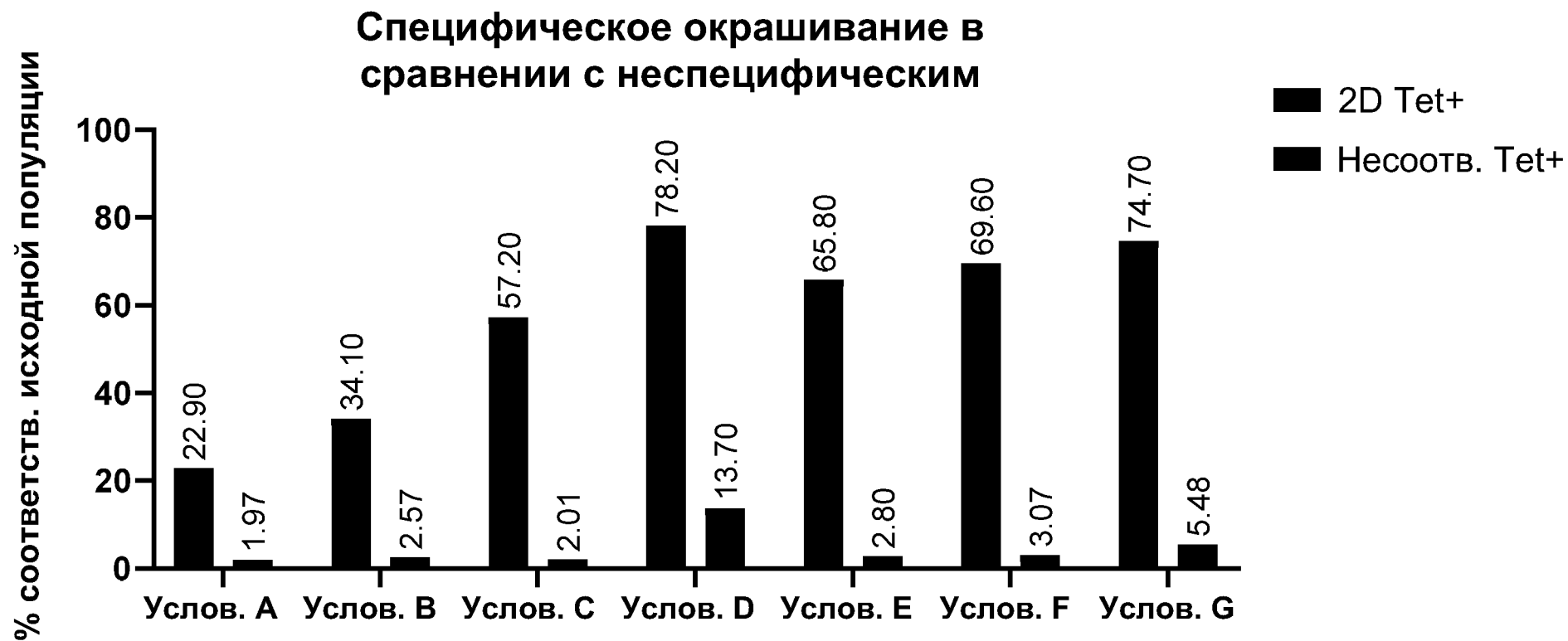
ФИГ. 35C



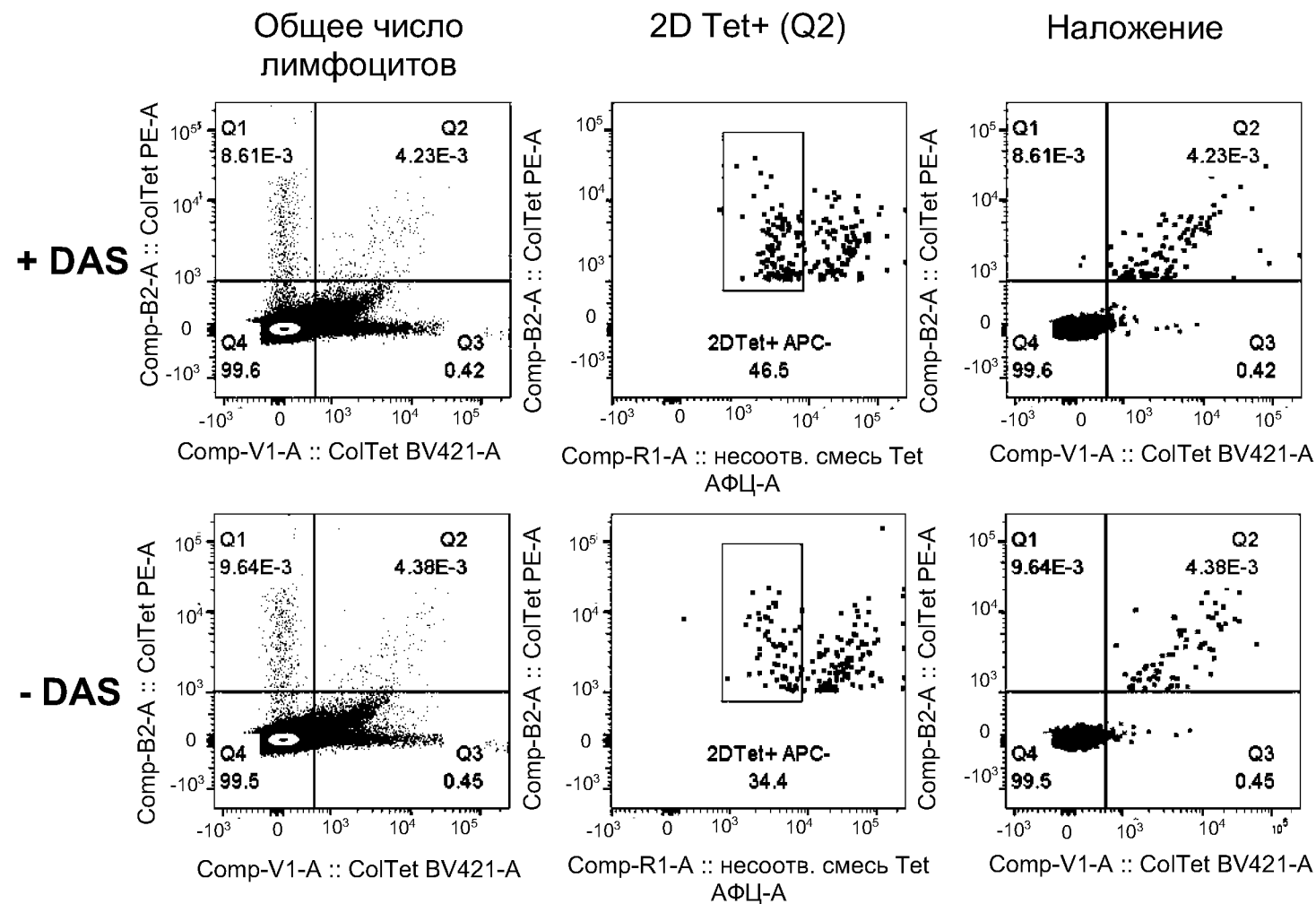
ФИГ. 36А

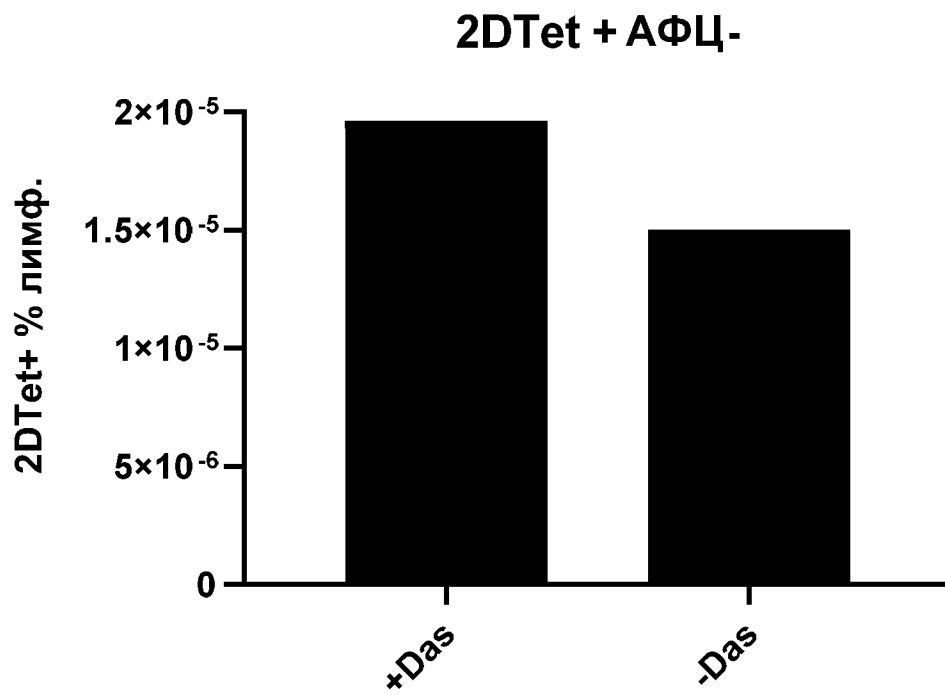


ФИГ. 36В

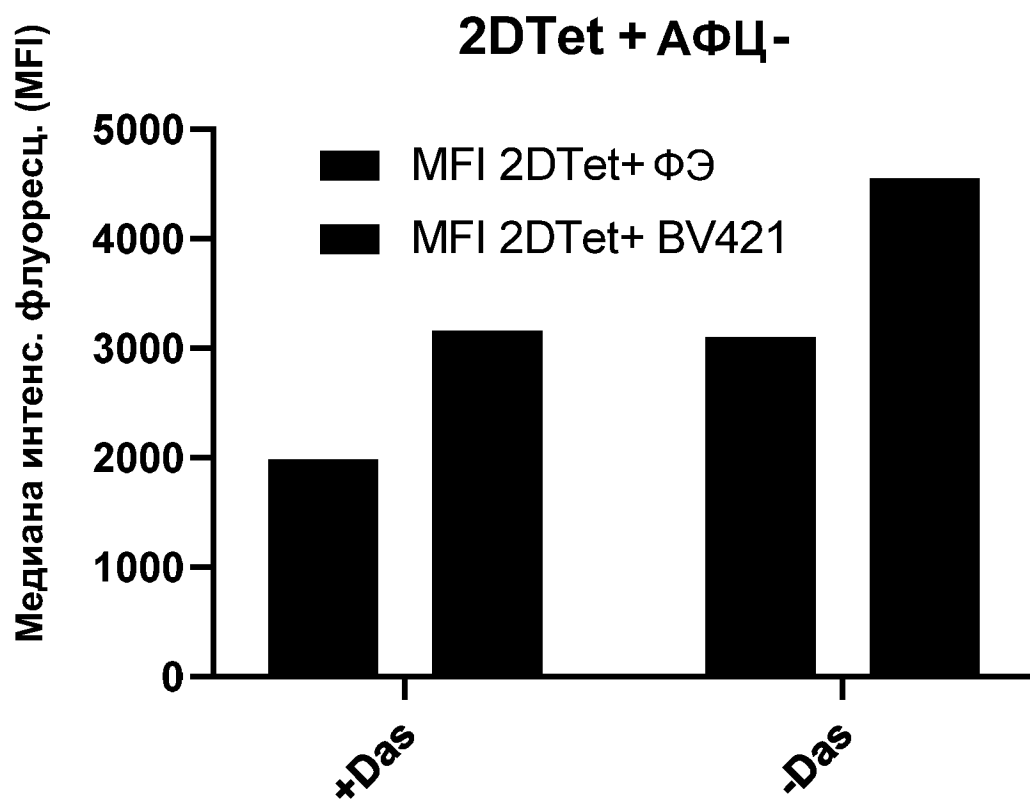


ФИГ. 36С

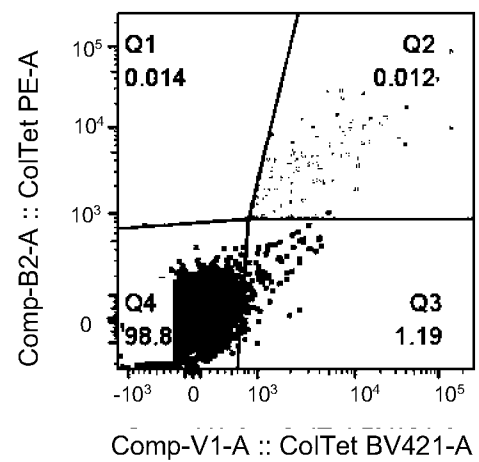
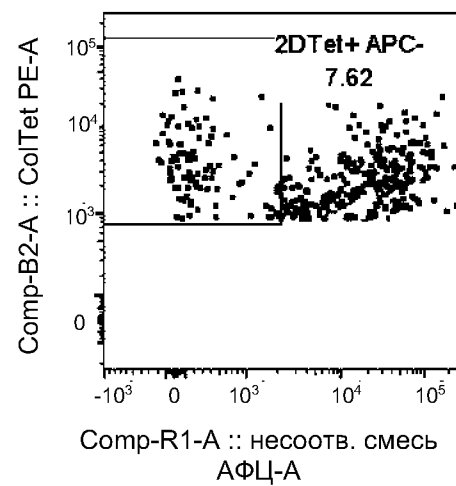
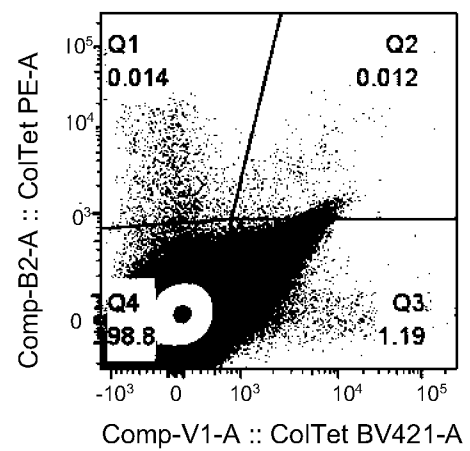




ФИГ. 37В

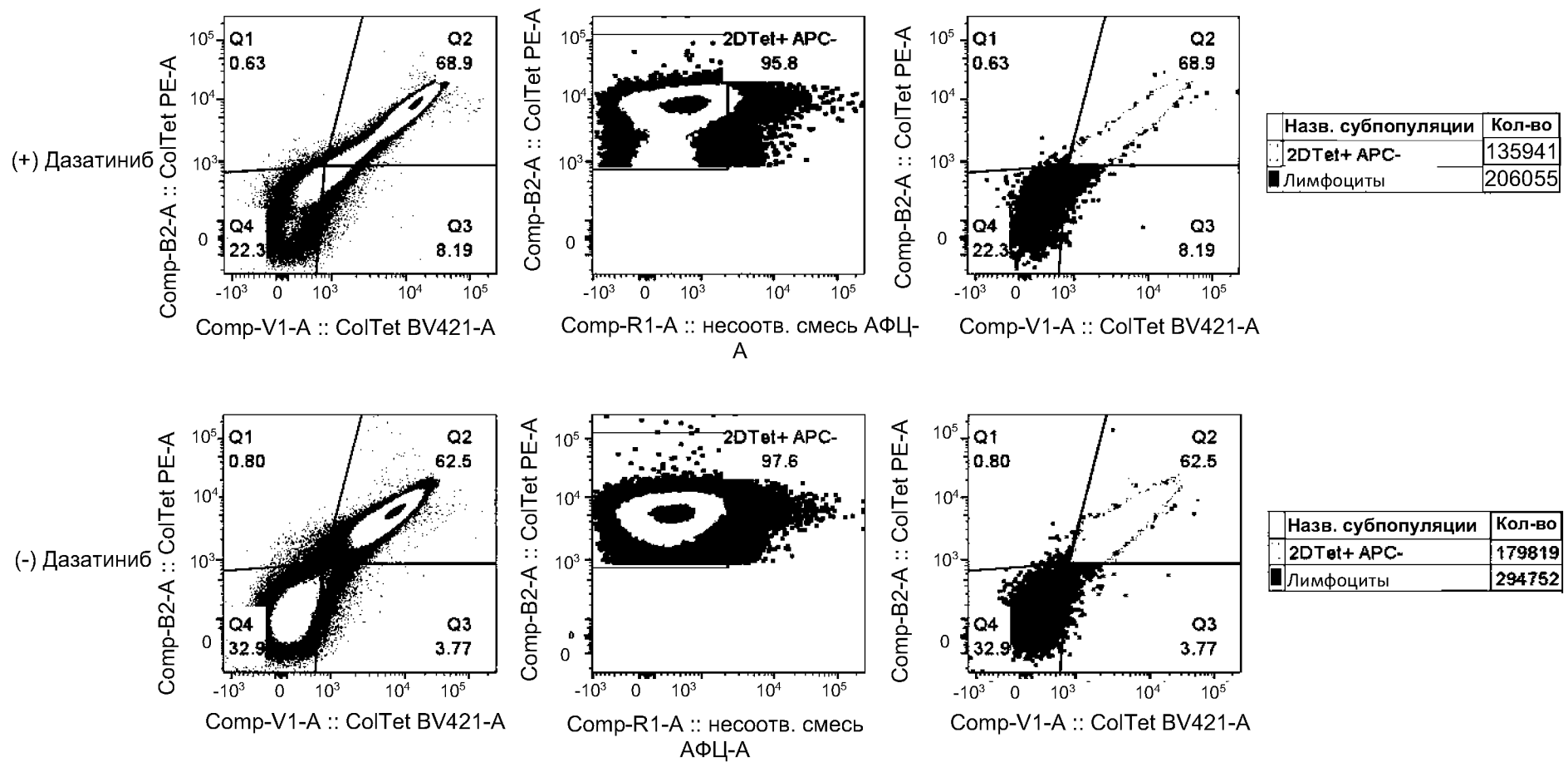


ФИГ. 37С



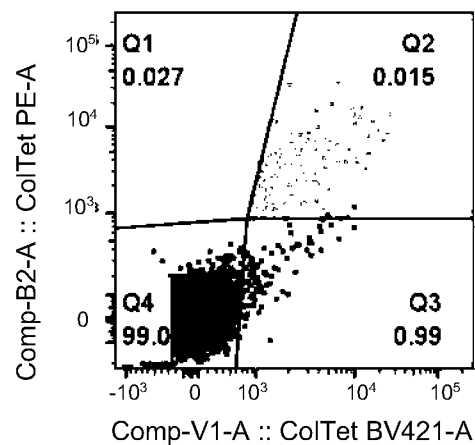
Назв. субпопуляции	Кол-во
2DTet+ APC-	100
Лимфоциты	1.09E7

ФИГ. 38

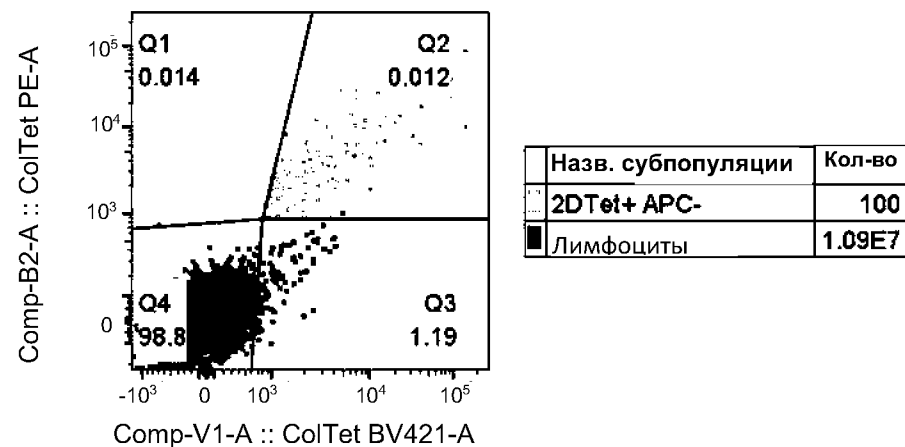


ФИГ. 39

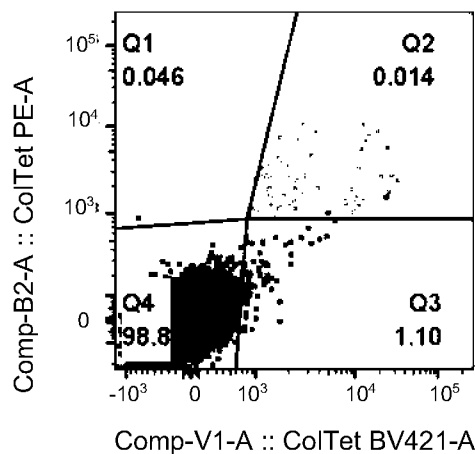
S1 (+) Дазатиниб



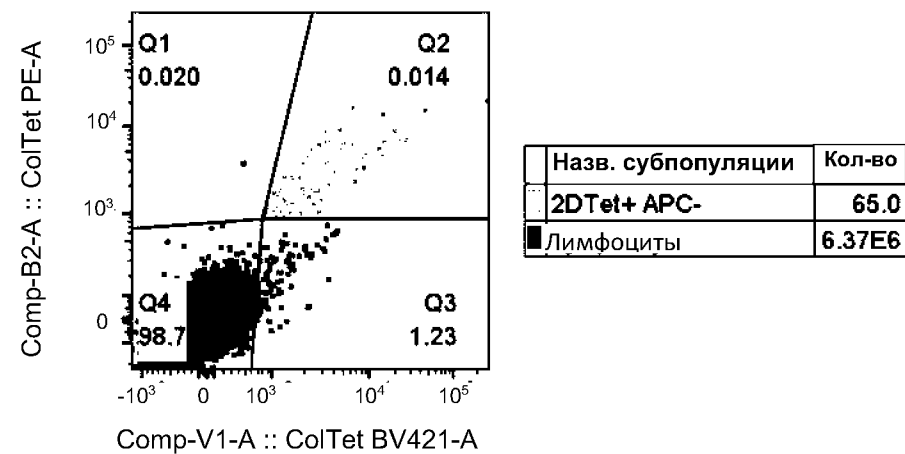
S1 (-) Дазатиниб



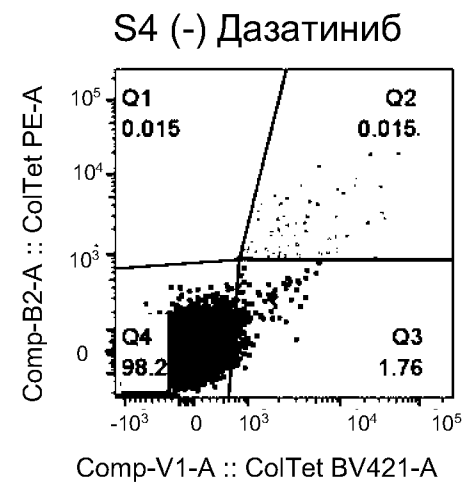
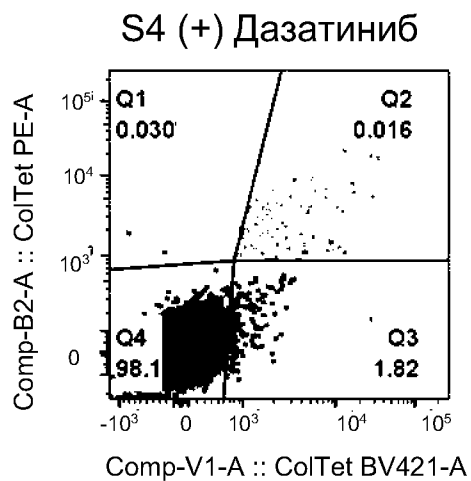
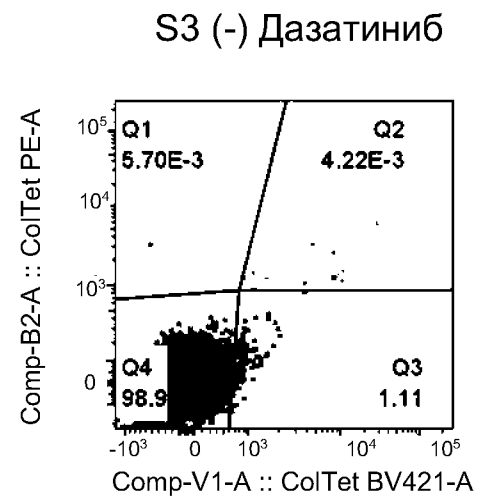
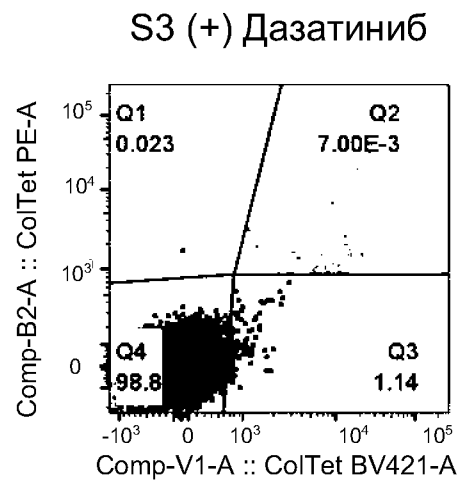
S2 (+) Дазатиниб



S2 (-) Дазатиниб

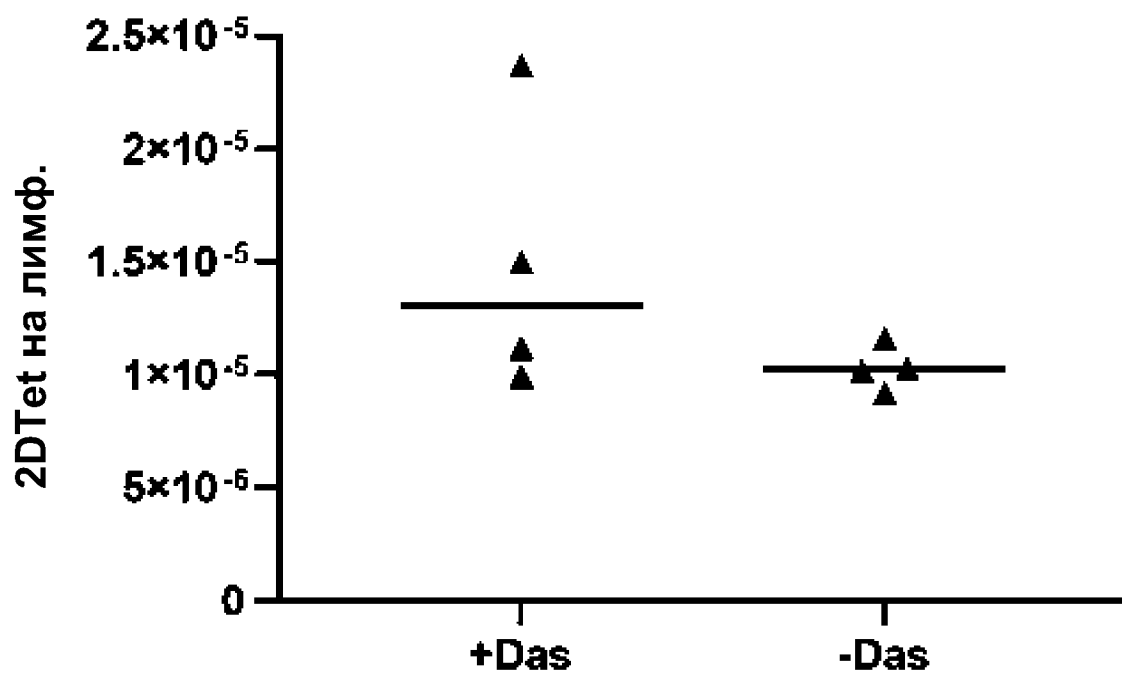


ФИГ. 40А



ФИГ. 40В

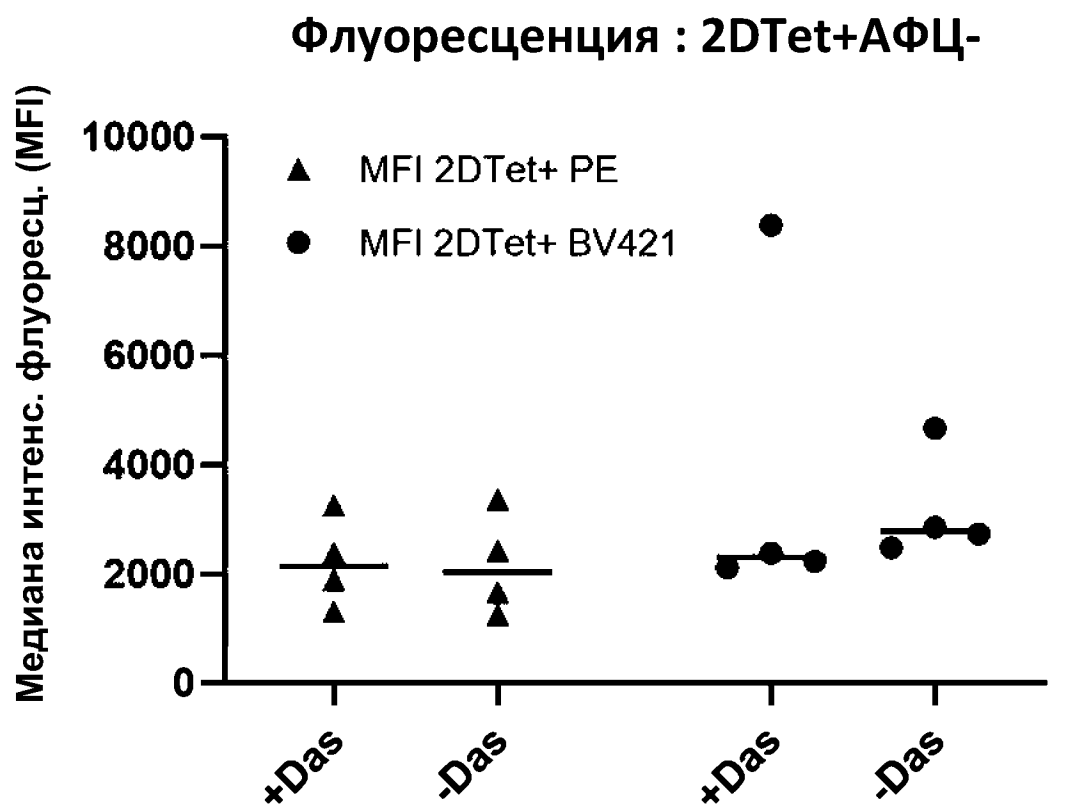
Частота встречаемости специфич.
Т-клеток



Р-значение (двусторон.)	0.1155
Обзор Р-значений	ns

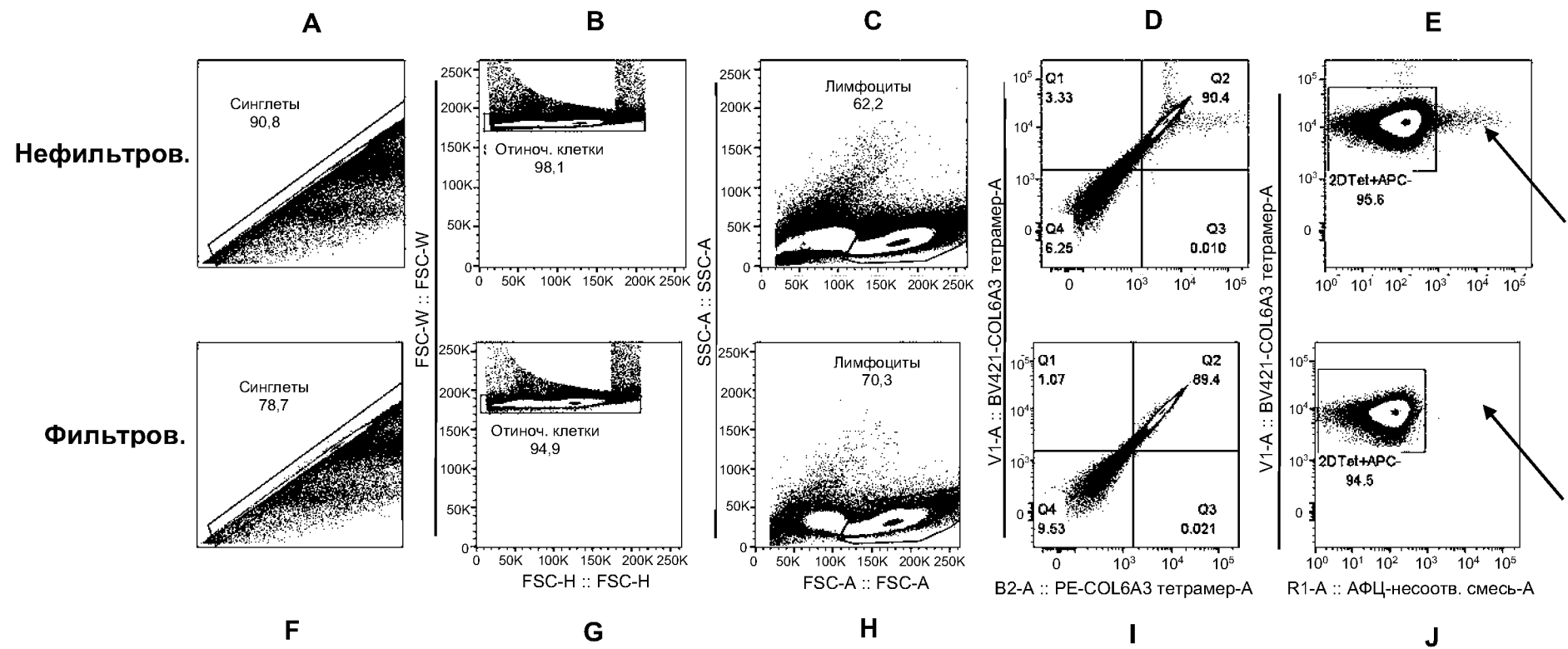
Однопараметрический t-тест

ФИГ. 40С

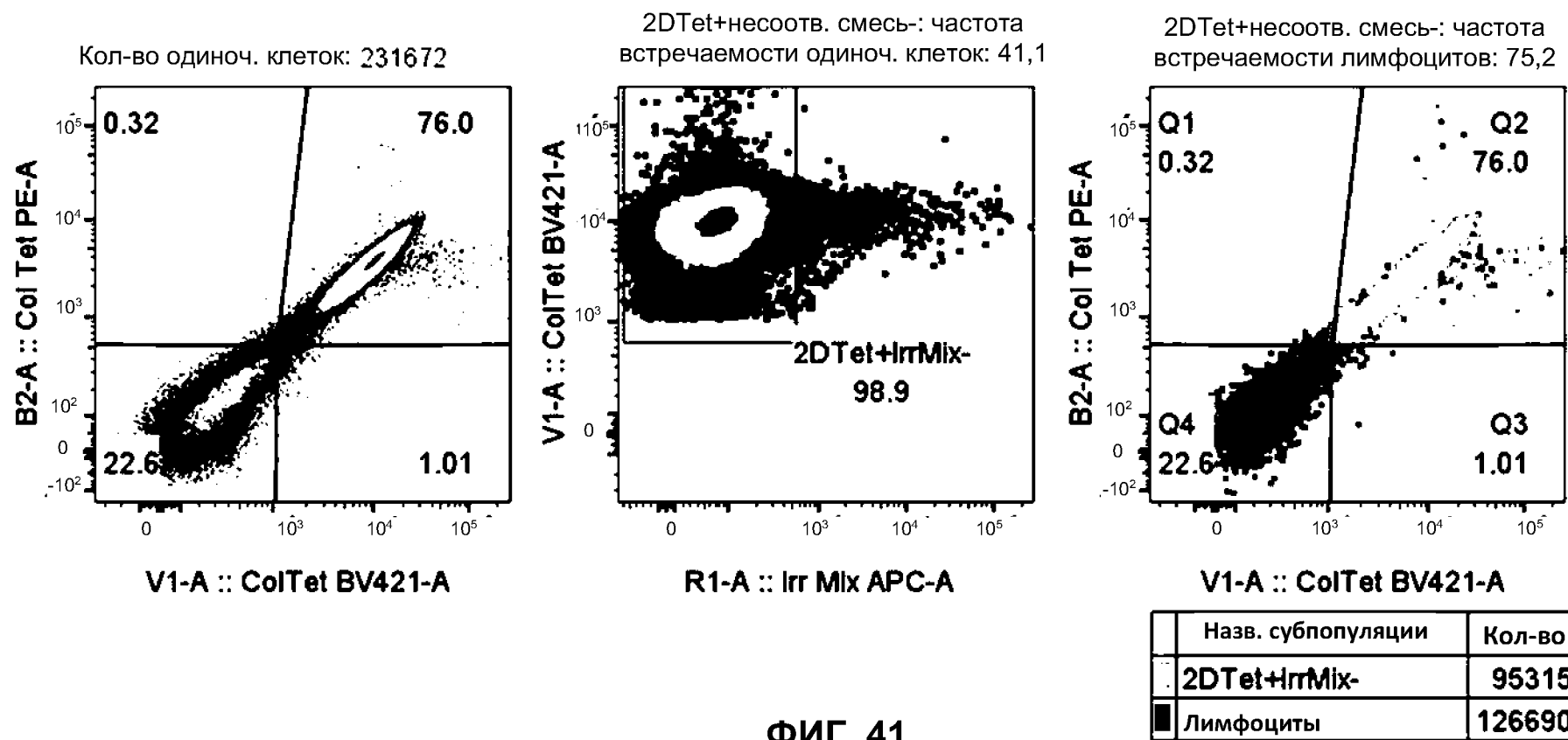


Без статистич. значимости ($p > 0,8$)

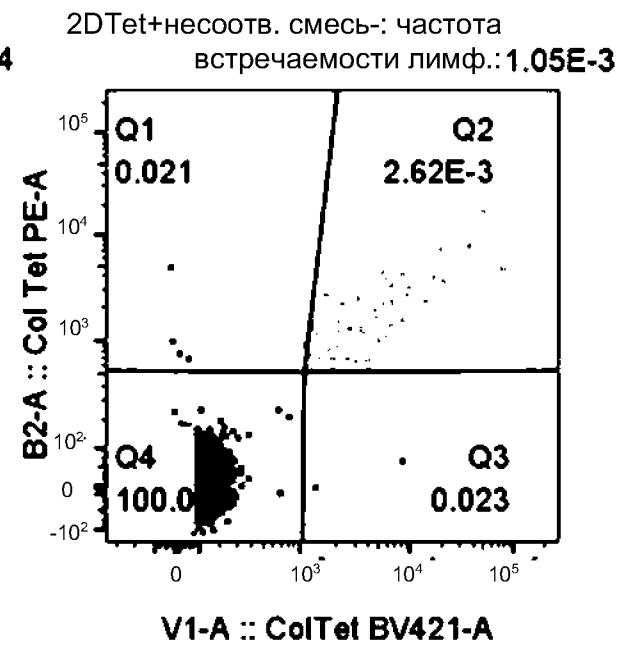
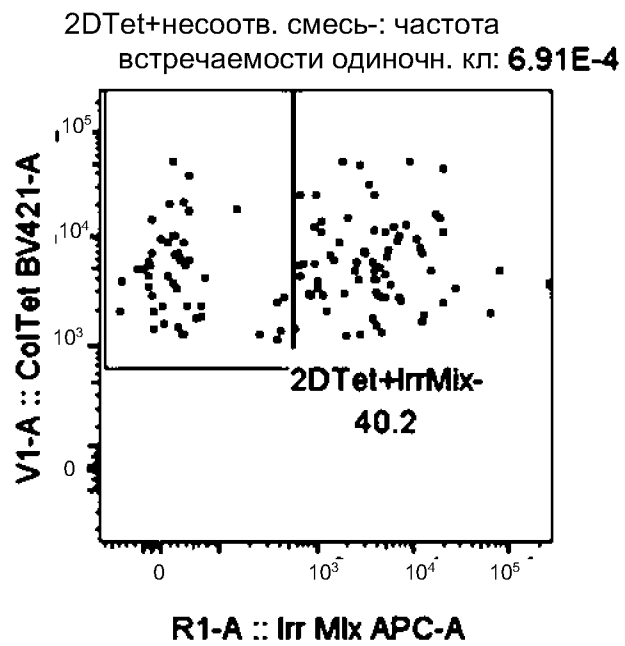
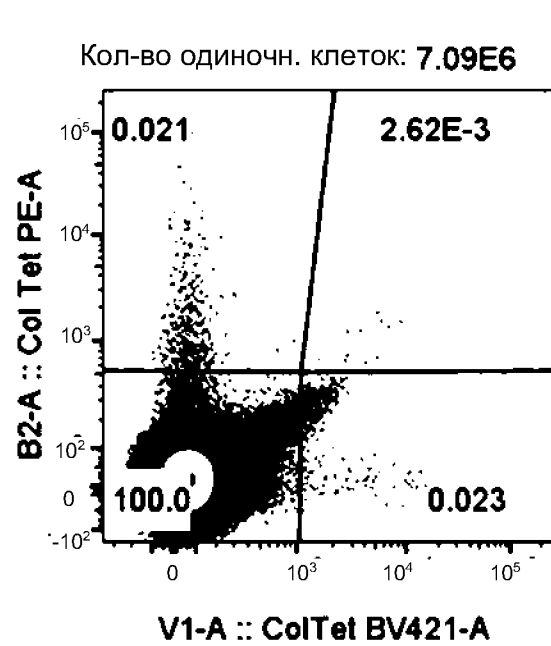
ФИГ. 40D



ФИГ. 40Е



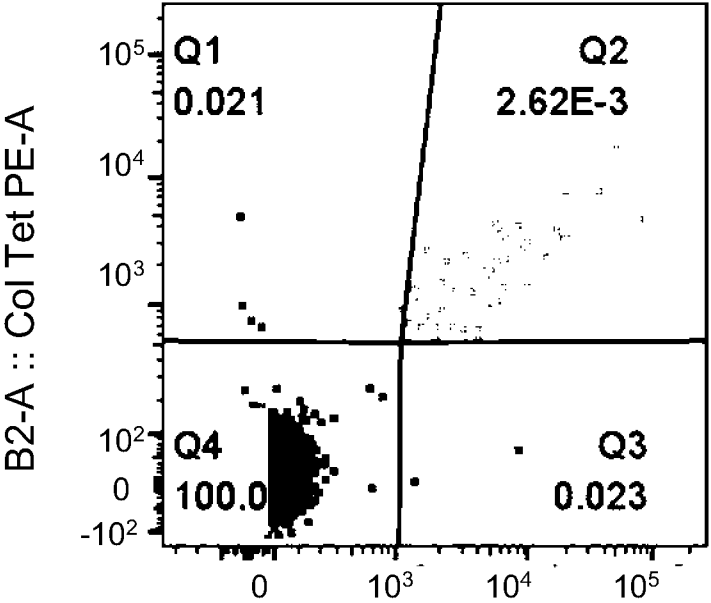
ФИГ. 41



Назв. субпопуляции	Кол-во
2DTet+IrrMix-	49.0
Лимфоциты	4.66E6

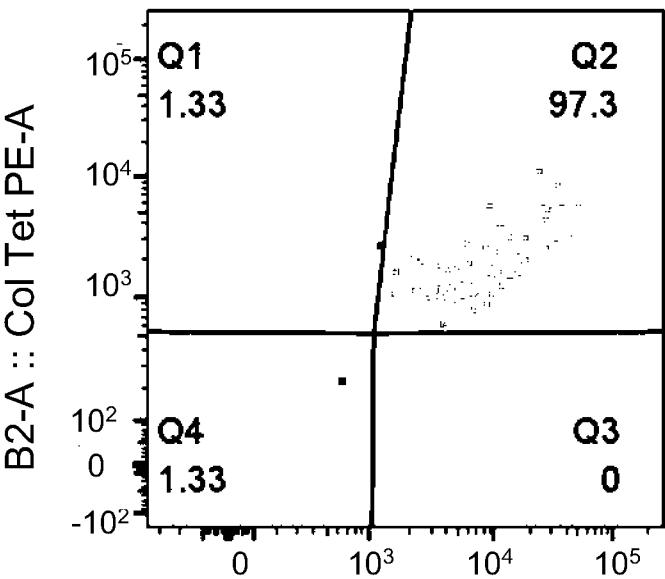
ФИГ. 42

2DTet+несоотв. смесь-: частота встречаемости лимф.: 1,05E-3



V1-A :: ColTet BV421-A	
Назв. субпопуляции	Кол-во
2D Tet+несоотв. смесь-	49,0
Лимфоциты	4,66E

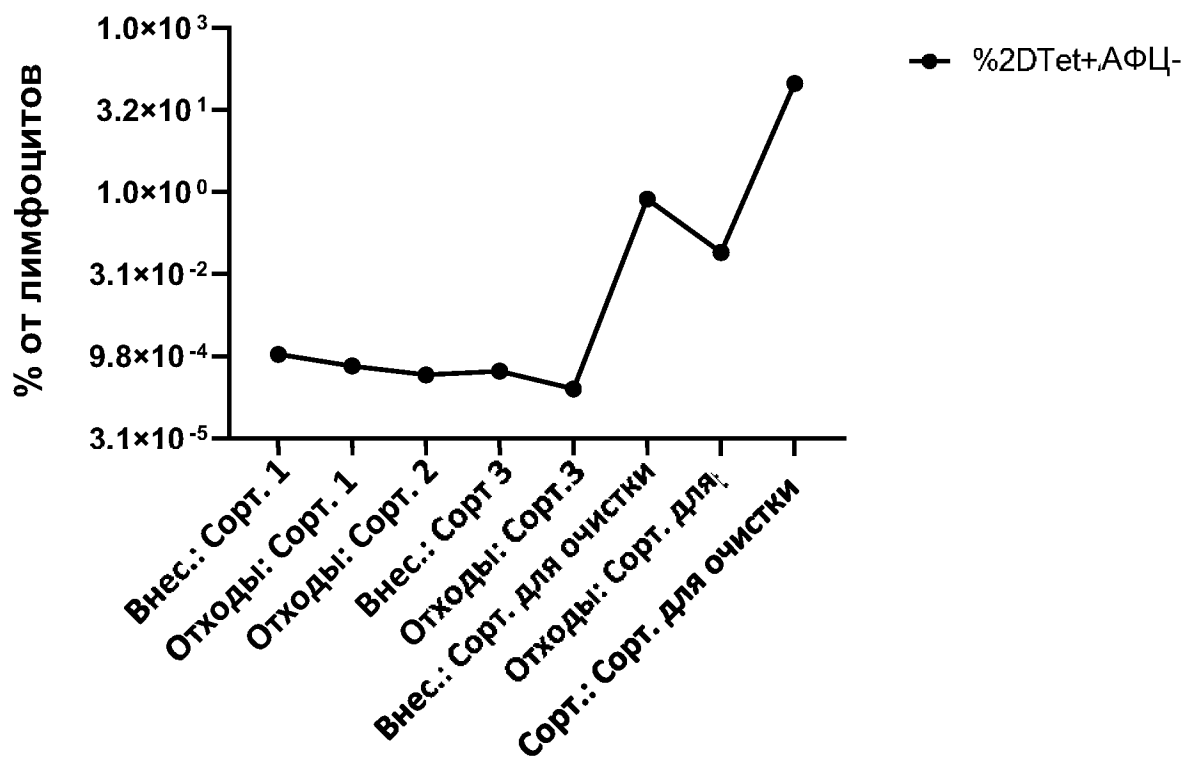
2DTet+несоотв. смесь-: частота встречаемости



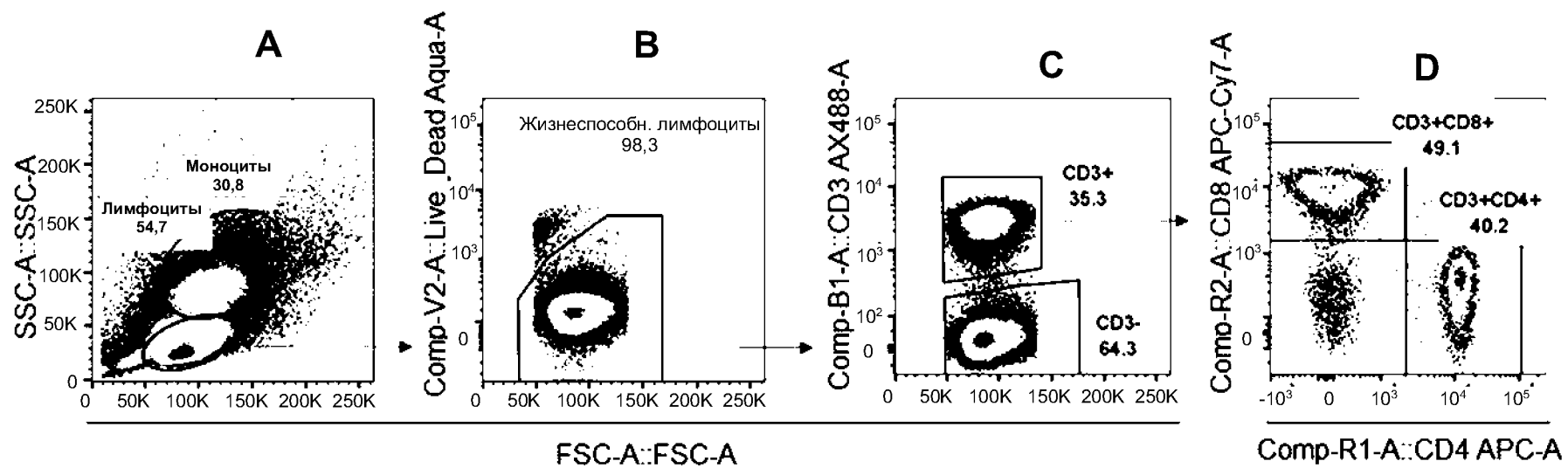
V1-A :: ColTet BV421-A	
Назв. субпопуляции	Кол-во
2D Tet+несоотв. смесь-	73,0
Лимфоциты	75,0

ФИГ. 43

Эксплуатационные характеристики сортировки



ФИГ. 44



ФИГ. 45