

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292311 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.24(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.02.11

(54) Т-КЛЕТОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИИ CD19-НАПРАВЛЕННОГО ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/975,724

(32) 2020.02.12

(33) US

(86) PCT/US2021/017739

(87) WO 2021/163391 2021.08.19

(71) Заявитель:

ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

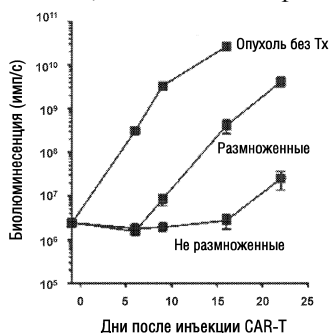
(72) Изобретатель:

Вестоби Мэттью, Бриггз Эдриан
Рэнгхэм, Каглер Дэвид Г., Каспари
Роберт Гай, Чэн Кэлвин, Варун Дивия
(US), Гермерот Лотар, Штембергер
Кристиан, Полторац Матеуш Павел
(DE), Башур Кинан, Батуревич
Олександр, Килавуз Нургул, Хидж
Кристен, Берджесс Майкл, У Кайда,
Салмон Рут Аманда (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В некоторых аспектах предложены композиции клеток для лечения субъектов с заболеваниями и состояниями, такими как неходжкинская лимфома (NHL), и связанные способы, композиции, применения и готовые изделия. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-клеточную NHL). Клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), для таргетирования антигена, такого как CD19, на клетках лимфомы.



A1

202292311

202292311

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575186EA/032

Т-КЛЕТОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИИ CD19-НАПРАВЛЕННОГО ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/975,724, поданной 12 февраля 2020 и озаглавленной «CD19-DIRECTED CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T CELL COMPOSITIONS AND METHODS AND USES THEREOF», содержание которой полностью включено посредством ссылки.

Включение посредством ссылки перечня последовательностей

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием 735042022740SEQLIST.txt, созданного 6 февраля 2021 и имеющего размер 56,9 килобайт. Информация в электронном формате перечня последовательностей полностью включена посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение, в некоторых аспектах, относится к адоптивной клеточной терапии, включающей введение композиций клеток для лечения субъектов с заболеваниями и состояниями, такими как неходжкинская лимфома (NHL), и родственным способам, композициям, применениям и готовым изделиям.

Уровень техники

Для лечения заболеваний и состояний доступны различные способы иммунотерапии и/или клеточной терапии. Например, адоптивная клеточная терапия (включающая введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, специфичные для представляющего интерес заболевания или нарушения, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие адоптивные иммунные клетки и адоптивную Т-клеточную терапию) могут быть полезны при лечении рака или других заболеваний или нарушений. Нужны улучшенные подходы. Предложены способы, виды использования и готовые изделия, которые удовлетворяют такие потребности.

Сущность изобретения

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и композиция включает от точно или примерно 5x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; и, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 2,5:1, и композиция включает от точно или примерно 5x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно, и по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:1 до примерно 2,5:1, и композиция включает от точно или примерно 5x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток и до точно или примерно 50x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (г/г В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и композиция включает от точно или примерно 5x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно, и по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции являются CD3⁺ клетками, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в составе имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (г/г В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и композиция включает от точно или примерно 5x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100x10⁶ CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и, по меньшей

мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и/или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD8⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и композиция включает от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 50×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (г/г В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и композиция включает от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему количеству VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, меньше или меньше примерно 0,9.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (г/г В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, включающей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, где композиция включает CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и композиция включает от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и интегрированное количество копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 3,0 копий на диплоидный геном, включительно.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 2,5:1.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, до точно или примерно 50×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе,, композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе,, композиция может включать $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2 до примерно 2:1, от примерно 1:1,5 до примерно 1,5:1, или точно или примерно 1:1. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе,, композиция может включать $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:1 до примерно 2,5:1, от примерно 1,5:1 до примерно 2:1, точно или примерно 1,5:1 или точно или примерно 2:1. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать от точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать точно или примерно 50×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция может включать точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 93%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96% клеток в композиции

представляют собой CD3⁺ клетки. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 5% до точно или примерно 30%, необязательно, от точно или примерно 5% до точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно Аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или 10% до точно или примерно 15% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 15% до точно или примерно 20% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 20% и до точно или примерно 25% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 25% до точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, точно или примерно 5%, точно или примерно 10%, точно или примерно 15%, точно или примерно 20%, точно или примерно 25% или точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 80% до точно или примерно 85% CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой фенотип, подобный наивному или центральной памяти. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

В некоторых из любых вариантов осуществления в настоящем документе, маркер апоптоза представляет собой аннексин V. В некоторых из любых вариантов осуществления в настоящем документе, маркер апоптоза представляет собой активную каспазу 3.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции, которые имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, являются поверхностно-положительными в отношении маркера, экспрессируемого на Т-клетках, подобных

наивным или центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, маркер, экспрессируемый на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти, выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD27, CD28 и CCR7.

В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции, которые имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, имеют фенотип, выбранный из CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ или CD62L⁻CCR7⁺. В некоторых из любых вариантов осуществления, от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95%, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, выбранный из CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ или CD62L⁻CCR7⁺. В некоторых из любых вариантов осуществления, точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, выбранный из CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ или CD62L⁻CCR7⁺. В некоторых из любых вариантов осуществления, точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой CD27⁺CCR7⁺.

В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой CCR7⁺CD45RA⁺ или CCR7⁺CD45RA⁻. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой CCR7⁺CD45RA⁺ или CCR7⁺CD45RA⁻. В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой CCR7⁺CD45RA⁺ или CCR7⁺CD45RA⁻. В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, то есть CCR7⁺CD45RA⁺ или CCR7⁺CD45RA⁻. В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой CCR7⁺CD45RA⁺ или CCR7⁺CD45RA⁻.

В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых из любых вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере

осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции являются поверхностно-положительными в отношении маркера, экспрессируемого на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, маркер, экспрессируемый на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти, выбран из группы, состоящей из $CD45RA$, $CD27$, $CD28$ и $CCR7$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ и/или $CD62L^-CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95%, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ и/или $CD62L^-CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ и/или $CD62L^-CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере

общему количеству VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,8 до точно или примерно 0,7. В любом из вариантов осуществления, в настоящем документе отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему количеству VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,7 до точно или примерно 0,6. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, отношение числа копий интегрированного вектора (iVCN) к общему количеству VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,6 до точно или примерно 0,5. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, отношение числа копий интегрированного вектора (iVCN) к общему количеству VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,5 до точно или примерно 0,4.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, интегрированное количество копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 3,0 копиями на диплоидный геном, включительно.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,8 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, интегрированное количество копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,8 копии на диплоидный геном до 1,0 копии на диплоидный геном, включительно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 1,0 копии на диплоидный геном до 1,5 копий на диплоидный геном, включительно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 1,5 копий на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, t/r В-клеточная NHL выбрана из группы, состоящей из диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), необязательно Неуточненной DLBCL (DLBCL NOS; включая de novo или трансформированную DLBCL, *например*, из фолликулярной лимфомы или лимфомы маргинальной зоны); В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (HGBCL), необязательно HGBCL с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL; первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL); и фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3b (FL3B).

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL выбрана из группы, состоящей из: диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), необязательно, неуточненной DLBCL; трансформированной DLBCL, необязательно

трансформированной DLBCL из фолликулярной лимфомы или лимфомы маргинальной зоны; В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (HGBCL), необязательно, HGBCL с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL; первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL); и фолликулярной лимфомы (FL), необязательно фолликулярной лимфомы степени 3b (FL3B).

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой неутонченную диффузную В-крупноклеточную лимфому. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому de novo. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому, трансформированную из фолликулярной лимфомы. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому, трансформированную из лимфомы маргинальной зоны. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности (HGBCL). В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с гистологией DLBCL. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой лимфому с двумя транслокациями или лимфому с тремя транслокациями. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой фолликулярную лимфому. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой фолликулярную лимфому степени 3b. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL подтверждена гистологически.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения или он стал невосприимчивым к: (i) двум или нескольким предшествующим терапиям В-клеточной NHL и/или (ii) терапии трансплантацией аутологичных стволовых клеток (ASCT).

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым после лечения двумя или несколькими предшествующими терапиями В-клеточной NHL. В

любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым после лечения тремя или несколькими предшествующими терапиями В-клеточной NHL. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, две или несколько предшествующих терапий г/г В-клеточной NHL не включают другую дозу клеток, экспрессирующих CAR.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, две или несколько предшествующих терапий В-клеточной NHL включают антрациклин и агент, таргетирующий CD20. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, две или несколько предшествующих терапий В-клеточной NHL не включают те, что применялись для предшествующей индолентной лимфомы. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, две или несколько предшествующих терапий В-клеточной NHL не включают антрациклин, назначаемый для индолентной DLBCL. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, две или несколько предшествующих терапий В-клеточной NHL включают агент, таргетирующий CD20, и две или несколько предшествующих терапий В-клеточной NHL исключают антрациклин, если он назначается для предшествующей индолентной лимфомы. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, агент, таргетирующий CD20, содержит анти-CD20 моноклональное антитело. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, агент, таргетирующий CD20, включает ритуксимаб.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым после лечения с помощью аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT). В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется рецидивирующая и/или не поддающаяся лечению DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, ASCT не дает объективный ответ (частичный ответ (PR) или лучше). В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, после ASCT заболевание субъекта прогрессировало.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта было идентифицировано агрессивное заболевание или заболевание с высоким риском, или субъект имел плохой прогноз. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта было выявлено химиорезистентное заболевание или хроническое или рецидивирующее заболевание после химиотерапии. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, у субъекта имеется патологически подтвержденное вторичное поражение центральной нервной системы (ЦНС) злокачественным новообразованием. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, у субъект не имеет

поражение только центральной нервной системы (ЦНС) злокачественным новообразованием.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект ранее не получал терапию CAR T-клетками или генетически модифицированными T-клетками. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект ранее не получал CD-19 таргетную терапию, такую как анти-CD19 моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, способ дополнительно включает получение образца лейкофереза от субъекта для изготовления композиции, содержащей сконструированные T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал терапевтическую дозу кортикостероида, необязательно, в течение точно или примерно 14 дней до момента проведения лейкофереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал цитотоксический химиотерапевтический агент, который не является лимфотоксическим химиотерапевтическим агентом или интратекальной терапией, в течение точно или примерно 7 дней до момента проведения лейкофереза. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект не получал лимфотоксический химиотерапевтический агент в течение точно или примерно 4 недель до момента проведения лейкофереза. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект не получал иммунодепрессивную терапию в течение точно или примерно 4 недель до момента проведения лейкофереза. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект не подвергался облучению в течение точно или примерно 6 недель до момента проведения лейкофереза. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъекту не была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток в течение точно или примерно 3 месяцев до момента проведения лейкофереза.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект не достиг объективного ответа (частичного ответа (PR) или лучше) в ответ на предшествующую терапию.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные T-клетки, субъекта оценивают на наличие лимфомы, связанной или вовлекающей с поражением центральной нервной системы (ЦНС), или вторичной лимфомы ЦНС. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные T-клетки, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий: адекватную сердечную функцию, необязательно с фракцией выброса левого желудочка (LVEF) точно или примерно 40%, больше 40% или больше примерно 40%; и/или адекватную функцию почек, необязательно с расчетным клиренсом креатинина точно или примерно 45 мл/мин, больше 45 мл/мин или больше примерно 45 мл/мин; и/или

адекватную функцию печени, необязательно с аспаратаминотрансферазой (AST) и аланинаминотрансферазой (ALT) больше чем в 2,5 раза выше верхней границы нормы (ULN) и общим билирубином меньше чем в 1,5 раза выше ULN; и/или адекватную функцию легких, необязательно с одышкой \leq степени 1 по STCAE и насыщением кислородом (например, $\text{SaO}_2 \geq 92\%$) при комнатном воздухе. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий абсолютное количество нейтрофилов (ANC) точно или примерно $1,0 \times 10^9$ клеток/л, больше $1,0 \times 10^9$ клеток/л или больше примерно $1,0 \times 10^9$ клеток/л без поддержки фактора роста. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий тромбоциты точно или примерно 50×10^9 клеток/л, больше 50×10^9 клеток/л, или больше примерно 50×10^9 клеток/л без трансфузионной поддержки.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект получил переходную химиотерапию между моментом проведения лейкафереза для получения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, и введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект получил переходную химиотерапию для контроля заболевания после предшествующей терапии.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий общее состояние по оценке Восточной объединенной онкологической группы (ECOG PS) 0 или 1. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий высокую исходную опухолевую массу, например, измеренную по сумме произведений перпендикулярных диаметров (SPD), или высокое содержание лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке, такое как $\text{LDH} \geq 500$ ед/л. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, во время или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта имеется заболевание, положительное по результатам позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, способ дополнительно включает, перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, идентификацию или выбор субъекта для введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, перед введением субъект был предварительно пролечен противолимфомной терапией. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, способ дополнительно включает,

непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, введение субъекту противолимфомной терапии, где противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, введение композиции, содержащей сконструированные Т-клетки и/или противолимфомную терапию, осуществляется амбулаторно. В некоторых из любых вариантов осуществления, введение композиции осуществляется амбулаторно, необязательно, если не или до тех пор, пока у субъекта не появится устойчивая лихорадка или лихорадка, которая не снижается или не была снижена или не снизилась на больше чем 1°C после лечения жаропонижающим средством. В некоторых из любых вариантов осуществления, введение композиции осуществляется без госпитализации субъекта и/или без пребывания в больнице в течение ночи, необязательно, если не или до тех пор, пока субъект не начнет демонстрировать устойчивую лихорадку или лихорадку, которая не снижается или не была снижена или не снизилась больше чем на 1°C после лечения жаропонижающим средством. В некоторых из любых вариантов осуществления, введение композиции не требует госпитализации или пребывания в больнице в течение ночи, необязательно, если не или до тех пор, пока субъект не начнет демонстрировать устойчивую лихорадку или лихорадку, которая не снижается или не была снижена или не снизилась больше чем на 1°C после лечения жаропонижающим средством.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, противолимфомная терапия включает введение флударабина в дозе 30 мг/м² площади поверхности тела субъекта, ежедневно, и циклофосфамида в дозе 300 мг/м² площади поверхности тела субъекта, ежедневно, каждый в течение 3 дней. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, вводят в период от точно или примерно 48 часов до точно или примерно 9 дней, включительно, после завершения противолимфомной терапии. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, клиренс креатинина у субъекта составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 30 мл/мин при проведении противолимфомной терапии.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, до начала введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъекту не вводили агент или лечение для лечения, профилактики, снижения или ослабления нейротоксичности и/или синдрома высвобождения цитокинов или их риска. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, способ дополнительно включает введение субъекту агента или лечения для лечения, профилактики, уменьшения или ослабления нейротоксичности и/или синдрома высвобождения цитокинов или их риска. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, агент представляет собой или содержит анти-IL-6 антитело, антитело к рецептору IL-6 или стероид. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, агент представляет собой или содержит тоцилизумаб или метилпреднизолон.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, Т-клетки

представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR); по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR, демонстрируют CR, который сохраняется в течение точно или больше 3 месяцев или в течение точно или больше 6 месяцев; и/или, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR к одному месяцу и/или к 3 месяцам, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования, в течение точно или больше 3 месяцев и/или в течение точно или больше 6 месяцев и/или в течение точно или больше 9 месяцев после достижения CR; и/или, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR); по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR, демонстрируют OR, который сохраняется в течение точно или больше 3 месяцев или в течение точно или больше 6 месяцев; и/или, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев и/или в течение точно или больше 6 месяцев после достижения OR.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR); по меньшей мере, 60% субъектов, достигших CR, демонстрируют CR, который длится в течение точно или больше 6 месяцев; и/или по меньшей мере, 60% субъектов, достигших CR через 1 месяц и/или через 3 месяца, сохраняют ответ, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение точно или больше 6 месяцев после достижения CR; и/или, по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR); по меньшей мере, 60% субъектов, достигших OR, демонстрируют OR, который сохраняется в течение точно или больше 6 месяцев; и/или, по меньшей мере, 50% субъектов, достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 6 месяцев после достижения OR.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CR или OR являются долговечными в течение больше 3 месяцев или больше 6 месяцев; и/или, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают CR, который сохраняется в течение больше 3 месяцев или больше 6 месяцев; и/или, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу и достигших CR, остаются в CR или остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев, или в течение точно или больше 6 месяцев или в течение точно или больше 9 месяцев; и/или, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу, которые достигли CR через один месяц и/или через 3

месяца, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение точно или больше 3 месяцев, и/или в течение точно или больше 6 месяцев, и/или в течение точно или больше 9 месяцев; и/или, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR); по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов достигают OR, который сохраняется в течение точно или больше 3 месяцев или в течение точно или больше 6 месяцев; и/или по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу и достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев и/или в течение точно или больше 6 месяцев.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, клетки являются аутологичными по отношению к субъекту, и никакое минимальное абсолютное количество лимфоцитов (ALC) для афереза не требуется и/или не указывается для проведения терапии; и/или клетки получены с помощью процесса, который, по меньшей мере, у 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% субъектов имеющих В-клеточную NHL, способны генерировать клеточный продукт для введения по способу.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR) или ремиссии заболевания ЦНС; по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR, остаются в CR в течение точно или больше 3 месяцев или в течение точно или больше 6 месяцев; и/или, по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR или ремиссии заболевания ЦНС через один месяц и/или через 3 месяца, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение точно или больше 3 месяцев, и/или в течение точно или больше 6 месяцев, и/или в течение точно или больше 9 месяцев; и/или, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR) или ремиссии заболевания ЦНС; по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR, в течение точно или больше 3 месяцев или в течение точно или больше 6 месяцев; и/или по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR или ремиссии заболевания ЦНС, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев и/или в течение точно или больше 6 месяцев; и/или поражение головного мозга уменьшается в размере или объеме на больше или больше примерно 25%, 50%, 75% или больше; и/или уменьшение, или ремиссия, или устранение заболевания ЦНС достигается у, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, больше или больше примерно 50%, примерно 60%, примерно 70% или примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3

степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше, и/или больше 40%, или 50%, или 55% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какую-либо нейротоксичность или CRS. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, больше или больше примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, больше 95% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют CRS 3 степени или выше. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, больше 85% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, больше или больше примерно 30%, 35%, 40% или 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какой-либо степени синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и/или, по меньшей мере, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют начало CRS ранее чем через 3 дня после начала введения и/или не демонстрируют нейротоксичность ранее, чем через 5 дней после начала введения; и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, находится точно или после медианы пика или медианы времени до разрешения CRS у субъектов, получавших лечение по способу, и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, больше, чем точно или примерно 8, 9, 10 или 11 дней.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, больше или больше примерно 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какую-либо степень синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и/или, по меньшей мере, точно или примерно 45% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют начало CRS ранее, чем через 3 дня после начала введения, и/или не демонстрируют начало нейротоксичности ранее, чем через 5 дней после начала введения; и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, находится точно или после медианы пика или медианы времени до разрешения CRS у субъектов, получавших лечение по способу, и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, больше, чем точно или примерно 8 дней.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR); по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR); и больше или больше примерно 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какую-либо степень синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и больше или больше примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов

(CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для антигена, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая необязательно представляет собой 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, которая необязательно представляет собой CD3дзета; в некоторых вариантах осуществления, CAR может включать, по порядку, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для антигена, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM; или CAR может включать внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, включающий цепь CD3-дзета (CD3 ζ) и костимулирующую сигнальную область, которая представляет собой сигнальный домен 4-1BB. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из CD3дзета.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая необязательно представляет собой 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, которая необязательно представляет собой CD3дзета; CAR содержит, по порядку, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM; или CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с CD19, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий цепь CD3-дзета (CD3 ζ) и костимулирующий сигнальный участок, который представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая представляет собой 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, которая представляет собой CD3дзета.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, scFv может включать аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) и/или аминокислотную последовательность DYGVVS (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, шесть последовательностей CDR (CDRL1-L3 и CDRH1-H3) scFv могут включать аминокислотные последовательности RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), SRLHSGV (SEQ ID NO: 36), GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), DYGVVS (SEQ ID NO: 38), VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления, scFv включает переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63. В некоторых вариантах осуществления, шесть последовательностей CDR (CDRL1-L3 и CDRH1-H3) scFv могут включать последовательность CDRL1 FMC63, последовательность CDRL2 FMC63, последовательность CDRL3 FMC63, последовательность CDRH1 FMC63, последовательность CDRH2 FMC63 и последовательность CDRH3 FMC63. В некоторых вариантах осуществления, scFv может представлять собой scFv, который связывается с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с любой из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает, по порядку, VH, линкер, необязательно включающий линкер, представленный в SEQ ID NO: 24, и VL. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, scFv включает по порядку VL, линкер, необязательно включающий линкер, представленный в SEQ ID NO: 24, и VH. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, scFv представлен в SEQ ID NO: 43.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, scFv может содержать аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) и/или аминокислотную последовательность DYGVVS (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность CDRL1 FMC63, последовательность CDRL2 FMC63, последовательность CDRL3 FMC63, последовательность CDRH1 FMC63, последовательность CDRH2 FMC63 и

последовательность CDRH3 FMC63. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, VH, линкер SEQ ID NO: 24 и VL. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, CD19-направленный scFv связывается с тем же эпитопом, что и любой из вышеперечисленных эпитопов, или конкурирует за связывание с ним.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, scFv может включать переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности к ней.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, костимулирующая сигнальная область представляет собой сигнальный домен 4-1BB. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, костимулирующий домен может включать SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности к ней. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, первичный сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3зета. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, первичный сигнальный домен может включать SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, представляет собой сигнальный домен 4-1BB. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности к ней.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе,

цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, представляет собой сигнальный домен CD3дзета. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из молекулы, содержащей первичный сигнальный ITAM, содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2, последовательности SEQ ID NO: 30, последовательности SEQ ID NO: 31, последовательности SEQ ID NO: 32, последовательности SEQ ID NO: 33, последовательности SEQ ID NO: 34 или варианта любого из вышеперечисленных, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности к ним. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR может дополнительно включать спейсер между трансмембранным доменом и scFv. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который включает или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир IgG4 или его модифицированную версию. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, спейсер имеет или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или варианта любой из предыдущих, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, спейсер может включать или состоять из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который может включать или состоять из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или включать примерно 15 аминокислот или меньше. В некоторых вариантах осуществления, спейсер не включает внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8 и может включать или состоять из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно,

шарнира IgG4 или его модифицированной версии, и/или включает примерно 15 аминокислот или меньше, и не включает внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот и/или включает или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4 или его модифицированной версии. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет или может состоять из последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: NO: 33, SEQ ID NO: 34 или варианта любого из вышеуказанных, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, спейсер может включать или состоять из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин. В некоторых из вариантов осуществления, костимулирующий домен может включать SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности к ней. В некоторых из представленных вариантов осуществления, первичный сигнальный домен может включать SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности к ним. В некоторых вариантах осуществления, scFv может включать аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36), аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), аминокислотную последовательность DYGVVS (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления, scFv включает вариабельную область тяжелой цепи FMC63 и вариабельную область легкой цепи FMC63. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает шесть CDR, которые включают последовательность CDRL1 FMC63, последовательность CDRL2 FMC63, последовательность CDRL3 FMC63, последовательность CDRH1 FMC63, последовательность CDRH2 FMC63 и последовательность CDRH3 FMC63. В некоторых вариантах осуществления, scFv представляет собой scFv, который связывается с тем же эпитопом, что и, или конкурирует за связывание с любой из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает, по порядку, VH, линкер, необязательно линкер, включающий SEQ ID NO: 24, и VL. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает, по порядку, VL, линкер, необязательно линкер, включающий SEQ ID NO: 24, и VH. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность scFv представлена как SEQ ID NO: 43.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, (i) scFv может

содержать аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36), аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), аминокислотную последовательность DYGVV (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYYN SALKS (SEQ ID NO: 39) и аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40), так, что scFv может содержать аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 43; (ii) спейсер может представлять собой полипептидный спейсер, который (a) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, состоящей примерно из 15 аминокислот или меньше, и содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, шарнира IgG4 или его модифицированной версии, необязательно, где спейсер может содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 1 или последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2; (iii) костимулирующий домен может содержать SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности; и (iv) первичный сигнальный домен может содержать SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющие, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR представляет собой CAR, в котором (i) scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную как SEQ ID NO: 43; (ii) спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 или последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2; (iii) цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, представляет собой костимулирующий домен, который содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности; и (iv) цитоплазматический сигнальный домен, полученный из молекулы, содержащей первичный сигнальный ИТАМ, представляет собой цитоплазматический сигнальный домен, содержащий SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или их вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, CAR представляет собой CAR, в котором (i) внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи FMC63 и вариабельную область легкой цепи FMC63; спейсер представляет собой полипептидный спейсер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, содержит SEQ ID NO: 12; и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из молекулы, содержащей первичный сигнальный ИТАМ, содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который может включать последовательность SEQ ID NO: 1; костимулирующий домен может включать SEQ ID NO: 12; первичный сигнальный домен может включать SEQ ID NO: 13, 14 или 15; антигенсвязывающий домен может включать scFv, который включает переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композицию клеток вводят парентерально, необязательно, внутривенно. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, субъектом является человек.

В конкретных вариантах осуществления, любого из предложенных способов CAR содержит, по порядку от N-конца к C-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO: NO:1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO:8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO:12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), представленный в SEQ ID NO:13.

В некоторых из любых вариантов осуществления, композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, получают с помощью производственного процесса, включающего: (i) воздействие на вводимую композицию, содержащую первичные Т-клетки, стимулирующим реагентом, содержащим реагент олигомерных частиц, содержащий множество молекул мутеина стрептавидина, в условиях стимулирования Т-клеток, тем самым создавая стимулированную популяцию, где реагент на основе олигомерных частиц содержит первый агент, содержащий анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй агент, содержащий анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; (ii) введение в Т-клетки стимулированной популяции гетерологичного полинуклеотида, кодирующего CAR, который таргетирует CD19, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток; (iii) инкубацию популяции трансформированных клеток до 96 часов; и (iv) сбор Т-клеток из популяции трансформированных клеток с получением, таким образом, композиции сконструированных клеток, где сбор осуществляют в течение от 24 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, вводимая композиция содержит аутологичные Т-клетки, взятые у субъекта, например, обогащенные селекцией на основе иммуноаффинности в отношении CD3 Т-клеток или CD4 и CD8 Т-клеток из образца крови или афереза (например, лейкоцитафереза) от субъекта.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция, включающая сконструированные Т-клетки, производится с помощью производственного процесса, включающего воздействие на вводимую композицию, включающую первичные Т-клетки, стимулирующим реагентом, включающим реагент на основе олигомерных частиц, включающий множество молекул авидина, стрептавидина, мутеина авидина или мутеина стрептавидина в условиях, стимулирующих Т-клетки, тем самым создавая

стимулированную популяцию, где стимулирующий реагент способен активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, производственный процесс может дополнительно включать введение в Т-клетки стимулируемой популяции гетерологичного полинуклеотида, кодирующего CAR, который таргетирует CD19, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, реагент на основе олигомерных частиц содержит первый агент, содержащий анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй агент, содержащий анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых из любых вариантов осуществления, анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, и анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab. В некоторых из любых вариантов осуществления, первый агент и второй агент, каждый, содержат стрептавидин-связывающий пептид, который обратимо связывает первый агент и второй агент с реагентом олигомерных частиц, необязательно где стрептавидин-связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 78-82. В некоторых из любых вариантов осуществления, молекула мутеина стрептавидина представляет собой тетрамер мутеина стрептавидина, содержащий аминокислотные остатки Val44-Thr45-Ala46-Arg47 или Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, необязательно где мутеин стрептавидина содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 69, 84, 87, 88, 90, 85 или 59. В некоторых вариантах осуществления, реагент на основе олигомерных частиц содержит от 1000 до 5000 тетрамеров мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых из любых вариантов осуществления, способ дополнительно включает, перед сбором клеток, добавление биотина или аналога биотина после или во время инкубации.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, производственный процесс может дополнительно включать инкубацию популяции трансформированных клеток в течение до 96 часов. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, инкубацию проводят в минимальной среде, в которой отсутствует один или несколько рекомбинантных цитокинов. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, производственный процесс может дополнительно включать сбор Т-клеток из популяции трансформированных клеток с получением, таким образом, композиции сконструированных клеток. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят в момент времени от 24 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят в момент времени от 48 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят в момент времени, когда

интегрированный вектор обнаруживается в геноме, но до достижения стабильного числа копий интегрированного вектора (iVCN) на диплоидный геном. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят до того, как общее количество жизнеспособных клеток при сборе больше чем или больше чем примерно в три раза превышает общее количество жизнеспособных клеток стимулируемой популяции. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят в момент времени, когда общее количество жизнеспособных клеток при сборе точно или примерно в три раза превышает, точно или примерно в два раза превышает, или является таким же или примерно таким же, как общее количество жизнеспособных клеток стимулируемой популяции. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят в момент времени, когда доля $CD27^+CCR7^+$ клеток составляет больше или больше примерно 50% от общего количества Т-клеток в популяции трансформированных клеток, общего количества $CD3^+$ Т-клеток в популяции, общего количества $CD4^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток или общего количества $CD8^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции трансформированных клеток. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, сбор проводят в то время, когда доля клеток $CD45RA^+CCR7^+$ и $CD45RA^-CCR7^+$ составляет больше или больше примерно 60% от общего количества Т-клеток в популяции трансформированных клеток, общего количества $CD3^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток, общего количества $CD4^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток или общего количества $CD8^+$ Т-клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции трансформированных клеток.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, клетки вводимой композиции получают в процессе производства для получения выходной композиции, (i) содержащей сконструированные $CD4^+$ Т-клетки и сконструированные $CD8^+$ Т-клетки, и (ii) обладающей заданной характеристикой, где итерации производственного процесса дают множество выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, при проведении среди множества различных индивидуальных субъектов, где заданная характеристика выходной композиции среди множества выходных композиций выбрана из: средней доли клеток фенотипа памяти во множестве выходных композиций, составляющей от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 40% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; средняя доля клеток фенотипа центральной памяти во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; средняя доля клеток, которые представляют собой $CD27^+$, $CD28^+$, $CCR7^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD3^+$, $CD95^+$, гранзим В- и/или $CD127^+$ во множестве выходных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от

примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; средняя доля клеток, которые являются CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+, во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; средняя доля CD4+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD4+ Т-клетках, необязательно, CD4+CAR+Т-клетках, во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; средняя доля CD8+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD8+ Т-клетках, необязательно CD8+ CAR+Т-клетках, во множестве полученных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; и/или средняя доля Т-клеток центральной памяти, необязательно CD4+ Т-клеток центральной памяти и CD8+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных Т-клетках, необязательно CAR+ Т-клетках во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%. В некоторых вариантах осуществления, множество выходных композиций получают из биологических образцов человека.

В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, вводимая композиция производится с помощью производственного процесса для получения готовой композиции, демонстрирующей заданную характеристику, необязательно, пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR, в выходной композиции, составляющее, по меньшей мере, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 97%, примерно 99%, примерно 100% или составляет 100% биологических образцов человека, в которых он проводится, среди множества различных индивидуальных субъектов. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, композиция, включающая генетически модифицированные клетки, не содержит остаточные микроносители после производственного процесса. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, В-клеточная NHL представляет собой рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-клеточную NHL). В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, заданной характеристикой является пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR, в выходной композиции.

В настоящем документе также представлено готовое изделие, включающее композицию, включающую генетически сконструированные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), таргетирующий CD19, и инструкции по введению

композиции клеток в соответствии с любым из представленных здесь способов.

Краткое описание чертежей

На **ФИГ. 1** показаны типовые количественные оценки, определенные с помощью проточной цитометрии клеточной чистоты Т-клеточных композиций, полученных в результате процессов конструирования без размножения с использованием различных типов доноров (эталон, пациент). Клетки конструируют так, чтобы они экспрессировали анти-CD19 CAR (CD19), или подвергают ложной трансдукции (имитация). Определяют долю CD3⁺ клеток в живых CD45⁺ клетках (левая панель), долю NK клеток в живых CD45⁺ клетках (средний график) и долю CD19⁺ клеток в живых CD45⁺ клетках (правая панель).

На **ФИГ. 2-3** показаны типовые количественные оценки клеточных фенотипов, определенные с помощью проточной цитометрии, для процессов конструирования с размножением и без размножения с использованием различных типов доноров (эталон, пациент). Клетки конструируют так, чтобы они экспрессировали анти-CD19 CAR (CD19), или подвергают ложной трансдукции (имитация). На **ФИГ. 2** показаны доли CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺ клеток в живых CD45⁺ клетках (левая панель) и доли CD8⁺CAR⁺ и CD4⁺CAR⁺ клеток в живых CD45⁺ клетках (правая панель). На **ФИГ. 3** показано соотношение CD4⁺ клеток к CD8⁺ клеткам и CD4⁺CAR⁺ клеток к CD8⁺CAR⁺ клеткам.

На **ФИГ. 4** показаны типовые количественные оценки, определенные с помощью проточной цитометрии, жизнеспособности клеток Т-клеточных композиций, полученных в результате процессов конструирования без размножения с использованием различных типов доноров (эталон, пациент). Клетки конструируют так, чтобы они экспрессировали анти-CD19 CAR (CD19), или подвергают ложной трансдукции (имитация). Определяют долю aCas3⁺ клеток в CD3⁺ клетках.

На **ФИГ. 5A** показан пример взаимосвязи между числом копий на клетку среди общего числа клеток, оцененной с помощью стандартного VCN (без гель-электрофореза в импульсном поле или PFGE) и iVCN (с PFGE) в клеточных композициях, полученных из первичных Т-клеток от разных доноров-людей, которые были сконструированы для экспрессирования CAR с использованием расширенного процесса (○) или не расширенного процесса (●). На **ФИГ. 5B-5C** показана взаимосвязь между числом копий на клетку в клеточных композициях, оцененных с помощью стандартных VCN (**ФИГ. 5B**) или iVCN (**ФИГ. 5C**), и поверхностной экспрессией CAR, на что указывает доля CAR-экспрессирующих CD3⁺ клеток (%CD3⁺CAR⁺) среди жизнеспособных CD45⁺ клеток, оцененная с помощью проточной цитометрии.

На **ФИГ. 6A-6B** показаны типовые доли клеточных фенотипов, полученные в результате процессов конструирования с размножением и без размножения с использованием различных типов доноров (эталон, пациент). Клетки конструируют так, чтобы они экспрессировали анти-CD19 CAR (CD19), или подвергают ложной трансдукции (имитация). На **ФИГ. 6A** показаны типовые доли CD45RA⁺CCR7⁺ клеток в aCas-CD8⁺CAR⁺ и aCas-CD4⁺CAR⁺ клетках (левая верхняя панель), CD45RA⁺CCR7⁺ клеток в

aCas-CD8+CAR+ и aCas-CD4+CAR+ клетках (правая верхняя панель), CD45RA-CCR7- клеток в aCas-CD8+CAR+ и aCas-CD4+CAR+ клетках (левая нижняя панель) и CD45RA+CCR7+ клеток в aCas-CD8+CAR+ и aCas-CD4+CAR+ клетках (правая нижняя панель). На **ФИГ. 6В** показаны типовые доли CD27+CCR7+ клеток в aCas-CD8+CAR+ и aCas-CD4+CAR+ клетках.

На **ФИГ. 7А-7Д** показаны типовые количественные оценки клеточных фенотипов, как указано, определенные с помощью проточной цитометрии для подходящих донору процессов конструирования с размножением и без размножения, где клетки конструируют для экспрессии анти-CD19 CAR, до долговременной CAR-зависимой стимуляции (первичные) и после длительной CAR-зависимой стимуляции (после 9-14 дней постоянной стимуляции агонистическим анти-идиотипическим антителом) (вторичные). DP1=пациент 1 с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL); DP2=пациент 2 с DLBCL; HD1=здоровый донор 1; MP1=пациент 1 с мантийноклеточной лимфомой.

На **ФИГ. 8А-8F** показана типовая пролиферативная способность *in vitro* клеток, полученных в процессах с размножением и без размножения после долговременной анти-CD19-CAR-зависимой стимуляции анти-ID антителом. Измеряют жизнеспособность (**ФИГ. 8А**) и размер клеток (**ФИГ. 8В**). Кратность изменения размножения рассчитывают как ежедневные подсчеты, деленные на начальное количество клеток (**ФИГ. 8С**), и затем трансформируют в площадь под кривой (AUC) для сравнения либо для отдельных групп (**ФИГ. 8D**), либо для производственного процесса (**ФИГ. 8Е**, статистическая значимость с критерием Манна-Уитни; * $p < 0,05$). Кратность размножения для отдельного донора между производственными платформами также непосредственно измеряют путем взятия кратности ежедневного размножения композиций, полученных в результате не расширенного процесса, и деления их на контрольные значения для соответствующего донора для композиций, полученных в результате расширенного процесса (**ФИГ. 8F**).

На **ФИГ. 9А-9В** показан типовой цитолитический потенциал анти-CD19 CAR Т-клеток, сконструированных с помощью процессов с размножением и без размножения до (**ФИГ. 9А**) и после хронической стимуляции (**ФИГ. 9В**) при различных соотношениях эффектора к мишени. Значения площади под кривой (AUC) сравнивают либо для отдельных групп (левые панели на **ФИГ. 9А** и **ФИГ. 9В**), либо в зависимости от производственного процесса (правые панели на **ФИГ. 9А** и **ФИГ. 9В**, статистическая значимость с критерием Манна-Уитни); * $p < 0,05$).

На **ФИГ. 10** показано типовое продуцирование цитокинов клетками, сконструированными с помощью процессов с размножением и без размножения, измеренная по полифункциональной оценке с использованием проточной цитометрии на 0 и 10 день хронической антигенной стимуляции. Статистическую значимость оценивают по Манну-Уитни, * $p < 0,05$.

На **ФИГ. 11А-11В** показан пример опухолевой массы и циркулирующих CAR-Т-клеток в модели лейкоза Nalm6 с течением времени после обработки композициями анти-CD19 CAR-Т-клеток, полученными в результате подходящих для донора процессов

конструирования с размножением и без размножения. На **ФИГ. 11А** показан рост опухоли с -1 дня (до лечения) примерно до 25 дня после лечения, рассчитанный по площади под кривой (AUC) биолюминесценции (BLI) для каждой группы. На **ФИГ. 11В** показано количество циркулирующих анти-CD19 CAR-T-клеток на 1 мкл крови между примерно 5 днем и примерно 20 днем после лечения для каждой группы.

На **ФИГ. 12А-12В** показан пример опухолевой массы и циркулирующих CAR-T-клеток в модели лимфомы Раджи с течением времени после обработки композициями анти-CD19 CAR-T-клеток, полученными в результате подходящих для донора процессов конструирования с размножением и без размножения. На **ФИГ. 12А** показан рост опухоли с -1 дня (до лечения) примерно до 80 дня после лечения, рассчитанный по площади под кривой (AUC) BLI для каждой группы с более высокими (левая панель) и более низкими (правая панель) дозами композиций анти-CD19 CAR-T клеток, полученных в результате подходящих для донора процессов конструирования с размножением и без размножения. Изменения яркости BLI (фотоны/секунду; ось ординат) показаны для всех групп (опухолевая масса). На **ФИГ. 12В** показано количество циркулирующих анти-CD19 CAR-T-клеток на 1 мкл крови в указанные моменты времени после лечения для каждой группы (без размножения, NE; с размножением, E). Абсолютные значения в каждый момент времени показаны как групповые средние значения. Различия сравнивают с помощью U-критерия Манна-Уитни; *p < 0,05.

Подробное описание

В настоящем документе предложены способы и применение сконструированных клеток (например, T-клеток) и/или их композиций для лечения субъектов, страдающих заболеванием или состоянием, которое обычно представляет собой или включает рак или опухоль, такую как лимфома, наиболее конкретно, В-клеточная злокачественная опухоль, представляющая собой неходжкинскую лимфому (NHL), включая агрессивные подтипы NHL. В конкретных аспектах, субъект имеет агрессивную NHL или NHL высокого риска. В вариантах осуществления предложенных способов, терапевтические композиции T-клеток, содержащие сконструированные клетки, вводят субъекту, страдающему NHL, например, с помощью адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная T-клеточная терапия. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов, T-клетки конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), который направлен против кластера дифференциации 19 (CD19). В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой В-крупноклеточную лимфому. В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или ее подтип. В некоторых аспектах, способы и применения предложены для или позволяют достичь улучшенного ответа, и/или больше устойчивых ответов, или эффективности, и/или сниженного риска токсичности или других побочных эффектов, например, в определенных группах субъектов, получающих лечение, по сравнению с некоторыми альтернативными способами. В некоторых вариантах осуществления,

способы выгодны за счет введения определенного количества или относительного количества сконструированных клеток, введения определенных соотношений конкретных типов клеток, введения клеток с особенно высокой долей менее дифференцированных клеток (например, подобных наивным или клеток центральной памяти или клеток в состоянии ранней дифференциации, таких как клетки CCR7+CD27+), лечения определенных популяций пациентов, таких как пациенты с определенным профилем риска, стадией и/или предшествующим лечением в анамнезе, и/или или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления, способы и применения включают введение субъекту Т-клеток, экспрессирующих генетически сконструированные (рекомбинантные) рецепторы клеточной поверхности при адоптивной клеточной терапии, которые обычно представляют собой химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), распознающие CD19, экспрессируемый, ассоциированный с и/или специфичный для NHL и/или типа клеток, из которых они получены. Клетки обычно вводят в композиции, составленной для введения; способы обычно включают введение субъекту одной или нескольких доз клеток, где доза(ы) может(гут) включать конкретное количество или относительное количество клеток или сконструированных клеток. В некоторых случаях, CD19-направленные CAR+ сконструированные клетки в композиции включают определенное соотношение или композиции из двух или нескольких подтипов в композиции, например CD4 к CD8 Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, композиции клеток для применения или введения в предложенных способах включают первичные Т-клетки, сконструированные для экспрессии CD19-направленного CAR, которые (i) содержат низкую долю (например, меньше 40%, меньше 30%, меньше 20% или меньше 10%) истощенных клеток и/или клеток, которые демонстрируют маркеры или фенотипы, связанные с истощением; и/или (ii) содержат относительно высокую долю (например, больше 50%, больше 60%, больше 70%, больше 80% или больше 90%) Т-клеток, подобных памяти, таких как подобные наивным Т-клетки, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки долговременной памяти. В представленных вариантах осуществления, характеристики композиций и предложенных способов приводят к улучшенной или усиленной выживаемости, размножению, жизнестойкости и/или противоопухолевой активности по сравнению со способами, включающими введение других CD19-направленных CAR-Т-клеточных терапий, которые содержат больше высокую долю истощенных клеток и/или большее количество клеток, которые демонстрируют фенотипы, связанные с истощением, и/или которые содержат более низкую долю определенных Т-клеток, таких как подобные наивным Т-клетки, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки долговременной памяти. В предложенных вариантах осуществления, характеристики композиций и предложенных способов приводят к улучшенной терапевтической эффективности, например, увеличению доли пациентов, достигших полного ответа (CR), по сравнению со способами, включающими введение других CD19-направленных CAR Т-клеточных терапий, которые содержат более высокую долю истощенных клеток и/или большее количество клеток, которые демонстрируют

фенотипы, связанные с истощением, и/или которые содержат более низкую долю определенных Т-клеток, таких как подобные наивным Т-клетки, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки долговременной памяти. В предложенных способах, характеристики композиций и предложенных способов приводят к улучшению клинической устойчивости терапевтического ответа, такого как CR, например, ответа, который сохраняется в течение некоторого периода времени от начала терапии, по сравнению со способами, включающими введение других CD19-направленных CAR Т-клеточных терапий, которые содержат более высокую долю истощенных клеток и/или большее количество клеток, которые демонстрируют фенотипы, связанные с истощением, и/или которые содержат более низкую долю Т-клеток, подобных памяти, таких как подобные наивным Т-клетки, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки долговременной памяти. В конкретных вариантах осуществления, применение или введение предложенных композиций CD19-направленных CAR Т-клеток в предложенных способах может быть достигнуто с дозами клеток, которые больше чем в 2 раза ниже, например, в 5 или 10 раз ниже, чем дозы эталонных CD19-направленных CAR Т-клеточных композиций (например, сконструированных с таким же или подобным CAR, например, с тем же антигенсвязывающим доменом), но в которых эталонная CD19-направленная CAR Т-клеточная композиция содержит более высокую долю истощенных клеток и /или большее количество клеток, которые демонстрируют фенотипы, связанные с истощением, и/или содержит более низкую долю Т-клеток, подобных памяти, таких как подобные наивным Т-клетки, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки долговременной памяти. В некоторых вариантах осуществления, эталонная CD19-направленная CAR Т-клеточная композиция представляет собой композицию, которая продуцируется *ex vivo* с помощью процессов, включающих стадии культивирования клеток в условиях для размножения, которые вызывают пролиферацию клеток или удвоение клеточной популяции (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше удвоений клеток в популяции по сравнению с началом процесса) во время процесса продуцирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD19-направленные CAR Т-клеточные композиции для применения в предложенных способах и применениях получают с помощью относительно короткого процесса, который не включает стадию культивирования клеток в условиях размножения, разработанных для размножения или пролиферации клеток. Доступны различные процессы создания композиций, содержащих популяции генетически сконструированных Т-клеток, в том числе для получения генетически сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют CAR, которые обычно включают стадию, предназначенную для или с целью культивирования клеток для размножения или увеличения пролиферации клеток. Однако, в конкретных аспектах, некоторые из этих процессов могут потребовать длительного или относительно длительного времени для создания сконструированных клеток. Кроме того, в различных аспектах, некоторые существующие процессы могут различаться по количеству времени, необходимому для успешного получения сконструированных Т-клеток, подходящих для

клеточной терапии, что затрудняет координацию введения такой клеточной терапии. В некоторых аспектах, некоторые из этих процессов могут продуцировать клеточные популяции, которые включают относительно высокую долю или количество истощенных клеток, дифференцированных клеток или клеток с низкой активностью. Предложенные CD19-направленные CAR T-клеточные композиции для применения в предложенных способах решают одну или несколько из этих проблем.

В конкретных вариантах осуществления, предложенные способы используются в связи с процессом эффективного получения или создания сконструированных клеток, подходящих для использования в клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, предложенные композиции, содержащие CD19-направленные CAR сконструированные T-клетки получают с помощью процесса, не требующего каких-либо дополнительных стадий для размножения клеток, например, без работы блока размножения и/или без стадий, предназначенных для того, чтобы вызвать размножение клеток. В аспектах способов получения CD19-направленной CAR T-клеточной композиции, процессы включают одну или несколько стадий стимуляции и генной инженерии (например, трансформацию, трансдукцию или трансфекцию) T-клеток для получения популяции сконструированных T-клеток, которые можно собирать или составлять для использования в качестве композиции для клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, способы включают стадию трансдукции клеток вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CD19-направленный CAR. В некоторых аспектах, предложенные процессы приводят к стабильной интеграции гетерологичной нуклеиновой кислоты (экспрессированной из вирусного вектора) в геном клеток. В некоторых аспектах, предложенные способы создают сконструированные CD19-направленные CAR T-клетки с повышенной активностью по сравнению со сконструированными T-клеточными композициями, полученными с помощью альтернативных процессов, таких как те, которые включают размножение клеток.

В конкретных аспектах, продолжительность процессов получения предложенных композиций может быть измерена с момента, когда клетки, например, T-клетки входной клеточной популяции или входной композиции, впервые вступают в контакт или подвергаются воздействию стимулирующих условий (например, как описано в настоящем документе, например, в Разделе II-C), именуемых в настоящем документе как инициация стимуляции или стимуляция, а также упоминаемых в настоящем документе как воздействие стимулирующим реагентом, например, когда начинается воздействие стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность времени, необходимого для сбора или получения выходной популяции (также называемой в настоящем документе выходной композицией или композицией сконструированных клеток, например, сконструированных T-клеток), содержащей сконструированные клетки, измеряют с момента начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, продолжительность процесса составляет, составляет примерно или составляет меньше 120

часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов или 30 часов. В конкретных вариантах осуществления, продолжительность процесса составляет, составляет примерно или составляет меньше 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или одного дня. В конкретных вариантах осуществления, сконструированные клетки, например, клетки выходной композиции или популяции, являются более активными, жизнестойкими или подобными наивным, чем клетки, которые сконструированы с помощью процессов, требующих более длительного времени. В некоторых аспектах, продолжительность, например, количество времени, необходимое для создания или продуцирования сконструированной популяции Т-клеток, предложенных процессов короче, чем у некоторых существующих процессов, на, примерно на или, по меньшей мере, на 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или больше 7 дней. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность предложенного процесса составляет, составляет примерно или составляет меньше 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 15% или 10% альтернативных или существующих процессов.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы осуществляют на клеточной популяции, например CD3+, CD4+ и/или CD8+ Т-клеток, которые выделены, обогащены или выбраны из биологического образца. В некоторых аспектах, предложенные способы могут продуцировать или генерировать композицию сконструированных Т-клеток при взятии биологического образца у субъекта в течение более короткого периода времени по сравнению с другими способами или процессами. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы могут продуцировать или генерировать сконструированные Т-клетки, включая любое или все время криоконсервации и хранения биологических образцов или обогащенных, выделенных или отобранных клеток, в течение или в течение примерно 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней или 2 дней, или в течение или в течение примерно 120 часов, 96 часов, 72 часов или 48 часов, с момента взятия биологического образца у субъекта до момента, когда сконструированные Т-клетки собирают, получают или составляют (например, для криоконсервации или введения).

В конкретных вариантах осуществления, способы продуцирования или конструирования популяций Т-клеток включают стадию стимуляции клеток, например, перед трансдукцией вирусным вектором. В аспектах предложенных способов, стимуляцию проводят олигомерным стимулирующим реагентом, таким как олигомер мутеина стрептавидина, на котором иммобилизован(ы) или присоединен(ы) стимулирующий(е) связывающий(е) агент(ы), например анти-CD3/анти-CD28. Существующие реагенты для применения в стимуляции Т-клеток *in vitro*, например, в отсутствие экзогенных факторов роста или в малых количествах экзогенных факторов роста, известны (см., например, патент США 6,352,694 В1 и европейский патент EP 0 700 430 В1). Как правило, такие реагенты могут использовать микроносители, например магнитные микроносители, диаметром больше 1 мкм, на которых иммобилизованы различные связывающие агенты (например, анти-CD3 антитело и/или анти-CD28

антитело). Однако в некоторых случаях, такие магнитные микроносители, например, трудно интегрировать в способы стимуляции клеток в условиях, необходимых для клинических испытаний или терапевтических целей, поскольку необходимо убедиться, что эти магнитные микроносители полностью удалены перед введением размноженных Т-клеток субъекту. В некоторых аспектах, такое удаление, например, путем воздействия на клетки магнитным полем, может снизить выход жизнеспособных клеток, доступных для клеточной терапии. В некоторых случаях, такие реагенты, например, стимулирующие реагенты, содержащие магнитные микроносители, необходимо инкубировать с клетками в течение минимального периода времени, чтобы позволить достаточному количеству Т-клеток отсоединиться от стимулирующего реагента.

Предложенные процессы с использованием олигомерных стимулирующих реагентов, например полимера мутеина стрептавидина, преодолевают такие потенциальные ограничения. Например, в некоторых вариантах осуществления, предложенные процессы предотвращают или снижают риск остаточного стимулирующего реагента, например, реагентов, содержащих магнитные микроносители, в выходных клетках, создаваемых или продуцируемых процессами. В некоторых вариантах осуществления, это также означает, что процесс, соответствующий стандартам GMP, может быть легче налажен по сравнению с другими способами, такими, в которых необходимо принять дополнительные меры, чтобы убедиться, что конечная сконструированная популяция Т-клеток не содержит микроносители. В некоторых вариантах осуществления, это может быть легко достигнуто в настоящих вариантах осуществления, путем добавления вещества, например, конкурентного реагента, который диссоциирует олигомерные стимулирующие реагенты от клеток, например, путем простого ополаскивания или промывания клеток, например, центрифугированием. Таким образом, в некоторых аспектах, удаление или отделение олигомерного стимулирующего реагента от клеток, например, путем добавления вещества или конкурентного реагента, приводит к незначительной потере клеток или ее отсутствию по сравнению с удалением или отделением стимулирующих реагентов на основе микроносителей. В некоторых аспектах, время удаления или разделения олигомерных стимулирующих реагентов не ограничено или ограничено в меньшей степени, чем удаление или разделение стимулирующих реагентов на основе микроносителей. Таким образом, в некоторых аспектах, олигомерный стимулирующий реагент может быть удален или выделен из клеток в любое время или на любой стадии в ходе предлагаемых процессов.

В некоторых аспектах, применение олигомерных стимулирующих реагентов (например, анти-CD3/анти-CD28 олигомеров мутеина стрептавидина) может привести к общему снижению стимулирующего сигнала по сравнению с альтернативными стимулирующими реагентами, такими как анти-CD3/анти-CD28 парамагнитные микроносители. Предложенный процесс, который может включать более слабую или уменьшенную стимуляцию, может создавать сконструированные CAR⁺ Т-клетки, которые являются такими же или даже более мощными, жизнестойкими или эффективными, как

CAR⁺ Т-клетки, создаваемые процессами, которые включают более сильные стимулирующие условия или более высокие количества или концентрации стимулирующего реагента, например, после стимуляции анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными микроносителями. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, стимуляция клеток меньшим или относительно низким количеством олигомерных стимулирующих реагентов может повышать активность, эффективность или жизнестойкость полученной сконструированной клеточной популяции по сравнению со способами, в которых используются более высокие количества олигомерного стимулирующего реагента. Такие варианты осуществления предполагают, что такие эффекты могут сохраняться даже при достаточно низких дозах, чтобы уменьшить экспрессию маркеров активации или части клеток, положительных на маркеры активации, во время и после процесса.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные Т-клетки, например, выходная композиция или популяции Т-клеток, содержащие Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор, продуцируемые или создаваемые предложенными способами, являются особенно эффективными или мощными при использовании в качестве клеток для клеточной терапии. Например, в некоторых аспектах, выходная композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, например, CAR⁺ Т-клетки, которые получены с помощью предложенных процессов, обладает гораздо более высокой степенью эффективности и/или пролиферативной способности, чем сконструированные Т-клетки, созданные или продуцированные альтернативными существующими процессами. В некоторых аспектах, выходная композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, например, CAR⁺ Т-клетки, полученные с помощью предложенных способов, обладает улучшенной противоопухолевой или противораковой клеточной активностью, чем сконструированные Т-клетки, например, CAR⁺ Т-клетки, полученные альтернативными или существующими способами.

В конкретных вариантах осуществления, процессы продуцирования предложенных CD19-направленных Т-клеточных композиций, которые не содержат стадий, на которых клетки размножаются до порогового количества или концентрации, имеют дополнительные преимущества. В некоторых аспектах, протоколы, которые не основаны на размножении клеток для увеличения числа или концентрации клеток из начальной клеточной популяции, например, входной популяции, не требуют инкубации или культивирования, которые могут различаться между клеточными популяциями. Например, некоторые варианты осуществления предполагают, что клеточные популяции, полученные от разных субъектов, таких как субъекты с различными заболеваниями или подтипами заболеваний, в частности, как в случае пациентов с NHL, включая NHL высокого риска, агрессивную и/или R/R NHL, могут делиться или размножаться с разной скоростью. В некоторых аспектах, устранение потенциально переменных стадий, требующих размножения клеток, позволяет строго контролировать продолжительность

всего процесса. В некоторых вариантах осуществления, вариабельность продолжительности процесса уменьшена или устранена, что может, в некоторых аспектах, позволить улучшить координацию назначений и лечения между врачами, пациентами и техническим персоналом для облегчения терапии аутологичными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают лечение конкретной группы или подмножества субъектов, например субъектов, у которых выявлено заболевание с высоким риском, например NHL с высоким риском или В-крупноклеточная лимфома с высоким риском. В некоторых аспектах, способы лечат субъектов, имеющих форму агрессивной и/или В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL) с неблагоприятным прогнозом, такой как NHL, которая рецидивирует или не поддается лечению (R/R) стандартной терапией и/или имеет плохой прогноз. В некоторых аспектах, способы лечат субъектов с В-крупноклеточной лимфомой, которая рецидивирует или не поддается лечению (R/R) стандартной терапией. В конкретных аспектах, сконструированные клетки являются аутологичными по отношению к субъекту и вводятся после получения с помощью процессов *ex vivo*, которые являются более короткими по сравнению с существующими способами, которые не включают или не вовлекают стадию культивирования для размножения клеток во время способов продуцирования сконструированных клеток, и/или которые способны продуцировать CAR-сконструированную Т-клеточную композицию, которая является менее дифференцированной, что позволяет вводить более низкие дозы. В результате, предлагаемые способы имеют преимущества по сравнению с существующими способами, поскольку они могут сократить время до того момента, когда сконструированная Т-клеточная терапия станет доступной для пациента, особенно среди пациентов, нуждающихся в лечении, таких как субъекты, которые имеют рецидив или невосприимчивость к лечению после одной или нескольких других предшествующих терапий заболевания или состояния. В некоторых аспектах, предложенные способы, композиции, применения и готовые изделия позволяют достичь улучшенных и превосходных ответов на доступные терапии. В некоторых вариантах осуществления, улучшенные или превосходные ответы соответствуют текущему стандарту медицинской помощи (SOC).

Неходжкинские лимфомы (NHL) представляют собой группу лимфоидных злокачественных новообразований с разнообразным биологическим и клиническим течением. По оценкам, в 2019 году в Соединенных Штатах (США) будет диагностировано примерно 74200 новых случаев и 19970 случаев смерти от NHL (Siegel et al., *CA Cancer J Clin.* 2019; 69(1):7-34). Неходжкинские лимфомы можно разделить на 2 прогностические группы: индолентные лимфомы (медленно растущие с возрастающей и уменьшающейся лимфаденопатией в течение многих лет) и агрессивные лимфомы (быстро растущие и приводящие к смерти в течение нескольких недель при отсутствии лечения). Наиболее распространенной агрессивной лимфомой является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), на которую приходится от 30 до 40% всех NHL (Li et al., *Pathology*

2018; 50(1):74-87). Другие агрессивные лимфомы включают, но не ограничены ими, В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности (HGBCL), так называемую лимфому с двумя транслокациями (DHL) или тремя транслокациями (THL), мантийноклеточную лимфому (MCL), первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL) и фолликулярную лимфому степени 3b (FL3B). Прогноз и терапия других подтипов агрессивной лимфомы аналогичны DLBCL. Примерно 50% впервые диагностированных пациентов с DLBCL можно вылечить с помощью иммунохимиотерапии первой линии R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизолон). Однако приблизительно у половины пациентов, получавших R-CHOP, возникнет рецидив, в основном в течение первых 2 лет после терапии (Coiffier et al., *Blood* 2010; 116(12):2040-5; Vitolo et al., *J Clin Oncol.* 2017; 35(31):3529-37). Высокодозная иммунохимиотерапия спасения с последующей аутологичной трансплантацией стволовых клеток (ASCT) является стандартной терапией второй линии при рецидивирующей или не поддающейся лечению (R/R) DLBCL. Примерно половина пациентов с R/R не будет иметь права на трансплантацию из-за отсутствия ответа на терапию спасения или состояние здоровья, и у значительной части пациентов возникнет рецидив даже после ASCT. Мультикогортное ретроспективное исследование NHL при не поддающейся лечению DLBCL (SCHOLAR-1; n=636) продемонстрировало очень неблагоприятные исходы в этой популяции пациентов с общей частотой ответа (ORR) 26% на следующую линию терапии и медианой общей выживаемости (OS) 6,3 месяца (Crump et al., *Blood* 2017; 130(16):1800-8; Gisselbrecht et al., *Br J Haematol.* 2018; 182(5):633-43).

CD19 является членом суперсемейства иммуноглобулинов и компонентом комплекса передачи сигнала на поверхности В-клеток, который положительно регулирует передачу сигнала через В-клеточный рецептор. Он экспрессируется большинством В-клеточных злокачественных новообразований от раннего развития до дифференциации в плазматические клетки (Stamenkovic et al., *J Exp Med.* 1988; 168(3):1205-10). CD19 является привлекательной терапевтической мишенью, поскольку он экспрессируется большинством В-клеточных злокачественных новообразований, включая В-клеточную NHL (Davila et al., *Oncoimmunology.* 2012;(9):1577-83). Важно отметить, что CD19 антиген не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках или на каких-либо нормальных тканях, кроме клеток В-клеточной линии. Кроме того, CD19 не попадает в кровоток, что ограничивает побочные эффекты вне мишени (Shank et al., *Pharmacotherapy.* 2017;37(3):334-45).

В конкретных вариантах осуществления, способы, предложенные в настоящем документе, основаны на применении CD19-направленной CAR Т-клеточной терапии, в которой CAR содержит CD19-направленный антигенсвязывающий домен scFv (например, из FMC63). CAR дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен из CD3зета, и также включает костимулирующий домен 4-1BB, который был ассоциирован с более низкой частотой синдрома высвобождения

цитокинов (CRS) и нейротоксичности (NE) по сравнению с конструкциями, содержащими CD28. (Lu et al. *J Clin Oncol.* 2018; 36:3041).

Задача разработки CAR T-клеток состоит в том, чтобы создать продукт, который постоянно размножается, является жизнестойким и обеспечивает устойчивый противоопухолевый ответ после инфузии. Некоторые CD19-направленные CAR-T-клеточные терапии доступны для лечения В-клеточной лимфомы, включая Kymriah™ (тисагенлеклеуцел) (Kymriah PI) и Yescarta® (аксикабтаген цилолеуцел) (Yescarta PI). Обе CAR T-клеточные терапии имеют начальную частоту полного ответа (CRR) от 50 до 60% в этой трудной для лечения популяции пациентов; однако через 6 месяцев уровень ответа падает до диапазона от 40 до 50%, при этом у ответивших с большей вероятностью будет постоянный устойчивый ответ (Locke et al., *Mol Ther.* 2017; 25(1):285-95; Schuster et al., *N Engl J Med.*, 2017; 377(26):2545-54). Таким образом, больше чем у половины пациентов, получающих эти терапии, не будет длительного устойчивого ответа, и прогноз общей выживаемости (OS) очень плохой.

Предложенные способы основаны на выводах о том, что более низкое состояние дифференциации адоптивно перенесенных Т-клеток может влиять на способность этих клеток сохраняться и способствовать стойкому противоопухолевому иммунитету. В некоторых вариантах осуществления, предложенные CD19-направленные CAR+ сконструированные Т-клеточные композиции получают способом, в котором клетки не культивируют в условиях размножения, тем самым ограничивая или уменьшая число удвоений популяции конечной сконструированной выходной композиции и давая менее дифференцированный продукт. Тем не менее, предложенные композиции также продуцируются с помощью процессов, которые приводят к стабильно интегрированному числу копий вектора (iVCN) для обеспечения последовательной и надежной экспрессии CAR, что дает соответствующий клеточный продукт для введения субъектам и низкую вариабельность среди CAR-экспрессирующих клеток в вводимых дозах. Напротив, большинство протоколов конструирования Т-клеток обычно размножают Т-клетки *ex vivo* в течение 9-14 дней или больше. Представленные данные, приведенные в качестве примеров в настоящем документе, подтверждают модель, в которой CAR Т-клеточные продукты с увеличенным составом менее дифференцированных Т-клеток памяти могут проявлять повышенную устойчивую противоопухолевую активность. Эти результаты показывают, что стратегии, направленные на минимизацию эффекторной дифференциации в CAR Т-клеточных продуктах, могут привести к повышению клинической эффективности. В настоящем документе предложены варианты осуществления, которые могут соответствовать таким целям.

Наблюдения, представленные в настоящем документе, поддерживают лечение субъектов с заболеванием высокого риска с помощью CD19-направленной CAR Т-клеточной терапии в соответствии с предложенными способами. Например, пациентов с NHL, включая пациентов с агрессивной NHL или некоторыми признаками высокого риска, такими как пациенты с рецидивирующей/не поддающейся лечению (R/R) NHL,

можно лечить в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы можно использовать для лечения субъектов, которые предварительно подвергались интенсивному лечению (например, одной, двум, трем, четырем или больше предшествующим терапиям для лечения заболевания).

Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была включена посредством ссылки по отдельности. Если определение, изложенное в настоящем документе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки, определение, изложенное в настоящем документе, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящий документ посредством ссылки.

Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описываемый предмет.

I. СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЕ CD19-ТАРГЕТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ В-КЛЕТОЧНОЙ НЕХОДЖКИНСКОЙ ЛИМФОМЕ

В настоящем документе предложены способы лечения, которые включают введение сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки. Также предложены способы и применения предложенных CD19-направленных CAR сконструированных клеток (например, Т-клеток) и/или их композиций, включая способы лечения субъектов, страдающих В-клеточной неходжкинской лимфомой (NHL), включая агрессивную или NHL высокого риска, такую как R/R NHL, которые включают введение сконструированных клеток и/или их композиций. В некоторых вариантах осуществления, способы и применения предложенных CD19-направленных CAR сконструированных клеток (например, Т-клеток) и/или их композиций, включая способы лечения субъектов с R/R NHL, у которых, по меньшей мере, две или несколько предшествующих терапий не дали результата. В конкретных вариантах осуществления, способ включает введение субъекту дозы Т-клеток, которая включает CD4+ и CD8+ Т-клетки, где Т-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19.

В некоторых вариантах осуществления, способы и применения включают введение субъектам клеток, экспрессирующих генетически сконструированные (рекомбинантные) рецепторы клеточной поверхности при адоптивной клеточной терапии, которые обычно представляют собой химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), распознающие CD19, экспрессируемые, ассоциированные с и /или специфичные для лимфомы и/или типа клеток, из которых они получены. Клетки обычно вводят в составе композиции, составленной для введения. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают у субъекта перед лечением с целью конструирования клеток с CD19-

направленным рекомбинантным рецептором (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают с помощью лейкофереза. В некоторых аспектах, клетки конструируют методами *ex vivo*, которые не включают культивирование клеток для размножения (в дальнейшем также называемое процессом без размножения). Примеры процессов без размножения конструирования предложенных CAR-экспрессирующих терапевтических композиций описаны в Разделе II-C.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой агрессивную NHL. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой агрессивную NHL, которая ранее была индолентной. В некоторых вариантах осуществления, NHL не является индолентной, такой как агрессивная лимфома, которая быстро развивается. Одним из наиболее распространенных агрессивных подтипов NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL).

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние подтверждают с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние подтверждают с помощью ПЭТ и стадируют на основе классификации Лугано (см., например, Cheson et al., (2014) *JCO* 32(27):3059-3067; Cheson, BD (2015) *Chin Clin Oncol* 4(1):5). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние подтверждено гистологически. В любых описанных в настоящем документе вариантах осуществления, заболевание или состояния, или подтип, или состояние могут быть определены до проведения лейкофереза в связи с получением Т-клеток для аутологичной Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой DLBCL, неуточненную (NOS). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (HGBCL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой DLBCL, трансформированную из фолликулярной лимфомы (tFL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой DLBCL, трансформированную из лимфомы маргинальной зоны (tMZL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой первичную медиастинальную В-клеточную лимфому (PMBCL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой фолликулярную лимфому (FL). В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В).

В некоторых вариантах осуществления, субъект перед лейкоферезом имеет общее состояние 0 или 1 по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) (см., например, Oken et al., (1982) *Am J Clin Oncol*. 5:649-655). В некоторых вариантах осуществления, индикатор общего состояния по шкале Восточной кооперативной

онкологической группы (ECOG) можно использовать для оценки или выбора субъектов для лечения, например, субъектов, у которых были плохие показатели после предшествующих терапий (см., например, Oken et al., (1982) *Am J Clin Oncol.*, 5:649-655). Шкала общего состояния ECOG описывает уровень функционирования пациента с точки зрения его способности заботиться о себе, повседневной активности и физических способностей (например, ходьба, работа и т. д.). В некоторых вариантах осуществления, общее состояние по ECOG, равное 0, указывает, что субъект может осуществлять обычную деятельность. В некоторых аспектах, субъекты с общим состоянием по ECOG 1 демонстрируют некоторые ограничения в физической активности, но субъект является полностью амбулаторным. В некоторых аспектах, пациенты с общим состоянием по ECOG 2 больше на 50% являются амбулаторными. В некоторых случаях, субъект с общим состоянием по ECOG 2 также может быть способен к самообслуживанию; см., например, Sørensen et al., (1993) *Br J Cancer* 67(4) 773-775. Критерии, отражающие общее состояние по ECOG, описаны в **Таблице 1** ниже:

| Таблица 1. Критерии общего состояния ECOG | |
|--|--|
| Оценка | Общее состояние ECOG |
| 0 | Полная активность, способность выполнять все функции до заболевания без ограничений |
| 1 | Ограничения в физической нагрузке, амбулаторный статус и способность выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую домашнюю работу, работу в офисе |
| 2 | Амбулаторный статус и способность к самообслуживанию, но невозможность выполнять какую-либо работу; на ногах больше 50% времени бодрствования |
| 3 | Способность лишь к ограниченному уходу за собой; ограниченность кроватью или креслом больше 50% часов бодрствования |
| 4 | Полная инвалидность; отсутствие возможности самообслуживания; полная ограниченность кроватью или креслом |
| 5 | Смерть |

В некоторых вариантах осуществления, до, например, во время введения предложенных CD19-направленных композиций CAR T-клеток, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к одной или несколькими линиями предшествующей терапии NHL. В любых вариантах осуществления, во время до лейкофереза в связи с конструированием композиции CD19-направленных CAR T-клеток у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к одной или нескольким линиям предшествующей терапии для лечения NHL. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления, до начала

лечения, например, перед лейкаферезом, у субъекта имеется R/R NHL. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее лечился терапией или терапевтическим агентом, таргетирующим заболевание или состояние, например NHL или а, до введения клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее подвергался трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ASCT), например, аллогенной ASCT или аутологичной ASCT. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта был плохой прогноз после лечения стандартной терапией и/или отсутствие результата на одной или нескольких линиях предшествующей терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил лечение или ранее получал, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или примерно 1, 2, 3, 4 или больше других терапий для лечения NHL, таких как агрессивные NHL или NHL высокого риска, такие как DLBCL или ее подтип. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил лечение или ранее получал терапию, которая включает агент, таргетирующий CD20 (например, анти-CD20 антитело), и алкилирующий агент. В некоторых аспектах, у субъекта возник рецидив после первоначального полного ответа (CR) или частичного ответа (PR) на предшествующую терапию. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению, по меньшей мере, одной или несколькими предшествующими терапиями, и невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ на стабилизацию заболевания (SD) или прогрессирование заболевания (PD) после предшествующей терапии.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум линиям предшествующей системной терапии заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна указанная линия предшествующей системной терапии включает лечение антрациклином и моноклональным анти-CD20 антителом. Примеры анти-CD20 антител включают, но не ограничены ими, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб (также известный как GA101 или RO5072759), вельтузумаб, обинутузумаб, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), окаратузумаб (также известный как AME-133v или окаратузумаб) и Pro131921 (Genentech). См., например, Lim et al. *Haematologica*. (2010) 95(1):135-43. Ритуксимаб представляет собой химерное моноклональное антитело IgG1 каппа мыши/человека, которое связывается с CD20 и вызывает цитоллиз клеток, экспрессирующих CD20. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна указанная линия предшествующей системной терапии включает лечение антрациклином и ритуксимабом.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT). В некоторых вариантах осуществления, рецидив после ремиссии после лечения с помощью или невосприимчивость к ASCT представляет собой неспособность достичь объективного ответа после ASCT. В некоторых вариантах осуществления, рецидив после ремиссии после лечения с помощью, или невосприимчивость к ASCT

представляет собой неспособность достичь частичного ответа (PR) или лучше после ASCT. В некоторых вариантах осуществления, рецидив после ремиссии после лечения с помощью, или невосприимчивость к ASCT включает прогрессирование заболевания после ASCT.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум линиям предшествующей системной терапии и ASCT для заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна указанная линия предшествующей системной терапии включает лечение антрациклином и моноклональным анти-CD20 антителом. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна указанная линия предшествующей системной терапии включает лечение антрациклином и ритуксимабом.

В некоторых вариантах осуществления, до лейкафереза субъект не демонстрирует поражение только центральной нервной системы (ЦНС) заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется патологически подтвержденное вторичное поражение ЦНС в результате заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее не получал терапию CAR-T-клетками до введения CD19-направленных сконструированных CAR-T-клеток в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал терапию генетически модифицированными T-клетками. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал CD-19-таргетную терапию. Примеры CD19-таргетной терапии включают, но не ограничены ими, анти-CD19 моноклональные антитела или анти-CD19 биспецифические антитела. В некоторых вариантах осуществления, субъект не имеет повышенной чувствительности к флударабину и/или циклофосфамиду. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта нет активного аутоиммунного заболевания, требующего иммунодепрессивной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал терапевтические дозы кортикостероидов меньше чем за 14 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая доза кортикостероидов определяется как больше 20 мг/день преднизолона или его эквивалента. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал цитотоксические химиотерапевтические средства, которые не считаются лимфотоксическими, меньше чем за 7 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал интратекальную терапию (ИТ) меньше чем за 7 дней до лейкафереза. Примеры цитотоксических химиотерапевтических агентов включают, но не ограничены ими, доксорубин, винкристин, гемцитабин, оксалиплатин, карбоплатин и этопозид. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал пероральный химиотерапевтический агент меньше чем за 5 периодов полувыведения до лейкафереза. Примеры пероральных химиотерапевтических агентов включают, но не ограничены ими, леналидомид и ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал лимфотоксические химиотерапевтические агенты меньше чем за 4

недели до лейкафереза. Примеры лимфотоксических химиотерапевтических агентов включают, но не ограничены ими, циклофосфамид, ифосфамид и бендамустин. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал никакой экспериментальной терапии меньше чем за 8 недель (для биологических препаратов) или за 5 периодов полувыведения (для малых молекул) до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал иммунодепрессивную терапию меньше чем за 4 недели до лейкафереза. Примеры иммунодепрессивной терапии включают, но не ограничены ими, ингибиторы кальциневрина, метотрексат или другие химиотерапевтические агенты, микофенолят, рапамицин, иммунодепрессивные антитела, такие как анти-TNF, анти-IL6 или анти-IL6R. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал инфузию донорских лимфоцитов меньше чем за 6 недель до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал лучевую терапию по поводу множественных поражений в течение меньше 6 недель до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал лучевую терапию по поводу одного поражения, если присутствуют дополнительные необлученные ПЭТ-положительные поражения, меньше чем за 14 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъекту не проводили трансплантацию аутологичных стволовых клеток (SCT) меньше чем за 3 месяца до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал аллогенные SCT меньше чем за 6 месяцев до лейкафереза.

В некоторых вариантах осуществления, приемлемость субъектов для лечения, включающую введение сконструированных клеток, определяют до проведения лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект до лейкафереза имеет адекватный сосудистый доступ для лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект до лейкафереза имеет адекватную функцию органов. В некоторых вариантах осуществления, на адекватную функцию органа указывает, помимо прочих факторов, абсолютное число нейтрофилов (ANC) больше $1,0 \times 10^9$ клеток/л без поддержки фактором роста в течение 7 дней после определения приемлемости; количество тромбоцитов больше 50×10^9 клеток/л без трансфузионной поддержки в течение 7 дней после определения приемлемости; расчетная скорость клиренса креатинина (CrCl, формула Кокрофта-Голта) больше 45 мл/мин; уровень аспартатаминотрансферазы (AST) меньше или равный 2,5 раза от верхней границы нормы (ULN); уровень аланинаминотрансферазы (ALT) меньше или равный 2,5 раза от ULN; уровень общего билирубина меньше 1,5 раза от ULN; уровень прямого билирубина меньше 1,5 раза от ULN при синдроме Жильбера или лимфоматозной инфильтрации печени; адекватная легочная функция, например, меньше или равная одышке степени 1 по STCAE и насыщение кислородом (SaO₂ больше 92%) на комнатном воздухе; адекватная сердечная функция, например, фракция выброса левого желудочка (LVEF), выше или равная 40%, по оценке эхокардиограммы (ECHO) или сканирования мультигейтированной радионуклидной ангиографией (MUGA), выполненного в течение 30 дней после определения приемлемости; адекватная функция

органов для получения противолимфомной (LD) химиотерапии; или комбинация любых из вышеперечисленных.

В конкретных вариантах осуществления, перед введением дозы CD19-направленных сконструированных CAR T-клеток, субъекту вводили или он получал противолимфомную химиотерапию. Противолимфомная терапия может улучшать приживление и активность CAR T-клеток за счет гомеостатических цитокинов, снижения CD4+CD25+ регуляторных T-клеток, увеличения SDF-1 в микроокружении костного мозга и стимулирующего действия на антигенпрезентирующие клетки (Grossman et al., *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(5):387-395; Stachel et al., *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43(6):644-50; Pinthus et al., *J Clin Invest* 2004; 114(12):1774-81; Turk et al., *J Exp Med* 2004; 200(6):771-82). Кроме того, LD химиотерапия может дополнительно снизить опухолевую массу у субъекта и потенциально снизить риск и тяжесть синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, способы включают введение агента для предварительного кондиционирования, такого как противолимфомный или химиотерапевтический агент, такой как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту перед введением сконструированных клеток. Например, субъекту можно вводить прекондиционирующий агент, по меньшей мере, за 2 дня, например, по меньшей мере, за 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 дней до введения сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят прекондиционирующий агент не больше чем за 9 дней до, например, не больше чем за 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня до введения сконструированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, субъект подвергается предварительному кондиционированию циклофосфамидом в дозе от примерно 20 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта, например, от примерно 40 мг/кг до 80 мг/кг. В некоторых аспектах, субъекта предварительно кондиционируют или вводят точно или примерно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, где противолимфомный агент содержит циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид в дозе от примерно 100 мг/м² до 500 мг/м² площади поверхности тела субъекта, например, от примерно 200 мг/м² до 400 мг/м² или от 250 мг/м² и 350 мг/м², включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 100 мг/м² циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 150 мг/м² циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 200 мг/м² циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 250 мг/м² циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м² циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно,

через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят в общей сложности точно или примерно 300 мг/м^2 , 400 мг/м^2 , 500 мг/м^2 , 600 мг/м^2 , 700 мг/м^2 , 800 мг/м^2 , 900 мг/м^2 , 1000 мг/м^2 , 1200 мг/м^2 , 1500 мг/м^2 , 1800 мг/м^2 , 2000 мг/м^2 , 2500 мг/м^2 , 2700 мг/м^2 , 3000 мг/м^2 , 3300 мг/м^2 , 3600 мг/м^2 , 4000 мг/м^2 или 5000 мг/м^2 циклофосфамида или диапазон, определенный любым из вышеперечисленных, до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, где противолимфомный агент включает флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от точно или примерно 1 мг/м^2 до точно или примерно 100 мг/м^2 , например, от точно или примерно 10 мг/м^2 до точно или примерно 75 мг/м^2 , от точно или примерно 15 мг/м^2 до точно или примерно 50 мг/м^2 , от точно примерно 20 мг/м^2 до точно или примерно 40 мг/м^2 , от точно или примерно 24 мг/м^2 до точно или примерно 35 мг/м^2 , включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят в точно или примерно 10 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях, субъекту вводят точно или примерно 15 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях, субъекту вводят точно или примерно 20 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях, субъекту вводят точно или примерно 25 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях, субъекту вводят точно или примерно 30 мг/м^2 флударабина. В некоторых вариантах осуществления, флударабин можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят флударабин в дозе 30 мг/м^2 поверхности тела субъекта ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят в общей сложности примерно 10 мг/м^2 , 20 мг/м^2 , 25 мг/м^2 , 30 мг/м^2 , 40 мг/м^2 , 50 мг/м^2 , 60 мг/м^2 , 70 мг/м^2 , 80 мг/м^2 , 90 мг/м^2 , 100 мг/м^2 , 120 мг/м^2 , 150 мг/м^2 , 180 мг/м^2 , 200 мг/м^2 , 250 мг/м^2 , 270 мг/м^2 , 300 мг/м^2 , 330 мг/м^2 , 360 мг/м^2 , 400 мг/м^2 или 500 мг/м^2 циклофосфамида или диапазон определяемый любым из вышеперечисленных, до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, противолимфомный агент включает один агент, такой как циклофосфамид или флударабин. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят только циклофосфамид без флударабина или других противолимфомных агентов. В некоторых вариантах осуществления, перед введением субъект получал противолимфомную терапию, включающую введение циклофосфамида в дозе точно или примерно $200\text{-}400 \text{ мг/м}^2$ площади поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 ежедневно, в течение 2-4 дней. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят только флударабин, например, без циклофосфамида или других противолимфомных агентов. В некоторых вариантах осуществления, перед введением субъект получал противолимфомную терапию, включающую введение

флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м² площади поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 30 мг/м² в день, в течение 2-4 дней.

В некоторых вариантах осуществления, противолимфомный агент включает комбинацию агентов, такую как комбинация циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация агентов может включать циклофосфамид в любой дозе или схеме введения, таких как описаны выше, и флударабин в любой дозе или схеме введения, таких как описаны выше. Например, в некоторых аспектах, субъекту вводят точно или примерно 60 мг/кг (~2 г/м²) циклофосфамида и от 3 до 5 доз 25 мг/м² флударабина перед первой или последующей дозой. Некоторым субъектам вводят флударабин (30 мг/м²/день в течение 3 дней) и циклофосфамид (300 мг/м²/день в течение 3 дней) (flu/cy) одновременно, внутривенно, перед введением клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят уменьшенную, отсроченную или исключенную дозу одной или нескольких доз противолимфомного(ых) агента(ов).

В некоторых вариантах осуществления, после забора клеток у субъекта и перед введением противолимфомной (LD) химиотерапии субъект может получать переходную терапию для контроля заболевания. Любой из множества видов терапии можно назначать как часть переходной терапии на основании суждения опытного практикующего врача в отношении лечения конкретного заболевания или состояния, в том числе на основании таких факторов, как возраст пациента, тяжесть или степень заболевания, возможность побочных эффектов, время введения до LD химиотерапии, предшествующая терапия и другие факторы. Примеры терапии, которую можно назначать в качестве переходной терапии перед противолимфомной терапией, включают, но не ограничены ими, кортикостероиды, винкристин, циклофосфамид, ритуксимаб, дексаметазон, преднизолон, леналидомид, гемцитабин, оксалиплатин, брентуксимаб ведотин, ибрутиниб, метотрексат, цитозинарабинозид, цитарабин, бендамустин или любую комбинацию любых из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, субъекты проходят премедикацию, например, для сведения к минимуму риска инфузионной реакции. В некоторых аспектах, премедикация включает введение обезболивающего и/или антигистаминного препарата. В некоторых вариантах осуществления, премедикация включает введение ацетаминофена и/или дифенгидрамина или другого H1-антигистамина. В некоторых вариантах осуществления, пациент принимает ацетаминофен (например, 650 мг перорально) и дифенгидрамин (например, 25-50 мг, в/в или перорально) или другой H1-антигистамин за точно или примерно 30-60 минут до лечения клеточной терапией.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту, по меньшей мере, 18 лет. В вариантах осуществления любого из предложенных способов, субъектом является человек.

А. Дозирование

В некоторых вариантах осуществления, дозу сконструированных клеток вводят субъектам в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми

изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления, размер или время введения доз определяют в зависимости от конкретного заболевания или состояния у субъекта. В некоторых случаях, размер или время введения доз при конкретном заболевании с учетом представленного описания могут быть определены эмпирически.

В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, доза Т-клеток, таких как сконструированные Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, включает обогащенные или содержащие клеточную композицию или клеточную популяцию, обогащенную CD3⁺ Т-клетками, CD4⁺ Т-клетками, CD8⁺ Т-клетками или CD4⁺ Т-клетками и CD8⁺ Т-клетками. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, больше чем точно или примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в дозе Т-клеток представляют собой CD3⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки или CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, больше чем точно или примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в дозе Т-клеток представляют собой CD3⁺ Т-клетки. В некоторых из представленных вариантов осуществления, доза Т-клеток включает и CD4⁺ клетки, и CD8⁺ клетки. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, больше чем точно или примерно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 98% клеток в дозе Т-клеток составляют CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток составляет от точно или примерно $0,1 \times 10^5$ CD19-направленных CAR сконструированных клеток на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг) до точно или примерно 2×10^6 клеток/кг, например от точно или примерно $0,1 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно $0,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $0,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 1×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 1×10^5 клеток/кг до точно или примерно $1,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $1,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 2×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 2×10^5 клеток/кг до точно или примерно $2,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $2,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 3×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 3×10^5 клеток/кг до точно или примерно $3,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $3,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 4×10^5 клеток/кг до точно или примерно $4,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $4,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 5×10^5 клеток до точно или примерно $5,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $5,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 6×10^5 клеток/кг до точно или примерно $6,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $6,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, от точно или примерно 7×10^5 клеток/кг до точно или примерно $7,5 \times 10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $7,5 \times 10^5$ клеток/кг до точно или примерно 8×10^5 клеток/кг или от точно или примерно 8×10^5 клеток/кг до точно или примерно 10×10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не больше 2×10^5 клеток, CD19-направленных CAR сконструированных клеток на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не больше чем точно или

примерно 3×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 8×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 9×10^5 клеток/кг, не больше чем точно или примерно 1×10^6 клеток/кг или не больше чем точно или примерно 2×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно, или точно или примерно $0,1 \times 10^5$ CD19-направленных CAR сконструированных клеток на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,2 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,3 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,4 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,5 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,6 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,7 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,8 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,9 \times 10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,1 \times 10^6$ клеток/кг, или, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,2 \times 10^6$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками, например, жизнеспособными Т-клетками, такими как жизнеспособные CD3+ клетки, экспрессирующие CD19-направленный CAR.

В некоторых вариантах осуществления, клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от точно или примерно 0,1 миллиона до точно или примерно 100 миллиардов клеток и/или такого количества клеток на килограмм массы тела субъекта, *например*, от точно или примерно 0,1 миллиона до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 5 миллионов клеток, точно или примерно 25 миллионов клеток, точно или примерно 500 миллионов клеток, точно или примерно 1 миллиард клеток, точно или примерно 5 миллиардов клеток, точно или примерно 20 миллиардов клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток или точно или примерно 40 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из предыдущих значений), от точно или примерно 1 миллиона до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 5 миллионов клеток, точно или примерно 25 миллионов клеток, точно или примерно 500 миллионов клеток, точно или примерно 1 миллиард клеток, точно или примерно 5 миллиардов клеток, точно или примерно 20 миллиардов клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток, точно или примерно 40 миллиардов клеток или в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений), *например*, от точно или примерно 10 миллионов до точно или примерно 100 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 20 миллионов клеток,

точно или примерно 30 миллионов клеток, точно или примерно 40 миллионов клеток, точно или примерно 60 миллионов клеток, точно или примерно 70 миллионов клеток, точно или примерно 80 миллионов клеток, точно или примерно 90 миллионов клеток, точно или примерно 10 миллиардов клеток, точно или примерно 25 миллиардов клеток, точно или примерно 50 миллиардов клеток, точно или примерно 75 миллиардов клеток, точно или примерно 90 миллиардов клеток или в диапазоне определяется любыми двумя из предыдущих значений), и в некоторых случаях, от точно или примерно 100 миллионов клеток до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 120 миллионов клеток, точно или примерно 250 миллионов клеток, точно или примерно 350 миллионов клеток, точно или примерно 650 миллионов клеток, точно или примерно 800 миллионов клеток, точно или примерно 900 миллионов клеток, точно или примерно 3 миллиарда клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток, точно или примерно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела субъекта. Дозировки могут варьироваться в зависимости от признаков, характерных для заболевания или нарушения и/или пациента, и/или других видов лечения. В некоторых вариантах осуществления, такие значения относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; в других вариантах осуществления, они относятся к числу Т-клеток или общему количеству клеток во вводимой композиции. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток представляет собой базовую дозу клеток или фиксированную дозу клеток, так что доза клеток не привязана к площади поверхности тела или весу субъекта или не зависит от них.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,8 \times 10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,6 \times 10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,4 \times 10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,2 \times 10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $1,0 \times 10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,8 \times 10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,6 \times 10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,4 \times 10^7$ общих Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $0,2 \times 10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $1,0 \times 10^6$ всего Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, от точно

мере, или по меньшей мере, примерно 5×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками, такими как жизнеспособные Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит меньше или меньше примерно 1×10^5 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно $2,5 \times 10^5$ Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 5×10^5 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 1×10^6 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно $2,5 \times 10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 5×10^6 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 1×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно $1,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 2×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно $2,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 3×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно $3,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно 4×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, меньше или меньше примерно $4,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR, или меньше или меньше примерно 5×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CD19-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками, такими как жизнеспособные Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, включающей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 5×10^8 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток или всего Т-клеток, от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 1×10^7 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток или всего Т-клеток, или от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 1×10^7 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток или всего Т-клеток, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 1×10^8 всего количества рекомбинантных клеток, экспрессирующих рецептор, или всего Т-клеток, от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 1×10^8 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток, или всего Т-клеток, от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 50×10^6 всего рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток или всего Т-клеток, от или от примерно 5×10^6 до или до примерно 45×10^6 всего рекомбинантных клеток, экспрессирующих рецептор, или всего Т-клеток, или от или от примерно 10×10^6 до или до примерно 25×10^6 всего рекомбинантных клеток,

экспрессирующих рецептор клеток или всего Т-клеток, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей количество клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 1×10^5 всего рекомбинантных клеток, экспрессирующих рецептор, или всего Т-клеток, например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 1×10^6 , по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^7 , по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^8 таких клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками, такими как жизнеспособные Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, число относится к общему количеству $CD3^+$, $CD8^+$, или $CD4^+$ и $CD8^+$, в некоторых случаях, также рекомбинантных клеток, экспрессирующих рецептор (например, CAR^+). В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 1×10^8 $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD4^+$ и $CD8^+$ всего Т-клеток или $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 5×10^7 $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD4^+$ и $CD8^+$ всего Т-клеток, или $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), или от или от примерно 1×10^6 до или до примерно $2,5 \times 10^7$ $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD4^+$ и $CD8^+$ всего Т-клеток или $CD3^+$, $CD8^+$ или $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 1×10^8 всего $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ клеток, от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 5×10^7 всего $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ клеток, или от или от примерно 1×10^6 до или до примерно $2,5 \times 10^7$ всего $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ клеток, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $0,1 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $0,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $1,0 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^7 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток

содержит меньше или меньше примерно $0,1 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, меньше или меньше примерно $0,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, меньше или меньше примерно $1,0 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, меньше или меньше примерно $2,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, меньше или меньше примерно 5×10^7 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, меньше или меньше примерно $7,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, или меньше или меньше примерно, меньше или меньше примерно 10×10^7 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток составляет точно или примерно $0,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $1,0 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $1,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $2,0 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $2,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $3,0 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $3,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $4,0 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно $4,5 \times 10^7$ $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток, точно или примерно 5×10^7 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ или $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ Т клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит: точно или примерно $0,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $1,0 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $1,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $2,0 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $2,5 \times 10^7$ $CD8^+$, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $3,0 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $3,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), точно или примерно $4,0 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), или точно или примерно $4,5 \times 10^7$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит: точно или примерно 1×10^8 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), или точно или примерно 5×10^7 $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит: точно или примерно $1,5 \times 10^8$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), или точно или примерно $0,75 \times 10^8$ $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих

рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки в дозе включают CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки или CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, CD8⁺ Т-клетки в дозе, в том числе в дозе, содержащей CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, содержат от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 всего CD8⁺ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), например, в диапазоне от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 таких клеток, например, 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 или $7,5 \times 10^7$ всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 5×10^7 всего CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, от или от примерно 5×10^6 до или до примерно $2,5 \times 10^7$ всего CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, от или от примерно 10×10^6 до или до примерно $2,5 \times 10^7$ всего CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, количество CD4⁺ Т-клеток в дозе, в том числе в дозе, включающей CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, составляет от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 CD4⁺ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), например, в диапазоне от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 таких клеток, например, 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 или $7,5 \times 10^7$ всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от или от примерно 1×10^6 до или до примерно 5×10^7 всего CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, от или от примерно 5×10^6 до или до примерно $2,5 \times 10^7$ всего CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, от или от примерно 10×10^6 до или до примерно $2,5 \times 10^7$ всего CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, доза содержит меньше примерно 5×10^8 клеток или Т-клеток, экспрессирующих

рекомбинантный рецептор (например, CAR), например, в диапазоне от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 таких клеток, например, примерно 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из предыдущих значений. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от или от примерно 1×10^5 до или до примерно 1×10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), или всего Т-клеток, от или от примерно 1×10^5 до или до примерно $0,5 \times 10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих общий рекомбинантный рецептор (например, CAR), или всего Т-клеток, от или от примерно 1×10^5 до или до примерно $0,5 \times 10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих общий рекомбинантный рецептор (например, CAR), или всего Т-клеток, от или от примерно 5×10^5 до или до примерно 5×10^7 всего Т-клеток, экспрессирующих общий рекомбинантный рецептор (например, CAR), или всего Т-клеток, или от или от примерно 1×10^6 до или примерно до 1×10^7 всего Т-клеток, экспрессирующих общий рекомбинантный рецептор (например, CAR), или всего Т-клеток, каждый включительно.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки в дозе содержат $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки или $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводится субъекту в виде разовой дозы или вводится только один раз в течение двух недель, одного месяца, 3 месяцев, шести месяцев, 1 года или больше.

В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной «дозы» включает введение данного количества или количества клеток в виде одной композиции и/или однократное непрерывное введение, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, а также включает введение данного количества или числа клеток в виде разделенной дозы или в виде множества композиций, представленных в виде нескольких индивидуальных композиций или инфузий, в течение определенного периода времени, например, не больше 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах, доза представляет собой однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, вводимое или начатое в один момент времени. Однако в некоторых случаях, дозу вводят в виде многократных инъекций или вливаний в течение периода не больше трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или путем многократных вливаний в течение одного дня.

В конкретных вариантах осуществления, количество и/или концентрация клеток относится к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В других вариантах осуществления, количество и/или концентрация клеток

относится к количеству или концентрации введенных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, субъект получает несколько доз, например, две или несколько доз или несколько последовательных доз клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъект получает последующую дозу, например, вторую дозу вводят приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, несколько последовательных доз вводят после первой дозы, так что дополнительную дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах, количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, такое же или подобное первой дозе и/или последующей дозе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы.

В некоторых аспектах, размер дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, бремя заболевания у субъекта, такое как опухолевая масса, объем, размер или степень, протяженность, или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых аспектах, время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет от примерно 9 до примерно 35 дней, от примерно 14 до примерно 28 дней или от 15 до 27 дней. В некоторых вариантах осуществления, введение следующей дозы осуществляется в момент времени больше чем через примерно 14 дней после и меньше чем через примерно 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах, время между первой и последующей дозой составляет примерно 21 день. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу или дозы, например последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах, дополнительную последующую дозу или дозы вводят, по меньшей мере, примерно через 14 и меньше чем примерно через 28 дней после введения предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу вводят меньше чем через 14 дней после предшествующей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, ни одна доза не вводится меньше чем примерно через 14 дней после предшествующей дозы и/или никакая доза не вводится больше чем примерно через 28 дней после предшествующей дозы.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток обычно достаточно велика, чтобы эффективно снижать бремя болезни.

В конкретных вариантах осуществления, количество и/или концентрация клеток относится к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В других вариантах осуществления, количество и/или концентрация клеток относится к количеству или концентрации всех введенных клеток, Т-клеток или

моноклеарных клеток периферической крови (PBMC).

В некоторых вариантах осуществления, способы также включают введение одной или нескольких дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или противолимфому терапию, и/или повторение одной или нескольких стадий способов. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз являются такими же, как первоначальная доза. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, выше, например, точно или примерно в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или больше выше начальной дозы, или ниже, например, выше, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или больше ниже начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления, введение одной или нескольких дополнительных доз определяется на основе ответа субъекта на начальное лечение или любое предшествующее лечение, бремени заболевания у субъекта, такого как опухолевая масса, объем, размер или степень, протяженность или тип метастазов, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В. Ответ, эффективность и выживание

В некоторых вариантах осуществления, введение в соответствии с предложенными способами эффективно лечит субъекта, несмотря на то, что субъект стал резистентным к другой терапии. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70% или по меньшей мере, 80% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полной ремиссии (CR). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 90% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают объективного ответа (OR). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% субъектов, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 60% субъектов, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 70% субъектов, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 80% субъектов или, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 90% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают CR и/или достигают объективного ответа (OR). В некоторых вариантах осуществления, критерии, оцениваемые для эффективного лечения, включают общую частоту ответа (ORR; также известную в некоторых случаях как объективную частоту ответа), полный ответ (CR; также известный в некоторых случаях как полная ремиссия), продолжительность ответа (DOR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и/или общую выживаемость (OS).

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере,

50%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, достигают полной ремиссии (CR; также известной в некоторых случаях как полный ответ), демонстрируют выживаемость без прогрессирования (PFS) и/или общую выживаемость (OS) в течение больше точно или примерно 3 месяцев, 6 месяцев или 12 месяцев или больше 13 месяцев или приблизительно 14 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, в среднем, субъекты, получавшие лечение в соответствии с данным способом, демонстрируют медиану PFS или OS больше чем точно или примерно 6 месяцев, 12 месяцев или 18 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет PFS или OS после терапии в течение, по меньшей мере, точно или примерно 6, 12, 18 или больше месяцев или дольше.

В некоторых вариантах осуществления, субъекты, получающие лечение в соответствии с предложенными способами, демонстрируют CRR, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 90%. В некоторых вариантах осуществления, доля пациентов с полным объективным ответом (CRR) рассчитывается как доля субъектов с лучшим общим ответом (BOR) до 12 месяцев, до 18 месяцев, до 24 месяцев, до 36 месяцев или дольше.

В некоторых аспектах, частота ответов у субъектов, таких как субъекты с NHL, основана на критериях Лугано. (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5). В некоторых аспектах, для оценки ответа используют любой из клинических, гематологических и/или молекулярных способов. В некоторых аспектах, ответ, оцениваемый с использованием критериев Лугано, включает использование позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ)-компьютерной томографии (КТ) и/или КТ в зависимости от ситуации. Оценки ПЭТ-КТ могут дополнительно включать использование фтордезоксиглюкозы (FDG) для FDG-avidных лимфом. В некоторых аспектах, когда ПЭТ-КТ будет использоваться для оценки ответа в FDG-avidных гистологиях, может использоваться 5-балльная шкала. В некоторых отношениях, 5-балльная шкала включает следующие критерии: 1, нет поглощения выше фона; 2, поглощение \leq средостения; 3, поглощение $>$ средостения, но \leq печени; 4, поглощение умеренно $>$ печени; 5, поглощение заметно выше, чем в печени и/или новых поражениях; X, новые области поглощения вряд ли связаны с лимфомой.

В некоторых аспектах, полный ответ, описанный с использованием критериев Лугано, включает полный метаболический ответ и полный радиологический ответ в различных измеряемых очагах. В некоторых аспектах, эти очаги включают лимфатические узлы и внелимфатические узлы, где CR описывается как оценка 1, 2 или 3 с или без остаточной массой по 5-балльной шкале при использовании ПЭТ-КТ. В некоторых аспектах, Вальдейера кольцо или экстранодальные очаги с высоким физиологическим поглощением или с активацией в селезенке или костном мозге (например, с химиотерапией или миелоидными колониестимулирующими факторами), поглощение может быть больше, чем в нормальном средостении и/или печени. В этом

случае можно сделать вывод о полном метаболическом ответе, если поглощение в очагах начального поражения не больше, чем в окружающих нормальных тканях, даже если ткань имеет высокое физиологическое поглощение. В некоторых аспектах, ответ оценивают в лимфатических узлах с помощью КТ, где CR описывается как отсутствие внелимфатических очагов заболевания, и узлы/узловые образования-мишени должны регрессировать до $\leq 1,5$ см в наибольшем поперечном диаметре поражения (LDi). Дополнительные очаги оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать на отсутствие признаков FDG-avidного заболевания в костном мозге, и оценка на основе КТ должна указывать на нормальную морфологию, которая, если она является неопределенной, должна быть отрицательной по ИНС. Другие очаги могут включать оценку увеличения органа, которое должно регрессировать до нормы. В некоторых аспектах, оцениваются неизмеряемые поражения и новые поражения, которые в случае CR должны отсутствовать (Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

В некоторых аспектах, частичный ответ (PR; также известный в некоторых случаях как частичная ремиссия), описанный с использованием критериев Лугано, включает частичный метаболический и/или радиологический ответ в различных измеряемых очагах. В некоторых аспектах, эти очаги включают лимфатические узлы и экстралимфатические очаги, где PR описывается как оценка 4 или 5 со сниженным поглощением по сравнению с исходным уровнем и остаточной(ыми) массой(ами) любого размера при использовании ПЭТ-КТ. В середине, такие результаты могут указывать на отвечающее заболевание. В конце лечения, такие результаты могут свидетельствовать об остаточной болезни. В некоторых аспектах, ответ оценивают в лимфатических узлах с помощью КТ, где PR описывается как $\geq 50\%$ снижение SPD до 6 измеримых узлов-мишеней и экстранодальных очагов. Если поражение слишком маленькое для измерения на КТ, в качестве значения по умолчанию назначается 5 мм x 5 мм; если поражение больше не видно, значение равно 0 мм x 0 мм; для узла >5 мм x 5 мм, но меньшего, чем обычно, для расчета используются фактические измерения. Другие очаги оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна показать остаточное поглощение выше, чем поглощение в нормальном костном мозге, но сниженное по сравнению с исходным уровнем (допускается диффузное поглощение, совместимое с реактивными изменениями после химиотерапии). В некоторых аспектах, если имеются стойкие фокальные изменения в костном мозге в контексте узлового ответа, следует рассмотреть вопрос о дальнейшей оценке с помощью МРТ или биопсии, или интервального сканирования. В некоторых аспектах, дополнительные очаги могут включать оценку увеличения органа, где длина селезенки должна регрессировать больше чем на 50% по сравнению с нормой. В некоторых аспектах, оцениваются неизмеряемые поражения и новые поражения, которые в случае PR должны отсутствовать/быть нормальными, регрессировать, но не увеличиваться. Отсутствие ответа/стабильное заболевание (SD) или прогрессирующее заболевание (PD) также можно измерить с помощью оценок на основе ПЭТ-КТ и/или КТ.

(Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

В некоторых отношениях выживаемость без прогрессирования (PFS) описывается как период времени во время и после лечения заболевания, такого как рак, когда субъект живет с заболеванием, но не ухудшается. В некоторых аспектах, объективный ответ (OR) описывается как измеримый ответ. В некоторых аспектах, частота объективного ответа (ORR; также известная в некоторых случаях как общая частота ответа) описывается как доля пациентов, достигших CR или PR. В некоторых аспектах, общая выживаемость (OS) описывается как промежуток времени либо с даты постановки диагноза, либо с начала лечения заболевания, такого как рак, в течение которого субъекты, у которых диагностировано заболевание, все еще живы. В некоторых аспектах, бессобытийная выживаемость (EFS) описывается как период времени после окончания лечения рака, в течение которого субъект остается свободным от определенных осложнений или явлений, которые лечение должно было предотвратить или отсрочить. Эти события могут включать возвращение рака или появление определенных симптомов, таких как боль в костях от рака, который распространился на кости, или смерть.

В некоторых вариантах осуществления, мера продолжительности ответа (DOR) включает время от регистрации ответа опухоли до прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления, параметр для оценки ответа может включать устойчивый ответ, например ответ, который сохраняется по прошествии определенного периода времени с начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, стойкий ответ определяется частотой ответов приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, ответ является устойчивым в течение больше 3 месяцев или больше 6 месяцев.

В некоторых аспектах, критерии RECIST используются для определения объективного ответа опухоли; в некоторых аспектах, при солидных опухолях. (Eisenhauer et al., European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247.) В некоторых аспектах, критерии RECIST используются для определения объективного ответа опухоли на поражения-мишени. В некоторых отношениях, полный ответ, определяемый с использованием критериев RECIST, описывается как исчезновение всех поражений-мишеней, и любые патологические лимфатические узлы (независимо от того, являются мишенями или нет) должны уменьшаться по короткой оси до <10 мм. В других аспектах, частичный ответ, определяемый с использованием критериев RECIST, описывается как, по меньшей мере, 30% уменьшение суммы диаметров поражений-мишеней, принимая в качестве эталона исходные суммы диаметров. В других аспектах, прогрессирующее заболевание (PD) описывается как увеличение суммы диаметров поражений-мишеней, по меньшей мере, на 20%, принимая за эталон наименьшую сумму в исследовании (включая исходную сумму, если она является наименьшей в исследовании). В дополнение к относительному увеличению на 20%, сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение, по меньшей мере, на 5 мм (в некоторых аспектах, появление одного или нескольких новых

поражений также считается прогрессированием). В других аспектах, стабильное заболевание (SD) описывается как ни достаточное уменьшение, чтобы квалифицировать PR, ни достаточное увеличение, чтобы квалифицировать PD, принимая в качестве эталона наименьшие суммарные диаметры во время исследования.

В некоторых вариантах осуществления, показатели выживаемости у субъектов с фолликулярной лимфомой (FL) основаны на системах оценки, разработанных Итальянской интергруппой по лимфоме (ILI) и/или Международным проектом прогностических факторов фолликулярной лимфомы (IFLPFP), в общем, как описано выше (Luminari et al., (2012) Rev. Brad. Hematol. Hemoter., 34:54-59). В некоторых вариантах осуществления, степень заболевания, такого как FL, может быть оценена по системе стадирования Анн Арбор, опухолевой массе, генерализованной лимфаденопатии, количеству узловых или экстранодальных очагов заболевания и/или поражению костного мозга, в целом, как описано выше.

В некоторых аспектах, введение в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями обычно уменьшает или предотвращает распространение или бремя заболевания или состояния у субъекта. Например, когда заболевание или состояние представляет собой опухоль, способы обычно уменьшают размер опухоли, объем, метастазирование, долю бластов в костном мозге или рак, обнаруживаемый на молекулярном уровне, и/или улучшают прогноз или выживаемость или другие симптомы, связанные с опухолевой массой.

Бремя заболевания может охватывать общее количество клеток болезни у субъекта или в органе, ткани или телесной жидкости субъекта, например, в органе или ткани опухоли или в другом месте, например, которое может указывать на метастазирование. Например, опухолевые клетки могут быть обнаружены и/или количественно определены в крови или костном мозге в связи с определенными гематологическими злокачественными новообразованиями. Бремя заболевания может включать, в некоторых вариантах осуществления, опухолевую массу, количество или протяженность метастазов и/или долю бластных клеток, присутствующих в костном мозге.

В некоторых аспектах, минимальную остаточную болезнь (MRD) выявляют с помощью проточной цитометрии. Проточная цитометрия может использоваться для мониторинга образцов костного мозга и периферической крови на наличие раковых клеток. В конкретных аспектах, проточная цитометрия используется для обнаружения или мониторинга наличия раковых клеток в костном мозге. В некоторых аспектах, для обнаружения раковых клеток используют многопараметрическую иммунологическую детекцию с помощью проточной цитометрии (см., например, Coustan-Smith et al., (1998) Lancet 351:550-554). В некоторых аспектах, для обнаружения раковых клеток используют многопараметрическую иммунологическую детекцию с помощью масс-цитометрии. В некоторых примерах, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 параметров может использоваться для обнаружения раковых клеток. Антигены, используемые для обнаружения, выбирают на основании обнаруживаемого рака (Foon and

Todd (1986) Blood 68:1-31).

В некоторых примерах, костный мозг собирают путем аспирации костного мозга или биопсии костного мозга, и лимфоциты выделяют для анализа. Моноклональные и/или поликлональные антитела, конъюгированные с флуорохромом (*например*, флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), фикоэритрином, белком перидининхлорофиллом или биотином), можно использовать для обнаружения эпитопов, таких как терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT), CD3, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD34, CD45, CD56, CD79b, IgM и/или KORSA3544 на выделенных лимфоцитах. Затем меченые клетки можно обнаружить с помощью проточной цитометрии, такой как многопараметрическая проточная цитометрия или масс-цитометрия, для обнаружения множественных эпитопов.

Лимфоидные клетки можно идентифицировать и гейтировать на основе точечной диаграммы светорассеяния, и затем вторично гейтировать, чтобы идентифицировать клеточные популяции, имеющие представляющий интерес иммунофенотипические признаки. Примеры эпитопов представлены в **Таблице 2** ниже. Другая иммунологическая классификация лейкозов и лимфом представлена Foon and Todd (Blood (1986) 68(1): 1-31). В некоторых аспектах, оценка MRD проточной цитометрией может быть достигнута путем количественного определения живых лимфоцитов, несущих один или несколько иммунофенотипов CLL (*например*, низкое прямое/боковое рассеяние; CD3^{neg}; CD5⁺; CD14^{neg}; CD19⁺; CD23⁺; CD45⁺; CD56^{neg}).

| Таблица 2. Типовые иммунофенотипические и цитогенетические характеристики | | |
|--|---|---|
| Заболевание | Иммунофенотип | Цитогенетика |
| Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) | Pan-B+; CD5+; CD23+; CD79b/CD22 слабый; FMC7-; sIg слабый | Trisomy12 del(13)(q14.3) del 11q22-q23 del 17p13 (p53) t(11;14)(q13;q32) BCL1/IgH реаранжировка t(14;19)(q32;q13) IgH делеция (14q32) del(6q) +8q24 +3 +18 del 6q21 |
| Малая лимфоцитарная лимфома (SLL) | Pan-B+; CD5+; CD23+; CD10-; | del(6)(q21-23) |

| Таблица 2. Типовые иммунофенотипические и цитогенетические характеристики | | |
|---|--|--|
| Заболевание | Иммунофенотип | Цитогенетика |
| | sIgM+ тусклый | |
| Лимфоплазмацитарная лимфома | Pan-B+; CD5-; CD10-; cyIgM+ | t(9;14)(p13;q32) PAX5/IgH |
| Лимфома клеток центрального фолликула | Pan-B+; CD10+/-; CD5-; sIg+ | t(14;18)(q32;q21) / BCL2 реаранж |
| Диффузная крупноклеточная лимфома | CD19+; CD22+; CD10-/+; SIg+ | t(14;18) и p53 мутации t(3;V)(q27;V)/ BCL6 реаранж варианты c-MYC реаранж |
| Лимфома Буркитта | Pan-B+; TdT-; CD10+; CD5-; sIgM+ | t(8;14)(q24;q32) или варианты/c-MYC реаранж |
| Лимфома, подобная Буркитта | Pan-B+; TdT-; CD10-/+ CD5-; sIg+ | t(8;14) или варианты t(8;14)+ t(14;18) |
| Мантейноклеточная лимфома | Pan-B +; CD5+; CD23-; CD10-/+; sIgM+ яркий | t(11;14)(q13;q32) / BCL1 реаранж |
| В-клеточная лимфома маргинальной зоны (MZBCL) | pan-B+; CD5-/+; CD10-; CD23-; CD11c+/-; cyIg + (40% клеток), sIgM+ яркий; sIgD- | t(11;18)(q21;q21) / PI2/MLT слияние: Экстранодальная MALT лимфома низкой степени, индолентное заболевание t(1;14)(p21;q32): Экстранодальная MALT лимфома del(7)(q22-31): MZBCL селезенки /+3q: Узловая, экстранодальная и селезеночная MZBCL |
| <p>+: положительная в >90% случаев +/-: положительная больше чем в 50% случаев -/+ : положительная меньше чем в 50% случаев -: положительная в <10% случаев</p> <p>Маркеры Pan-B: например, CD19, CD20, CD79a sIG: поверхностные иммуноглобулины cyIg: цитоплазматические иммуноглобулины</p> | | |

В некоторых аспектах, для обнаружения минимальной остаточной болезни (MRD)

можно использовать глубокое секвенирование локуса тяжелой цепи иммуноглобулина (IGH) собранных В-клеток. Клональное присутствие конкретной реаранжировки IgG может служить маркером для обнаружения наличия В-клеточных злокачественных новообразований, таких как CLL или NHL, и/или остаточного присутствия их злокачественных клеток. В некоторых аспектах, клетки, такие как популяция, содержащая или предположительно содержащая В-клетки, собирают и выделяют из крови. В некоторых аспектах, клетки собирают и выделяют из костного мозга, например, из аспиратов костного мозга или биоптатов костного мозга и/или из других биологических образцов. В некоторых аспектах, амплификация определяющей комплементарности области 3 (CDR3) полимеразной цепной реакцией (ПЦР) достигается с использованием праймеров к высококонсервативным последовательностям в областях V и J локуса гена, которые можно использовать для идентификации клональных популяций клеток с целью оценки минимальной остаточной болезни. Другие способы обнаружения клональных популяций, такие как подходы к секвенированию отдельных клеток, включая те, которые предоставляют информацию о количестве клеток конкретной линии и/или экспрессии конкретной вариабельной цепи, такой как вариабельная тяжелая цепь или ее сайт связывания, например, клональная популяция, могут быть использованы. В некоторых аспектах, ДНК IGH амплифицируют с использованием вырожденных праймеров или праймеров, распознающих области вариабельных цепей, общих для разных клеточных клонов, таких как распознающие консенсусную V область и вырожденную консенсусную J область последовательности IGH. Типовой последовательностью V области является ACACGGCCTCGTGTATTACTGT (SEQ ID NO: 57). Типовой вырожденной консенсусной последовательностью J области является ACCTGAGGAGACGGTGACC (SEQ ID NO: 58).

Продукт ПЦР или результат секвенирования в некоторых аспектах, является специфичным для реаранжированного аллеля и служит клональным маркером для обнаружения MRD. После ПЦР амплификации области CDR3, продукты ПЦР могут быть секвенированы для получения специфичных для пациента олигонуклеотидов, сконструированных в качестве зондов для аллель-специфичной ПЦР для чувствительного обнаружения MRD после лечения В-клеточных злокачественных новообразований с помощью CAR-T-клеточной терапии, например, CD19 CAR-T-клеточной терапии. В примерах, где продукт ПЦР не создается с использованием консенсусных праймеров, вместо них можно использовать специфичные для семейства V области праймеры для каркасной области 1.

В некоторых аспектах, жизнестойкость определяемых с помощью ПЦР опухолевых клеток, таких как клетки В-клеточного злокачественного новообразования, такого как NHL или CLL, таких как обнаруживаемые последовательности IGH, соответствующие злокачественным или клональным последовательностям IGH, после лечения связаны с повышенным риском рецидива. В некоторых аспектах, пациенты с отрицательным результатом злокачественных последовательностей IGH после лечения (в некоторых аспектах, даже в контексте других критериев, указывающих на прогрессирующее

заболевание или только частичный ответ, таких как сохранение увеличенных лимфатических узлов или других критериев, которые могут в некоторых контекстах быть связаны с заболеванием или отсутствием полного ответа) могут рассматриваться как имеющие повышенную вероятность PFS или вступление в CR, или устойчивый CR, или пролонгированное выживание по сравнению с пациентами с жизнестойкими злокачественными последовательностямиIGH. В некоторых вариантах осуществления, такие прогностические и стадийные определения особенно важны для лечения, при котором элиминация злокачественных клеток наблюдается в течение короткого периода времени после введения терапии, например, по сравнению с исчезновением других клинических симптомов, таких как размер лимфатических узлов или другие критерии стадии. Например, в некоторых таких аспектах, отсутствие обнаруживаемогоIGH или минимальное остаточное заболевание в образце, таком как костный мозг, может быть предпочтительным показателем ответа или вероятности ответа или его продолжительности по сравнению с другими доступными подходами к стадированию или прогностическим действиям. В некоторых аспектах, результатыMRD, например, данные глубокого секвенированияIGH, могут указывать на дальнейшее вмешательство или его отсутствие. Например, способы и другие предложенные варианты осуществления в некоторых контекстах предусматривают, что субъект, признанный отрицательным в отношении злокачественнойIGH, может в некоторых аспектах, не подвергаться дальнейшему лечению или ему не может быть дополнительно введена доза предоставленной терапии, или что субъекту может быть назначена более низкая или уменьшенная доза. Наоборот, может быть предусмотрено или указано, что субъект, проявляющийMRD посредством глубокого секвенированияIGH, будет дополнительно лечиться, например, с помощью терапии, первоначально назначаемой в аналогичной или более высокой дозе, или с помощью дополнительного лечения. В некоторых аспектах, заболевание или состояние сохраняется после введения первой дозы, и/или введения первой дозы недостаточно для ликвидации заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, способ снижает бремя заболевания или состояния, например, количество опухолевых клеток, размер опухоли, продолжительность выживания пациента или бессобытийную выживаемость, в большей степени и/или в течение большего периода времени, по сравнению со снижением, которое наблюдалось бы при использовании сравнимого способа с использованием альтернативной схемы дозирования, такой как схема, при которой субъект получает один или несколько альтернативных терапевтических агентов, и/или схема, при которой субъект не получает дозу клеток и/или противолимфатический агент в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания или состояния у субъекта определяют, оценивают или измеряют. Бремя заболевания может быть определено, в некоторых аспектах, путем определения общего количества заболевания или ассоциированных с заболеванием клеток, например, опухолевых клеток, у субъекта, или в органе, ткани или жидкости тела

субъекта, такой как кровь или сыворотка. В некоторых аспектах, оценивают выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, наличие или продолжительность бессобытийной или бессимптомной выживаемости или безрецидивной выживаемости. В некоторых вариантах осуществления, оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, указана мера бремени заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, бессобытийная выживаемость или общая выживаемость субъекта улучшаются с помощью способов по сравнению с другими способами, например, способами, в которых субъект получает один или несколько альтернативных терапевтических агентов, и/или способами, в которых субъект не получает дозу клеток и/или противолимфомный агент в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. Например, в некоторых вариантах осуществления, бессобытийная выживаемость или вероятность для субъектов, пролеченных указанными способами, через 6 месяцев после введения дозы составляет больше чем примерно 40%, больше чем примерно 50%, больше чем примерно 60%, больше чем примерно 70%, больше примерно 80%, больше примерно 90% или больше примерно 95%. В некоторых аспектах, общая выживаемость составляет больше чем примерно 40%, больше чем примерно 50%, больше чем примерно 60%, больше чем примерно 70%, больше чем примерно 80%, больше чем примерно 90% или больше чем примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления, субъект, получающий лечение указанными способами, демонстрирует бессобытийную выживаемость, безрецидивную выживаемость или выживаемость, по меньшей мере, до 6 месяцев или, по меньшей мере, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления, время до прогрессирования улучшается, например, время до прогрессирования составляет больше чем точно или примерно 6 месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

В некоторых вариантах осуществления, после лечения данным способом, вероятность рецидива снижается по сравнению с другими способами, например, способами, при которых субъект получает один или несколько альтернативных терапевтических агентов, и/или способом, при котором субъект не получает дозу клеток и/или противолимфомный агент в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. Например, в некоторых вариантах осуществления, вероятность рецидива через 6 месяцев после первой дозы составляет меньше примерно 80%, меньше примерно 70%, меньше примерно 60%, меньше примерно 50%, меньше примерно 40%, меньше примерно 30%, меньше примерно 20% или меньше примерно 10%.

В некоторых случаях, определяют фармакокинетику вводимых клеток, например адоптивно перенесенных клеток, для оценки доступности, например биодоступности вводимых клеток. Способы определения фармакокинетики адоптивно перенесенных клеток могут включать забор периферической крови у субъектов, которым вводили сконструированные клетки, и определение количества или доли сконструированных

клеток в периферической крови. Подходы к отбору и/или выделению клеток могут включать использование антител, специфичных к химерному антигенному рецептору (CAR) (например, Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): 177ra38) белка L (Zheng et al., *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29), эпитопных меток, таких как последовательности Strep-Tag, вводимых непосредственно в определенные сайты в CAR, где связывающие реагенты для Strep-Tag используют для непосредственной оценки CAR (Liu et al. (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; публикация международной заявки на патент № WO2015095895), и моноклональных антител, которые специфически связываются с полипептидом CAR (см. публикацию международной заявки на патент № WO2014190273). Внешние маркерные гены в некоторых случаях могут быть использованы в связи со сконструированной клеточной терапией, чтобы обеспечить обнаружение или селекцию клеток, и в некоторых случаях, также способствовать самоубийству клеток. Усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt) в некоторых случаях может коэкспрессироваться с представляющим интерес трансгеном (CAR или TCR) в трансдуцированных клетках (см., например, патент США № 8,802,374). EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbix®), или другим терапевтическим анти-EGFR антителом, или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, сконструированных с помощью конструкции EGFRt и другого рекомбинантного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR) и/или для элиминации или разделения клеток, экспрессирующих рецептор. См. патент США № 8,802,374 и Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434).

В некоторых вариантах осуществления, количество CAR⁺ Т-клеток в биологическом образце, полученном от пациента, например, в крови, можно определить через некоторое время после введения клеточной терапии, например, для определения фармакокинетики клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество CAR⁺ Т-клеток, необязательно CAR⁺ CD8⁺ Т-клеток и/или CAR⁺ CD4⁺ Т-клеток, обнаруживаемых в крови субъекта или у большинства субъектов, получавших лечение таким способом, составляет больше 1 клетки на мкл, больше 5 клеток на мкл или больше 10 клеток на мкл.

С. Токсичность

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы разработаны или включают в себя признаки, которые приводят к более низкой частоте и/или более низкой степени токсичности, токсическому результату или симптому, профилю, способствующему токсичности, фактору или свойству, такому как симптом или результат, ассоциированный с или указывающий на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность (NT), например, по сравнению с введением альтернативной клеточной терапии, такой как альтернативная композиция CAR⁺ Т-клеток и/или альтернативное дозирование клеток, например дозирование клеток которые не вводят в определенном соотношении. Синдром высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичность) можно классифицировать в соответствии с согласованной системой оценки Американского

общества трансплантологии и клеточной терапии (ASTCT) (см., например, Lee et al. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019 Apr;25(4):625-38)).

В некоторых аспектах, несмотря на то, что ожидается, что более низкое состояние дифференциации сконструированных Т-клеток, вводимых как часть способов, предложенных в настоящем документе (например, более высокая доля сконструированных Т-клеток, имеющих фенотип, подобный наивному или центральной памяти, такой как фенотип, выбранный из $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ или $CD62L^-CCR7^+$) сделает их более активными, чем более дифференцированные клетки, результаты показывают, что безопасность клеточной терапии можно успешно контролировать. В некоторых аспектах, предоставление более низкой дозы композиции, например, по сравнению с клеточной композицией, полученной с помощью процесса, в котором клетки являются более дифференцированными, такого как процесс, который включает размножение клеток, обеспечивает надежную эффективность и высокую безопасность. В некоторых аспектах, обнаружено, что даже более высокие дозы клеток предложенных композиций анти-BCMA CAR можно вводить при сохранении более низкой степени токсичности, такой как тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелая нейротоксичность. Таким образом, предложенные способы в некоторых вариантах осуществления, включают введение более высоких доз сконструированных Т-клеток (например, больше 50×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, например, точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток), по сравнению со способами, которые включают введение альтернативной клеточной терапии, такой как альтернативная CAR^+ Т-клеточная композиция со сконструированными Т-клетками, которые являются более дифференцированными, чем те, которые вводятся в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы не приводят к высокой частоте или вероятности токсичности или токсических исходов или снижают частоту или вероятность токсичности или токсических исходов, таких как нейротоксичность (NT), синдром высвобождения цитокинов (CRS), например, по сравнению с некоторыми другими клеточными способами лечения. В некоторых вариантах осуществления, способы не приводят или не увеличивают риск развития тяжелого NT (sNT), тяжелого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, лихорадки, по меньшей мере, точно или примерно 38 градусов Цельсия в течение примерно трех или больше дней, и уровень CRP в плазме, по меньшей мере, точно или примерно 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления, больше или больше примерно 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или больше субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами, не демонстрируют какой-либо степени CRS или какой-либо степени нейротоксичности. В некоторых вариантах осуществления, не больше чем 50% пролеченных субъектов (например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или больше пролеченных субъектов) демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) выше 2 степени

и/или нейротоксичность выше 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу (например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или больше пролеченных субъектов) не демонстрируют тяжелый токсический исход (например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность), например, не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше и/или не демонстрируют тяжелый CRS или не демонстрируют его в течение определенного периода времени время после лечения, например, в течение недели, двух недель или одного месяца после введения клеток. В некоторых вариантах осуществления, параметры, оцениваемые для определения определенных видов токсичности, включают нежелательные явления (НЯ), дозопонижающую токсичность (DLT), CRS и NT.

Введение адоптивной Т-клеточной терапии, такой как лечение Т-клетками, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы, может вызывать токсические эффекты или исходы, такие как синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность. В некоторых примерах, такие эффекты или исходы параллельны высоким уровням циркулирующих цитокинов, которые могут лежать в основе наблюдаемой токсичности.

В некоторых аспектах, токсический исход представляет собой или ассоциирован с или указывает на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелый CRS (sCRS). CRS, например, sCRS, может возникать в некоторых случаях после адоптивной Т-клеточной терапии и введения субъектам других биологических продуктов. См. Davila et al., *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518 (2013); и Kochenderfer et al., *Blood* 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

Как правило, CRS вызывается преувеличенным системным иммунным ответом, опосредованным, например, Т-клетками, В-клетками, НК-клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут высвобождать большое количество медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут вызывать острый воспалительный ответ и/или индуцировать повреждение эндотелия органов, что может привести к микроваскулярной утечке, сердечной недостаточности или смерти. Тяжелый, опасный для жизни CRS может привести к легочной инфильтрации и повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови. Другие тяжелые, опасные для жизни токсические эффекты могут включать сердечную токсичность, респираторный дистресс, неврологическую токсичность и/или печеночную недостаточность. В некоторых аспектах, лихорадка, особенно высокая лихорадка ($\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ или $\geq 101,3^{\circ}\text{F}$), связана с CRS или его риском. В некоторых случаях, признаки или симптомы CRS имитируют инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, инфекция также рассматривается у субъектов с симптомами CRS, и можно проводить мониторинг с помощью посевов и проводить эмпирическую терапию антибиотиками. Другие симптомы, связанные с CRS, могут включать сердечную дисфункцию, респираторный дистресс-синдром взрослых, почечную и/или печеночную

недостаточность, коагулопатии, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и синдром капиллярной утечки.

CRS можно лечить с помощью противовоспалительной терапии, такой как анти-IL-6 терапия, например, анти-IL-6 антитело, например, тоцилизумаб, или антибиотики или другие агенты, как описано. Исходы, признаки и симптомы CRS известны и включают описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, если конкретное введение влияет или не влияет на данный исход, признак или симптом, связанный с CRS, могут быть указаны конкретные исходы, признаки и симптомы и/или их количество или степень.

В контексте введения клеток, экспрессирующих CAR, CRS обычно возникает в течение двух недель после инфузии клеток, экспрессирующих CAR. См. Xu et al., *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78. В некоторых случаях, CRS возникает меньше чем через 6 дней или больше чем через 20 дней после инфузии CAR T-клеток. Частота и сроки развития CRS могут быть связаны с исходным уровнем цитокинов или опухолевой массой во время инфузии. Обычно CRS включает повышенные сывороточные уровни интерферона (IFN)- γ , фактора некроза опухоли (TNF)- α и/или интерлейкина (IL)-2. Другими цитокинами, которые могут быстро индуцироваться при CRS, являются IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10.

Типовые исходы, связанные с CRS, включают лихорадку, дрожь, озноб, гипотензию, одышку, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), энцефалопатию, повышение ALT/AST, почечную недостаточность, сердечные нарушения, гипоксию, неврологические нарушения и смерть. Неврологические осложнения включают делирий, судорожную активность, спутанность сознания, трудности с подбором слов, афазию и/или притупление сознания. Другие исходы, связанные с CRS, включают утомляемость, тошноту, головную боль, судороги, тахикардию, миалгии, сыпь, синдром острой сосудистой утечки, нарушение функции печени и почечную недостаточность. В некоторых аспектах, CRS связан с увеличением одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногенемией или гепатоспленомегалией. Другие типовые признаки или симптомы, связанные с CRS, включают гемодинамическую нестабильность, фебрильную нейтропению, повышение уровня С-реактивного белка (CRP) в сыворотке крови, изменения параметров свертывания крови (например, международного нормализованного отношения (INR), протромбинового времени (PTI) и/или фибриногена), изменения функции сердца и других органов и/или абсолютного количества нейтрофилов (ANC).

В некоторых вариантах осуществления, исходы, связанные с CRS, включают одно или несколько из: постоянной лихорадки, например, лихорадки определенной температуры, например, выше точно или примерно 38 градусов Цельсия, в течение двух или больше, например, трех или больше, например, четырех или больше дней или не меньше трех дней подряд; лихорадки выше точно или примерно 38 градусов Цельсия; повышения уровня цитокинов, такого как максимальное кратное изменение, например, по

меньшей мере, точно или примерно 75, по сравнению с уровнями, по меньшей мере, двух цитокинов до лечения (например, по меньшей мере, двух из группы, состоящей из интерферон гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF α)), или максимального кратного изменения, например, по меньшей мере, точно или примерно 250, по меньшей мере, для одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере, одного клинического признака токсичности, такого как гипотензия (например, измеренная, по меньшей мере, одним внутривенным вазоактивным прессором); гипоксии (например, уровня кислорода (PO $_2$) в плазме ниже или примерно 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, притупление чувствительности и судороги). В некоторых вариантах осуществления, одновременно с CRS может наблюдаться нейротоксичность (NT).

Типовые исходы, связанные с CRS, включают повышенные или высокие уровни в сыворотке одного или нескольких факторов, включая цитокины и хемокины, и другие факторы, связанные с CRS. Типовые исходы дополнительно включают увеличение синтеза или секреции одного или нескольких таких факторов. Такой синтез или секреция может осуществляться Т-клеткой или клеткой, взаимодействующей с Т-клеткой, такой как врожденная иммунная клетка или В-клетка.

В некоторых вариантах осуществления сывороточные факторы, ассоциированные с CRS, или исходы, связанные с CRS, включают воспалительные цитокины и/или хемокины, включая интерферон гамма (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2R α , гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный воспалительный белок (MIP)-1, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), IL-6, и IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, фракталкин и/или IL-5. В некоторых вариантах осуществления, фактор или результат включает С-реактивный белок (CRP). Помимо того, что он является ранним и легко измеримым фактором риска CRS, CRP также является маркером клеточного размножения. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, такие как ≥ 15 мг/дл, имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, не имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, показатель CRS включает показатель CRP и другой фактор, указывающий на CRS.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько воспалительных цитокинов или хемокинов контролируются до, во время или после лечения CAR. В некоторых аспектах, один или несколько цитокинов или хемокинов включают IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2R α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или воспалительный белок макрофагов (MIP). В некоторых вариантах осуществления, контролируют IFN- γ , TNF- α и IL-6.

Были разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS для прогнозирования того, какие пациенты с большей вероятностью будут подвержены риску развития sCRS (см. Davilla et al. Science Translational Medicine. 2014;

6(224):224ra25). Факторы включают лихорадку, гипоксию, гипотензию, неврологические изменения, повышенные уровни в сыворотке воспалительных цитокинов, таких как набор из семи цитокинов (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и GM-CSF), вызванное лечением повышение которых может хорошо коррелировать как с опухолевой массой до лечения, так и с симптомами sCRS. Другие руководства по диагностике и управлению CRS известны (см., например, Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95; Lee et al., Biol Blood Marrow Transplant 2019; 25(4):625-38). В некоторых вариантах осуществления, критерии, отражающие степень CRS, подробно описаны в **Таблице 3** ниже.

| Таблица 3: Типовые критерии классификации для CRS | |
|--|--|
| Оценка | Описание симптомов |
| 1 Незначительный | Не опасен для жизни, требует только симптоматического лечения, такого как жаропонижающие и противорвотные средства (например, лихорадка, тошнота, утомляемость, головная боль, миалгии, недомогание) |
| 2 Умеренный | Требует умеренного вмешательства и реакции на него: Потребность в кислороде <40%, или Гипотензия, отвечающая на прием жидкости или низкую дозу одного вазопрессора, или Органотоксичность 2 степени (по STCAE v4.0) |
| 3 Тяжелый | Требует и отвечает на агрессивное вмешательство: Потребность в кислороде \geq 40% или Гипотензия, требующая высокой дозы одного вазопрессора (например, норэпинефрина \geq 20 мкг/кг/мин, дофамина \geq 10 мкг/кг/мин, фенилэфрина \geq 200 мкг/кг/мин или адреналина \geq 10 мкг/кг/мин), или Гипотензия, требующая применения нескольких вазопрессоров (например, вазопрессина+одного из вышеперечисленных препаратов или комбинации вазопрессоров, эквивалентной \geq 20 мкг/кг/мин норэпинефрина), или Органотоксичность 3 степени или трансаминалит 4 степени (по STCAE v4.0) |
| 4 Опасен для жизни | Опасен для жизни: Требует дыхательной поддержки аппаратом ИВЛ, или Органотоксичность 4 степени (исключая трансаминалит) |
| 5 | Смерть |

| | |
|-----------|--|
| Фатальный | |
|-----------|--|

В некоторых вариантах осуществления, критерии, отражающие степень CRS, включают такие, которые подробно описаны в **таблице 4** ниже.

| Таблица 4. Типовые критерии градации CRS | | | | |
|---|--|--|--|--------------------------------------|
| Симптомы/признаки | 1 степень (легкий) | 2 степень (умеренный) | 3 степень (тяжелый) | 4 степень (опасный для жизни) |
| | Степень CRS определяется наиболее тяжелым симптомом (исключая лихорадку) | | | |
| Температура $\geq 38,5^{\circ}\text{C}/101,3^{\circ}\text{F}$ | Любой | Любой | Любой | Любой |
| Систолическое артериальное давление (SBP) ≤ 90 мм рт.ст. | Н/Д | Отвечает на жидкость или одну низкую дозу вазопрессора | Нужна высокая доза или несколько вазопрессоров | Опасно для жизни |
| Потребность в кислороде для достижения $\text{SaO}_2 > 90\%$ | Н/Д | $\text{FiO}_2 < 40\%$ | $\text{FiO}_2 \geq 40\%$ | Нуждается в ИВЛ |
| Органная токсичность | Н/Д | 2 степень | 3 степень или трансаминит | 4 степень (исключая трансаминит) |

В некоторых вариантах осуществления, терапия высокими дозами вазопрессоров включает лечение, описанное в **Таблице 5** ниже.

| Таблица 5. Высокие дозы вазопрессоров (все дозы требуются в течение ≥ 3 часов) | |
|---|---|
| Вазопрессор | Доза |
| Монотерапия норэпинефрином | ≥ 20 мкг/мин |
| Монотерапия дофамином | ≥ 10 мкг/кг/мин |
| Монотерапия фенилэфрином | ≥ 200 мкг/мин |
| Монотерапия эпинефрином | ≥ 10 мкг/мин |
| Если на вазопрессине | Эквивалент вазопрессина+норэпинефрина (NE) ≥ 10 мкг/мин ^a |
| Если на комбинированных вазопрессорах (не вазопрессин) | Эквивалент норэпинефрина ≥ 20 мкг/мин ^a |
| ^a Уравнение эквивалента вазопрессора в испытании VASST: Эквивалентная доза | |

$$\text{норэпинефрина} = [\text{норэпинефрин (мкг/мин)}] + [\text{дофамин (мкг/кг/мин)} \div 2] + [\text{эпинефрин (мкг/мин)}] + [\text{фенилэфрин (мкг/мин)} \div 10]$$

В некоторых вариантах осуществления токсический исход представляет собой тяжелый CRS. В некоторых вариантах осуществления, токсический исход представляет собой отсутствие тяжелого CRS (например, умеренный или легкий CRS). В некоторых вариантах осуществления, считается, что у субъекта развился «тяжелый CRS» («sCRS») в ответ на введение клеточной терапии или дозы ее клеток или вторично после введения, если после введения у субъекта наблюдаются: (1) лихорадка по меньшей мере, 38 градусов Цельсия в течение, по меньшей мере, трех дней; (2) повышение уровня цитокинов, которое включает либо (а) максимальное кратное изменение, по меньшей мере, в 75 раз, по меньшей мере, для двух из следующей группы семи цитокинов по сравнению с уровнем сразу после введения: интерферон гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5 и/или (б) максимальное кратное изменение, по меньшей мере, в 250 раз, по меньшей мере, для одного из следующей группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем сразу после введения: интерферон гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5; и (с) по меньшей мере, один клинический признак токсичности, такой как гипотензия (требуемая по меньшей мере, одного внутривенного вазоактивного прессора) или гипоксия (PO $_2$ <90%), или одно или несколько неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, притупление болевой чувствительности и /или судороги). В некоторых вариантах осуществления, тяжелый CRS включает CRS со степенью 3 или выше, как указано в **Таблице 3** и **Таблице 4**.

В некоторых вариантах осуществления, уровень токсического исхода, например исхода, связанного с CRS, например уровень показателя CRS в сыворотке, измеряют с помощью ELISA. В некоторых вариантах осуществления, можно измерить лихорадку и/или уровни С-реактивного белка (CRP). В некоторых вариантах осуществления, субъекты с лихорадкой и CRP ≥ 15 мг/дл могут считаться имеющими высокий риск развития тяжелого CRS. В некоторых вариантах осуществления сывороточные факторы, связанные с CRS, или исходы, связанные с CRS, включают повышение уровня и/или концентрации воспалительных цитокинов и/или хемокинов, включая Flt-3L, фракталкин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерлейкин-1 бета (IL-1 β), IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, интерферон гамма (IFN- γ), воспалительный белок макрофагов (MIP)-1, MIP-1, sIL-2R α или фактор некроза опухоли альфа (TNF α). В некоторых вариантах осуществления, фактор или результат включает С-реактивный белок (CRP). Помимо того, что он является ранним и легко измеримым фактором риска CRS, CRP также является маркером клеточной экспансии. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, такие как ≥ 15 мг/дл, имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, не имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, показатель CRS включает показатель CRP и другой фактор, указывающий

на CRS.

В некоторых вариантах осуществления, исходы, связанные с тяжелым CRS или CRS 3 степени или выше, например 4 степени или выше, включают одно или несколько из: постоянной лихорадки, например, лихорадки определенной температуры, например, выше точно или примерно 38 градусов Цельсия, в течение двух или нескольких дней, например, трех или нескольких, например, четырех или нескольких дней или, по меньшей мере, трех дней подряд; лихорадка выше точно или примерно 38 градусов по Цельсию; повышение уровня цитокинов, такое как максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере, точно или примерно 75, по сравнению с уровнями, по меньшей мере, двух цитокинов до лечения (например, по меньшей мере, двух из группы, состоящей из гамма-интерферона (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF α)), или максимального кратного изменения, например, по меньшей мере, в точно или примерно 250, по меньшей мере, для одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере, одного клинического признака токсичности, такого как гипотензия (например, измеренная по меньшей мере, одним внутривенным вазоактивным прессором); гипоксия (например, уровень кислорода (PO $_2$) в плазме ниже или примерно 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменение психического состояния, притупление чувствительности и судороги). В некоторых вариантах осуществления, тяжелый CRS включает CRS, требующий лечения или ухода в отделении интенсивной терапии (ICU).

В некоторых вариантах осуществления, CRS, такой как тяжелый CRS, включает комбинацию (1) персистирующей лихорадки (лихорадки, по меньшей мере, 38 градусов Цельсия в течение, по меньшей мере, трех дней) и (2) уровня CRP в сыворотке, по меньшей мере, точно или примерно 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления, CRS включает гипотензию, требующую применения двух или нескольких вазопрессоров, или дыхательную недостаточность, требующую искусственной вентиляции легких. В некоторых вариантах осуществления, дозу вазопрессоров увеличивают при втором или последующем введении.

В некоторых вариантах осуществления, тяжелая форма CRS или CRS 3 степени включает повышение активности аланинаминотрансферазы, повышение активности аспаратаминотрансферазы, озноб, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункцию левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или тремор.

Может быть указан метод измерения или обнаружения различных исходов.

В некоторых аспектах, токсический исход связан или связан с нейротоксичностью. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с клиническим риском нейротоксичности, включают спутанность сознания, делирий, афазию, экспрессивную афазию, оглушение, миоклонус, летаргию, измененное психическое состояние, конвульсии, судорожную активность, судороги (необязательно, подтвержденные электроэнцефалограммой (ЭЭГ)), повышенные уровни бета-амилоида (A β), повышенные уровни глутамата и повышенные уровни кислородных радикалов. В некоторых вариантах

осуществления, нейротоксичность оценивается в зависимости от степени тяжести (например, с использованием шкалы оценок 1-5 (см., например, Guido Cavaletti & Paola Marmiroli Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (December 2010); Национальный институт рака - Общие критерии токсичности, версия 4,03 (NCI CTCAE, версия 4,03)).

В некоторых случаях, неврологические симптомы могут быть самыми ранними симптомами sCRS. В некоторых вариантах осуществления, неврологические симптомы появляются через 5-7 дней после инфузии клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность неврологических изменений может составлять от 3 до 19 дней. В некоторых случаях восстановление неврологических изменений происходит после исчезновения других симптомов sCRS. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-IL-6 и/или стероидом(ами) не ускоряет время или степень разрешения неврологических изменений.

В некоторых вариантах осуществления, считается, что у субъекта развилась «тяжелая нейротоксичность» в ответ на введение клеточной терапии или дозы ее клеток или вторично по отношению к ней, если после введения у субъекта демонстрируются симптомы, ограничивающие уход за собой (например, купание, одевание и раздевание, прием пищи, пользование туалетом, приеме лекарств) из числа: 1) симптомов периферической моторной невропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических моторных нервов; 2) симптомов периферической сенсорной невропатии, в том числе воспаление или дегенерация периферических сенсорных нервов, дизестезия, например, искажение сенсорного восприятия, приводящее к ненормальным и неприятным ощущениям, невралгия, например, интенсивное болезненное ощущение по ходу нерва или группы нервов, и/или парестезия, такая как функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящие к аномальным кожным ощущениям покалывания, онемения, давления, холода и тепла в отсутствие раздражителя. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность 3 степени или выше, как указано в **Таблице 6**.

| Таблица 6: Типовые критерии степени нейротоксичности | |
|---|--|
| Степень | Описание симптомов |
| 1 Бессимптомная или легкая | Временные или асимптоматические симптомы |
| 2 Умеренная | Наличие симптомов, которые ограничивают инструментальные действия по самообслуживанию (ADL), такие как приготовление пищи, покупка продуктов или одежды, использование телефона, управление деньгами |
| 3 Тяжелая | Наличие симптомов, ограничивающих ADL самообслуживание, такое как купание, одевание и раздевание, |

| | |
|------------------------|--|
| | самостоятельный прием пищи, пользование туалетом, прием лекарств |
| 4 Опасная для жизни | Симптомы, угрожающие жизни и требующие срочного вмешательства |
| 5 Фатальная | Смерть |

В некоторых вариантах осуществления, способы уменьшают симптомы, связанные с CRS или нейротоксичностью, по сравнению с другими способами. В некоторых аспектах, предложенные способы уменьшают симптомы, исходы или факторы, связанные с CRS, включая симптомы, исходы или факторы, связанные с тяжелым CRS или CRS степени 3 или выше, по сравнению с другими способами. Например, у субъектов, получавших лечение в соответствии с настоящими способами, могут отсутствовать поддающиеся обнаружению и/или сниженные симптомы, исходы или факторы CRS, например, тяжелый CRS или CRS 3 степени или выше, такие как любые из описанных, например, изложенных в **Таблице 3** и **Таблице 4**. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, получающие лечение в соответствии с настоящими способами, могут иметь ослабленные симптомы нейротоксичности, такие как слабость или онемение конечностей, потеря памяти, зрения и/или интеллекта, неконтролируемое навязчивое и/или компульсивное поведение, бред, головная боль, когнитивные и поведенческие проблемы, включая потерю контроля над движениями, ухудшение когнитивных функций, дисфункцию вегетативной нервной системы и сексуальную дисфункцию, по сравнению с субъектами, получавшими лечение другими способами. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, получающие лечение в соответствии с настоящими способами, могут иметь ослабленные симптомы, связанные с периферической моторной невропатией, периферической сенсорной невропатией, дизестезией, невралгией или парестезией.

В некоторых вариантах осуществления, способы снижают исходы, связанные с нейротоксичностью, включая повреждения нервной системы и/или головного мозга, такие как гибель нейронов. В некоторых аспектах, способы снижают уровень факторов, связанных с нейротоксичностью, таких как бета-амилоид (A β), глутамат и радикалы кислорода.

В некоторых вариантах осуществления, исход токсичности представляет собой дозолимитирующую токсичность (DLT). В некоторых вариантах осуществления, токсический исход представляет собой дозолимитирующую токсичность. В некоторых вариантах осуществления, токсический исход представляет собой отсутствие дозолимитирующей токсичности. В некоторых вариантах осуществления, дозолимитирующая токсичность (DLT) определяется как любая токсичность 3 степени или выше, согласно оценке любых известных или опубликованных руководств по оценке конкретной токсичности, таких как любые из описанных выше, включая Общие критерии терминологии нежелательных явлений (CTCAE) Национального института рака (NCI)

версии 4.0.

В некоторых вариантах осуществления низкая частота, риск или вероятность развития токсичности, например, CRS или нейротоксичности, тяжелой формы CRS или нейротоксичности, например, CRS или нейротоксичности 3 степени или выше, наблюдаемые при введении дозы Т-клеток в соответствии с предложенными способами, и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями, позволяет проводить клеточную терапию в амбулаторных условиях. В некоторых вариантах осуществления, введение клеточной терапии, например дозы Т-клеток (например, CAR⁺ Т-клеток) в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями, осуществляется амбулаторно или не требует госпитализации субъекта в стационар, например госпитализации, требующей ночного пребывания.

В некоторых аспектах, субъектам, получающим клеточную терапию, например дозу Т-клеток (например, CAR⁺ Т-клеток) в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, включая субъектов, получающих амбулаторное лечение, не проводили вмешательство для лечения какой-либо токсичности до или во время введения клеточной дозы, если не или до тех пор, пока у субъекта не проявятся признаки или симптомы токсичности, такой как нейротоксичность или CRS. Типовые агенты для лечения, отсрочки, ослабления или облегчения токсичности описаны в разделе I-C.

В некоторых вариантах осуществления, если у субъекта, которому вводили клеточную терапию, например, дозу Т-клеток (например, CAR⁺ Т-клеток), включая субъектов, получавших амбулаторное лечение, наблюдается лихорадка, субъекту вводят или инструктируют по приему или введению лечения для снижения лихорадки. В некоторых вариантах осуществления, лихорадка у субъекта характеризуется как температура тела субъекта, которая равна (или измерена) точно или превышает определенную пороговую температуру или уровень. В некоторых аспектах, пороговая температура представляет собой температуру, связанную, по меньшей мере, с субфебрильной температурой, по меньшей мере, с умеренной лихорадкой и/или, по меньшей мере, с высокой лихорадкой. В некоторых вариантах осуществления, пороговая температура представляет собой конкретную температуру или диапазон. Например, пороговая температура может составлять примерно 38, 39, 40, 41 или 42 градуса Цельсия и/или может находиться в диапазоне от точно или примерно 38 градусов Цельсия до точно или примерно 39 градусов Цельсия, диапазон от точно или примерно 39 градусов Цельсия до точно или примерно 40 градусов Цельсия, диапазон от точно или примерно 40 градусов Цельсия до точно или примерно 41 градуса Цельсия или диапазон от точно или примерно 41 градуса Цельсия до точно или примерно 42 градусов Цельсия.

В некоторых вариантах осуществления, лечение, сконструированное для снижения лихорадки, включает лечение жаропонижающим агентом. Жаропонижающий агент может включать любой агент, например, соединение, композицию или ингредиент, снижающий лихорадку, такой как один из любого числа агентов, о которых известно, что они

обладают жаропонижающим действием, таких как NSAID (таких как ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), салицилаты, такие как аспирин, салицилат холина, салицилат магния и салицилат натрия, парацетамол, ацетаминофен, метамизол, набуметон, фенаксон, антипирин, антипиретик. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, ацетаминофен можно вводить в дозе 12,5 мг/кг перорально или внутривенно каждые четыре часа. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой или содержит ибупрофен или аспирин.

В некоторых вариантах осуществления, если лихорадка является устойчивой, субъекту назначают альтернативное лечение для лечения токсичности, такое как любое, описанное в Разделе I-C. Для субъектов, получающих амбулаторное лечение, субъекту дают указание вернуться в больницу, если у субъекта имеется и/или установлено наличие устойчивой лихорадки. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или определяется или считается имеющим устойчивую лихорадку, если у него или нее наблюдается лихорадка точно соответствующая пороговой температуре или выше, и если лихорадка или температура тела субъекта не снижается или не снижается больше чем на указанную величину (например, больше чем на 1°C и, как правило, не колеблется примерно или больше чем на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C) после определенного лечения, такого как лечение, направленное на снижение лихорадки, такое как лечение жаропонижающим агентом, например, NSAID или салицилатами, например, ибупрофеном, ацетаминофеном или аспирином. Например, считается, что субъект имеет устойчивую лихорадку, если он или она демонстрирует или определено, что он демонстрирует лихорадку, по меньшей мере, точно или примерно 38 или 39 градусов Цельсия, которая не снижается или не снижается больше чем на точно или примерно 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C, или точно или примерно на 1%, 2%, 3%, 4% или 5% в течение 6 часов, в течение 8 часов, или в течение 12 часов, или в течение 24 часов, даже после лечения жаропонижающим средством, таким как ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, доза жаропонижающего средства представляет собой дозу, обычно эффективную для снижения лихорадки или лихорадки определенного типа, такой как лихорадка, связанная с бактериальной или вирусной инфекцией, например, локализованной или системной инфекцией.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или определен или считается имеющим устойчивую лихорадку, если он или она демонстрирует лихорадку с температурой, равной или превышающей соответствующую пороговую температуру, и если лихорадка или температура тела субъекта не изменяется примерно или больше чем на 1°C и обычно не изменяется примерно или больше чем примерно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C. Такое отсутствие изменения выше или на определенную величину обычно измеряется в течение заданного периода времени (например, в течение 24-часового, 12-часового, 8-часового, 6-часового, 3-часового или 1-часового периода времени, который может быть измерен с первых признаков лихорадки или с первой температуры выше

указанного порога). Например, в некоторых вариантах осуществления, субъект считается или определен как демонстрирующий устойчивую лихорадку, если он или она демонстрирует лихорадку, по меньшей мере, точно или примерно, или, по меньшей мере, точно при примерно 38 или 39 градусов Цельсия, которая не изменяется по температуре больше чем на точно или примерно 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C в течение 6 часов, в течение 8 часов, или в течение 12 часов, или в течение 24 часов.

В некоторых вариантах осуществления, лихорадка представляет собой устойчивую лихорадку; в некоторых аспектах, субъект лечится в то время, когда субъекта был определен как имеющий устойчивую лихорадку, например, в течение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или меньше часов после такого определения или первого такого определения после начальной терапии, способной вызвать токсичность, такой как клеточная терапия, такая как доза Т-клеток, например, CAR⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько вмешательств или агентов для лечения токсичности, таких как таргетирующая токсичность терапия, вводят во время или сразу после того, как субъект определен или подтвержден (например, впервые определен или подтвержден) как демонстрирующий устойчивую лихорадку, например, при измерении в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько таргетирующих токсичность терапий вводят в течение определенного периода времени после такого подтверждения или определения, например, в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов.

II. КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ И СКОНСТРУИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

В некоторых вариантах осуществления, способы клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии) описанные в настоящем документе, включают введение сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, CAR), сконструированные для распознавания и/или специфического связывания с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, таким как г/г/В-клеточная NHL. В конкретных вариантах осуществления, антиген, который связывается или распознается рекомбинантным рецептором (например, CAR), представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, связывание с антигеном приводит к ответу, такому как иммунный ответ против такого антигена. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат или сконструированы таким образом, чтобы содержать рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR). Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, обычно включает внеклеточный антиген (или лиганд), связывающий домен, специфичный к антигену, который связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах, посредством линкеров и/или трансмембранного(ых) домена(ов). В некоторых аспектах, сконструированные клетки предложены в виде фармацевтических композиций и составов, подходящих для введения субъектам, например, для адоптивной клеточной терапии. Также предложены терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам,

например, пациентам.

В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляется путем первой стимуляции клеток, например, путем его комбинации со стимулом, вызывающим ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, *например*, измеряемый по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

А. Химерные антигенные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления предложенных способов и применений, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат один или несколько доменов, объединяющих лигандсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность в отношении желаемого антигена (например, опухолевого антигена) с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть активирующего внутриклеточного домена, такого как домен активации Т-клеток, обеспечивающий первичный сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен для облегчения эффекторных функций. При специфическом связывании с молекулой, например, антигеном, рецептор обычно доставляет в клетку иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-трансдуцированный сигнал, тем самым стимулируя иммунный ответ, таргетирующий заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, химерные рецепторы, будучи генетически модифицированными в иммунных клетках, могут модулировать активность Т-клеток и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференциацию или гомеостаз Т-клеток, что приводит к получению генетически модифицированных клеток с улучшенной продолжительностью жизни, выживаемостью и/или жизнестойкостью *in vivo*, например, для использования в методах адоптивной клеточной терапии.

Примеры антигенных рецепторов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки включают описанные, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикации патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118, и заявке на европейский патент № EP2537416 и/или описанные Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012

October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах, антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США №: 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, описанные в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США № 7,446,190, патент США № 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; и Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177). См. также WO 2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США №: 7,446,190 и патент США №: 8,389,282.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), со специфичностью в отношении определенного антигена (или маркера, или лиганда), такого как антиген, экспрессируемый на поверхности определенного типа клетки. В некоторых вариантах осуществления, антиген, который таргетирует рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

Антигены, таргетируемые рецепторами, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, антиген, таргетируемый рецептором, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В конкретных аспектах, антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, любой из таких антигенов представляет собой антигены, экспрессируемые на В-клетках человека.

Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, который представляет собой антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой часть молекулы антитела, как правило, вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела, например, фрагмент scFv антитела. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb), такое как sdFv, нанотело, V_{NH} и V_{NAR} . В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv или V_H домен) специфически распознает антиген, такой как

CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются производными или являются вариантом антител или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с CD19. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которое связывает CD19, представляет собой антитело мыши, такое как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело человека, например, как описано в публикации патента США № US 2016/0152723.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен включает V_H и/или V_L , полученные из FMC63, которые в некоторых аспектах, могут представлять собой scFv. FMC63 обычно относится к моноклональному антителу IgG1 мыши, индуцированному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человека (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит CDR-H1 и CDR-H2, представленные в SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно, и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 40 или 54, и CDR-L1, представленные в SEQ ID NO: 35, и CDR-L2, представленные в SEQ ID NO: 36 или 55, и последовательности CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 37 или 56. В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:35, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:36 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:37 и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:38, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:39 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:40, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63, представленную в SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи FMC63, представленную в SEQ ID NO:42, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер представлен в SEQ ID NO:24. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv

кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO:25, или последовательностью, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:43, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:43.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен включает V_H и/или V_L , полученные из SJ25C1, которые в некоторых аспектах, могут представлять собой scFv. SJ25C1 представляет собой моноклональное антитело IgG1 мыши, индуцированное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 происхождения от человека (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 47-49, соответственно, и последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NOS: 44-46, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления, svFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:44, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:45 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:46 и/или или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:47, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:48 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:49, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи SJ25C1, представленную в SEQ ID NO:50, и переменную область легкой цепи SJ25C1, представленную в SEQ ID NO:51, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер представлен в SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:53, или последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:53.

Термин «антитело» используется в настоящем документе в самом широком смысле

и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, F(ab')₂ фрагменты, Fab фрагменты, Fv фрагменты, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (*например*, sdAb, sdFv, нанотело, V_HH или V_{NAR}) или их фрагменты. Термин охватывает генетически сконструированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, *например*, биспецифические антитела, диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как включающий его функциональные фрагменты антител. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD. В некоторых аспектах, CAR представляет собой биспецифический CAR, например, содержащий два антигенсвязывающих домена с разными специфичностями.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')₂, Fv или фрагмент одноцепочечного Fv (scFv)). В других вариантах осуществления, константная область тяжелой цепи антитела выбрана, *например*, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, *например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (*например*, IgG1 человека). В другом варианте осуществления, константная область легкой цепи антитела выбрана, *например*, из каппа или лямбда, в частности, каппа.

Известно, что термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», синонимичные терминам «гиперварибельная область» или «HVR», в некоторых случаях относятся к несмежным последовательностям аминокислот в переменных областях антител, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, имеется три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Известно, что «каркасные области» и «FR» в некоторых случаях относятся к не-CDR частям переменных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, имеется четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая

схемы, описанные Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации “Kabat”); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации “Chothia”); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745.” (схема нумерации “Contact”); Lefranc MP et al., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации “IMGT”); Honegger A and Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации “Aho”); и Martin et al., “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации “AbM”).

Границы данного CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация как для схемы Kabat, так и для схемы Chothia, основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, где вставки обозначаются буквами вставки, например, «30а», и в некоторых антителах появляются делеции. В этих двух схемах определенные вставки и делеции («инделы») размещаются в разных позициях, что приводит к дифференциальной нумерации. Схема Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом похожа на схему нумерации Chothia. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, основанный на схеме, используемой программным обеспечением для моделирования антител AbM компании Oxford Molecular.

В **Таблице 7** ниже перечислены типовые границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированные схемами Kabat, Chothia, AbM и Contact, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков приведена с использованием обеих схем нумерации Kabat и Chothia. FR расположены между CDR, например, с FR-L1, расположенным перед CDR-L1, FR-L2, расположенным между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3, расположенным между CDR-L2 и CDR-L3, и так далее. Следует отметить, что, поскольку показанная схема нумерации Kabat размещает вставки в H35A и H35B, конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием показанного соглашения о нумерации Kabat варьируется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 7. Границы CDR по разным схемам нумерации

| CDR | Kabat | Chothia | AbM | Contact |
|------------|--------------|----------------|------------|----------------|
| CDR-L1 | L24--L34 | L24--L34 | L24--L34 | L30--L36 |
| CDR-L2 | L50--L56 | L50--L56 | L50--L56 | L46--L55 |
| CDR-L3 | L89--L97 | L89--L97 | L89--L97 | L89--L96 |

| | | | | |
|---|-----------|--------------|-----------|-----------|
| CDR-H1 (нумерация Kabat ¹) | H31--H35B | H26--H32..34 | H26--H35B | H30--H35B |
| CDR-H1 (нумерация Chothia ²) | H31--H35 | H26--H32 | H26--H35 | H30--H35 |
| CDR-H2 | H50--H65 | H52--H56 | H50--H58 | H47--H58 |
| CDR-H3 | H95--H102 | H95--H102 | H95--H102 | H93--H101 |

1 - Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948

Таким образом, если не указано иное, «CDR» или «определяющая комплементарность область» или отдельные указанные CDR (*например*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такие как переменная область, следует рассматривать как охватывающую (или конкретную) определяющую комплементарность область, как определено любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. Например, когда указано, что конкретная CDR (*например*, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной V_H или V_L области аминокислотной последовательности, подразумевается, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (*например*, CDR-H3) в пределах переменной области, как определено любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления, указаны конкретные последовательности CDR. Типовые последовательности CDR предложенных антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что предоставленное антитело может включать CDR, как описано в соответствии с любой из других вышеупомянутых схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области техники.

Аналогичным образом, если не указано иное, FR или отдельные указанные FR (*например*, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такие как его переменная область, следует понимать как охватывающую (или конкретную) каркасную область, как определено любой из известных схем. В некоторых случаях, указана схема идентификации конкретных CDR, FR или FR или CDR, такой как CDR, как определено методом Kabat, Chothia, AbM или Contact, или другими известными схемами. В других случаях, приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела обычно имеют сходную структуру, где каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. (См., *например*, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с

использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_H или V_L , соответственно (см., *например*, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)).

Среди предложенных антител есть фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, F_v , Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; переменные участки тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные V_H одиночные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой фрагменты одноцепочечных антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv.

Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела обычно имеют сходную структуру, где каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. (См., *например*, Kindt et al. Kubu Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_H или V_L , соответственно. См., *например*, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывается с антигеном, таким как онкомаркер или антиген клеточной поверхности таргетируемой клетки или заболевания, например опухолевой клетки или раковой клетки, такой как любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем документе или известных. Примеры однодоменных антител включают sdFv, наноантитела, V_{HN} или V_{NAR} .

Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антитела представляют собой рекомбинантно продуцируемые фрагменты, такие как фрагменты, содержащие структуры, которые не встречаются в природе, такие как фрагменты с двумя или несколькими областями или цепями антител, соединенными

синтетическими линкерами, *например*, пептидными линкерами, и/или которые не могут быть продуцированы путем ферментативного расщепления встречающихся в природе интактных антител. В некоторых вариантах осуществления, фрагменты антител представляют собой scFv.

«Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR получены из CDR нечеловеческого происхождения, и все или по существу все аминокислотные остатки FR получены из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать, по меньшей мере, часть константной области антитела, происходящую от антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела нечеловеческого происхождения относится к варианту антитела нечеловеческого происхождения, которое подверглось гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности по отношению к человеку, при сохранении специфичности и аффинности родительского антитела нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (*например*, антитела, из которого получены остатки CDR), *например*, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, *например*, химерный антигенный рецептор, включает внеклеточную часть, содержащую один или несколько доменов связывания лиганда (*например*, антигена), такую как антитело или его фрагмент, и одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическим сигнальным доменом или областью). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, *например*, CAR, дополнительно включает спейсер и/или трансмембранный домен или часть. В некоторых аспектах, спейсер и/или трансмембранный домен может связывать внеклеточную часть, содержащую домен, связывающий лиганд (*например*, антиген), и внутриклеточную(ые) сигнальную(ые) область(и) или домен(ы).

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, *например*, шарнирная область IgG4, и/или область C_H1/C_L и/или Fc. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть относится к IgG человека, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит спейсерной областью между компонентом распознавания антигена, *например*, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, обеспечивающую повышенную ответимость клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В некоторых примерах, длина спейсера составляет точно или примерно 12 аминокислот или не больше 12 аминокислот. Примеры спейсеров включают

спейсеры, содержащие, по меньшей мере, примерно от 10 до 229 аминокислот, примерно от 10 до 200 аминокислот, примерно от 10 до 175 аминокислот, примерно от 10 до 150 аминокислот, примерно от 10 до 125 аминокислот, примерно от 10 до 100 аминокислот, примерно от 10 до 75 аминокислот, примерно от 10 до 50 аминокислот, примерно от 10 до 40 аминокислот, примерно от 10 до 30 аминокислот, примерно от 10 до 20 аминокислот или примерно от 10 до 15 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная область содержит примерно 12 аминокислот или меньше, примерно 119 аминокислот или меньше или примерно 229 аминокислот или меньше. Примеры спейсеров включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C_H3. Примеры спейсеров включают, но не ограничены ими, спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или публикации международной патентной заявки № WO2014031687.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, например, только шарнирный спейсер, представленный в SEQ ID NO: 1, и кодируемый последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и/или C_H3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, такой как представлен в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, такой как представлен в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит последовательность, богатую глицином-серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

В некоторых аспектах, спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который (а) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, шарнира IgG4 или его модифицированной версии, и/или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет длину точно или примерно 12 аминокислот и/или содержит или состоит из всего или

части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4 или его модифицированной версии; или (d) состоит или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3-5, 27-34 или 24, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с ними, или (e) содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин.

В некоторых вариантах осуществления, антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, прямо или косвенно связанный с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. Например, в некоторых аспектах, антигенраспознающий домен (например, внеклеточный домен) обычно связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антиген-рецептор, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор содержит трансмембранный домен, связанный или слитый между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным сигнальным доменом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами.

В одном варианте осуществления, используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других белков поверхности мембраны, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен, в некоторых вариантах осуществления, происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен, в некоторых аспектах, происходит от любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие из (*m.e.* содержащие, по меньшей мере, трансмембранную(ые) область(и)) альфа, бета или дзета цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB) или CD154. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления, является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах, триплет фенилаланина, триптофана и валина будет обнаружен на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связь

осуществляется с помощью линкеров, спейсеров и/или трансмембранных доменов. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28 или ее вариант. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рецептора, *например*, CAR, представляет собой трансмембранный домен CD28 человека или его вариант, *например*, трансмембранный домен из 27 аминокислот CD28 человека (№ доступа: P10747.1), или представляет собой трансмембранный домен, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления, часть рекомбинантного рецептора, содержащая трансмембранный домен, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, *например*, CAR, включает, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты, такие как внутриклеточная сигнальная область или домен. Активация Т-клеток, в некоторых аспектах, описывается как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах, CAR включает один или оба таких сигнальных компонента. Среди внутриклеточных сигнальных областей есть такие, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал через один только костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления, присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, *например*, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, *например*, дублет глицин-серин, который образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

В некоторых вариантах осуществления, при лигировании CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточная сигнальная область CAR активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки,

например Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, например, секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, усеченная часть внутриклеточной сигнальной области компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используется вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, *например*, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах, также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с таким рецептором для инициации передачи сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, обладающую такой же функциональной способностью. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности области или домена, которые участвуют в обеспечении костимулирующего сигнала.

В некоторых аспектах, CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают последовательности, полученные из CD3 дзета-цепи, FcR гамма, CD3 гамма, CD3 дельта и CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая(ие) сигнальная(ые) молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь TCR CD3, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, CD3 дзета цепь. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающая часть связана с одним или несколькими клеточными сигнальными модулями. В некоторых вариантах осуществления, клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых вариантах осуществления, рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных молекул, таких как Fc рецептор γ , CD8альфа, CD8бета, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc рецептором γ и CD8альфа, CD8бета, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная (или

цитоплазматическая) сигнальная область содержит цепь CD3 человека, необязательно, CD3 дзета-стимулирующий сигнальный домен или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 ζ человека (№ доступа: P20963. 2) или сигнальный домен CD3 дзета, как описано в патенте США № 7,446,190 или патенте США № 8,911,993. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

В контексте природного TCR, полная активация обычно требует не только передачи сигналов через TCR, но также костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, для стимуляции полной активации, в CAR также включен компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления, CAR не включает компонент для генерации костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает костимулирующую область или домен CD28 или 4-1BB, например, CD28 человека или 4-1BB человека.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область или домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такой как его домен из 41 аминокислоты и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или его функциональный вариант или его часть, такой как 42-аминокислотный цитоплазматический домен из 4-1BB человека (№ доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такой как аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 12, или аминокислотная последовательность, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает как первичные (или активирующие) цитоплазматические сигнальные области, так и костимулирующие сигнальные компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, активирующий домен включен в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, экспрессированные на одной и той же клетке (см. WO 2014/055668). В некоторых аспектах, клетки включают один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетки дополнительно включают ингибиторные CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфичного для заболевания или состояния, при котором активирующий сигнал, доставляемый через таргетирующий заболевание CAR, ослабляется или ингибируется связыванием ингибиторного CAR с его лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

В некоторых вариантах осуществления, два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал к клетке, так что лигирование одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, но лигирование второго ингибиторного рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR (iCAR). Такую стратегию можно использовать, например, для снижения вероятности нецелевых эффектов в контексте, в котором активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, и ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессирован на нормальных клетках, но не на клетках заболевания или состояния.

В некоторых аспектах, химерный рецептор представляет собой или включает ингибиторный CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такой как усиленный ITAM- и/или костимулирующий ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются компоненты, обнаруженные на молекулах иммунных контрольных точек, включая рецепторы PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах, сконструированная клетка включает ингибиторный CAR, включающий сигнальный домен такой ингибиторной молекулы или производный от нее, так что он служит для ослабления ответа клетки, например, индуцируемого активирующим и/или костимулирующим CAR.

В некоторых случаях, CAR называют CAR первого, второго и/или третьего

поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения представляет собой CAR, который обеспечивает исключительно индуцируемый CD3-цепью сигнал при связывании антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения, в некоторых аспектах, представляет собой CAR, который включает несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления, CAR включает один или несколько, *например*, два или несколько, костимулирующих доменов и домен активации, *например*, первичный домен активации, в цитоплазматической части. Примеры CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления, антигенный рецептор дополнительно включает маркер и/или клетки, экспрессирующие CAR, или другой антигенный рецептор дополнительно включает суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора. В некоторых аспектах, маркер включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, рецептор NGFR или эпидермального фактора роста, такой как усеченная версия такого рецептора клеточной поверхности (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в опубликованной заявке на патент № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая T2A линкерная последовательность.

Типовой полипептид для усеченного EGFR (например, tEGFR) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. Типовая линкерная последовательность T2A содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6 или 17, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, не встречающийся в природе на Т-клетках или не обнаруживаемый в природе на поверхности Т-клеток, или его часть. В некоторых вариантах осуществления, молекула представляет собой чужеродную молекулу, например

чужеродный белок, т.е. такой, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, в которую клетки будут адоптивно перенесены.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого действия, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для селекции успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой приходится сталкиваться *in vivo*, такую как костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую описанное в настоящем документе антитело или его фрагмент. В некоторых аспектах, химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его фрагмент включает scFv или однодоменное V_H антитело, и внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах, внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета цепи CD3-дзета (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления, цепь CD3-дзета представляет собой цепь CD3-дзета человека. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, CD28 представляет собой CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления, 4-1BB представляет собой 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, *например*, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFv, например, специфичное для CD19, такое как любой из описанных выше, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область и/или одна или несколько константных областей молекулы тяжелой цепи, такой как спейсер, содержащий Ig-шарнир, трансмембранный домен, содержащий весь или

часть трансмембранного домена, происходящего из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, происходящий из CD28, и сигнальный домен CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, *например*, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такую как молекула Ig человека, такая как шарнир Ig, *например* шарнир IgG4, такой как спейсер, состоящий только из шарнира. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело или фрагмент, такой как scFv, *например*, специфичный для CD19, такой как любой из описанных выше, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих Ig-шарнир, трансмембранный домен, происходящий из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, происходящий из 4-1BB, и сигнальный домен CD3 дзета.

В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов, CAR содержит, по порядку от N-конца к C-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO: NO:1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO: 8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO: 12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), представленный в SEQ ID NO: 13.

В. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, клетки, *например* Т-клетки, генетически сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, конструирование осуществляют путем введения полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды.

В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, полученный из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или не нативный сигнальный пептид, такой как типовой сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, представленный в SEQ ID NO: 65, и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 66. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, *например*, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие типовые примеры сигнальных пептидов включают, *например*, сигнальный пептид альфа-цепи

GMCSFR, представленный в SEQ ID NO: 65 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 66, или сигнальный пептид CD8-альфа, представленный в SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит, по меньшей мере, один промотор, функционально связанный с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах, полинуклеотид содержит два, три или несколько промоторов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора.

В некоторых случаях, когда молекулы нуклеиновой кислоты кодируют две или несколько различных полипептидных цепей, *например*, рекомбинантный рецептор и маркер, каждая из полипептидных цепей может кодироваться отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Например, предложены две отдельные нуклеиновые кислоты, каждая из которых может быть индивидуально перенесена или введена в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связаны с одним и тем же промотором и необязательно разделены внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, вызывающий проскок рибосомы, который необязательно представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие маркер, и нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствуют или встроены в разных местах генома клетки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, вводят в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

В некоторых вариантах осуществления, таких как те, где полинуклеотид содержит первую и вторую последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности, кодирующие каждую из различных полипептидных цепей, могут быть функционально связаны с промотором, который может быть одинаковым или разным. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который управляет экспрессией двух или нескольких различных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, *см. например*, патент США № 6,060,273). В некоторых вариантах осуществления, транскрипционные единицы можно сконструировать как бицистронную единицу, содержащую IRES (внутренний участок посадки рибосомы), который обеспечивает коэкспрессию генных продуктов (*например*, кодирование маркера и кодирование рекомбинантного рецептора) с помощью сообщения от одного промотора.

Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор может управлять экспрессией РНК, которая содержит, в одной открытой рамке считывания (ORF), два или три гена (*например*, кодирующие маркер и кодирующие рекомбинантный рецептор), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (*например*, последовательностями 2A) или сайт узнавания протеазой (*например*, фурин). Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который либо во время (в случае 2A), либо после трансляции процессируется в отдельные белки В некоторых случаях, пептид, такой как Т2А, может вызывать проскок рибосомы (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2А, что приводит к разделению между концом последовательности 2А и следующим нижестоящим пептидом (*см.*, например, de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) и de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Известны различные элементы 2А. Примеры последовательностей 2А, которые можно использовать в описанных в настоящем документе способах и системах, без ограничения, последовательностей 2А из вируса ящура (F2А, *например*, SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей А (Е2А, *например*, SEQ ID NO: 20), вирус *Thosea asigna* (Т2А, *например*, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиньи (Р2А, *например*, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в публикации патента США № 20070116690.

Любой из описанных в настоящем документе рекомбинантных рецепторов может кодироваться полинуклеотидами, содержащими одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или расположениях. Например, один, два, три или несколько полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или несколько различных полипептидов, *например*, рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления, один вектор или конструкция содержит маркер, кодирующий последовательность нуклеиновой кислоты, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, *например*, CAR. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, находится ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер.

В некоторых вариантах осуществления, остов вектора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько маркеров. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько маркеров представляют собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер селекции.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для обнаружения клеток, в которые были введены с полинуклеотидом, *например*, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, маркер трансдукции может указывать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный

маркер представляет собой белок, который предназначен для совместной экспрессии на клеточной поверхности с рекомбинантным рецептором, *например*, CAR. В конкретных вариантах осуществления, такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который был модифицирован таким образом, чтобы иметь незначительную или отсутствующую активность. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер кодируется тем же полинуклеотидом, который кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно разделенный внутренним участком посадки рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, такой как последовательность 2A, такая как T2A, P2A, E2A или F2A. Внешние маркерные гены могут, в некоторых случаях, использоваться в связи со сконструированными клетками, чтобы обеспечить обнаружение или селекцию клеток, и в некоторых случаях, также способствовать самоубийству клеток.

Примеры суррогатных маркеров могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые являются не функциональными и не трансдуцируют или не способны трансдуцировать сигнал или сигнал, обычно трансдуцируемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не способны или не способны к интернализации. Примеры усеченных полипептидов клеточной поверхности, включая усеченные формы факторов роста или других рецепторов, таких как усеченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, типовая последовательность tEGFR, представленная в SEQ ID NO: 7 или 16) или простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbix®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, созданных с помощью конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для элиминации или разделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. патент США № 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, *например*, суррогатный маркер, включает весь или часть (*например*, усеченную форму) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, *например*, усеченный CD19 нечеловеческого происхождения или рецептор эпидермального фактора роста (*например*, tEGFR).

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсложенный GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок

(BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT). Примеры светоизлучающих репортерных генов включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, придающий резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам, придающий резистентность к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит ген резистентности к пуромицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к бластицидину, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к генетицину или ген резистентности к зеоцину или их модифицированную форму.

В некоторых вариантах осуществления, молекула представляет собой чужеродную молекулу, например чужеродный белок, т.е. такой, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, в которую клетки будут адоптивно перенесены.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого действия, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для селекции успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой приходится сталкиваться *in vivo*, такой как костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, *например*, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в публикации PCT № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Типовой полипептид для усеченного EGFR (*например*, tEGFR) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную

последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсложенный GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Примеры светоиспускающих репортерных генов включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, придающий резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам, придающий резистентность к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит ген резистентности к пуромицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к бластицидину, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к генетицину или ген резистентности к зеоцину или их модифицированную форму.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, *например*, векторы, полученные из вируса 40 обезьян (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (*см., например*, Koste et al. (2014) *Gene Therapy*, 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp. Hematol.*, 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol. Ther. Nucl. Acids.*, 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.*, 2011 November 29(11): 550-557.

В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет длинную

терминальную повторяющуюся последовательность (LTR), *например*, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза Молони мыши (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) или вирус некроза селезенки (SFFV). Большинство ретровирусных векторов происходят от ретровирусов мыши. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают вирусы, происходящие из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления, экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Был описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (*например*, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109).

Известны способы лентивирусной трансдукции. Типовые способы описаны, *например*, в Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; and Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (*см.*, *например*, Chicaibam et al. (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 and Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (*см.*, *например*, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; and Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию фосфатом кальция (*например*, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с помощью частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, *например*, в публикации международной патентной заявки № WO2014055668 и патенте США № 7,446,190.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, *например*, Т-клетки, могут быть трансфицированы либо во время, либо после размножения, *например*, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желаемого рецептора можно осуществить с помощью любого подходящего ретровирусного вектора, например. Генетически модифицированная клеточная популяция

затем может быть освобождена от начального стимула (например, анти-CD3/анти-CD28 стимула) и впоследствии стимулирована вторым типом стимула, *например*, через введенный *de novo* рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственного (перекрестно-сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (*например*, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в рамках нового рецептора (*например*, путем распознавания константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).*

В некоторых случаях, можно использовать вектор, который не требует активации клеток, *например*, Т-клеток. В некоторых таких случаях, клетки можно отбирать и/или трансдуцировать до активации. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток, и в некоторых случаях, одновременно или во время, по меньшей мере, части культивирования.

Среди дополнительных нуклеиновых кислот, *например*, гены для введения представляют собой гены для повышения эффективности терапии, например, путем стимуляции жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для обеспечения генетического маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делая клетку восприимчивой к отрицательной селекции *in vivo*, как описано Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al., описывающие использование бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных путем слияния доминантного положительного селектируемого маркера с отрицательным селектируемым маркером. См., *например*, Riddell et al., патент США № 6,040,177, столбцы 14-17.

Клетки и подготовка клеток для генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, *т.е.* обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в конструируемой клетке и/или в организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты представляют собой не встречающиеся в природе, такие как, нуклеиновая кислота, не найденная в природе, в том числе содержащая химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества разных типов клеток.

Клетки обычно представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки, происходящие из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного

или адаптивного иммунитета, *например*, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т клетки и/или NK-клетки. Другие типовые клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки обычно представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4⁺-клетки, CD8⁺-клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для способности к дифференциации, экспансии, рециркуляции, локализации и/или жизнестойкости, антигенной специфичности, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркерным или цитокиновым профилем секреции и/или степенью дифференциации. Что касается субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. К числу способов относятся готовые способы. В некоторых аспектах, таких как готовые технологии, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток у субъекта, их подготовку, обработку, культивирование и/или конструирование и повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток есть наивные Т -клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, мукозные инвариантные Т-клетки (MAIT), встречающиеся в природе и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, *например*, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, *т.е.* обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который,

например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или в организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты имеют неприродное происхождение, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе, в том числе содержит химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества разных типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления, подготовка сконструированных клеток включает одну или несколько стадий культивирования и/или получения. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, *например*, полученный или производный от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект, от которого выделяют клетку, является субъектом, страдающим заболеванием или состоянием, или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будет назначена клеточная терапия. Субъектом в некоторых вариантах осуществления, является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют.

Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления, являются первичными клетками, *например*, первичными клетками человека. Образцы включают образцы тканей, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одной или нескольких стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (*например*, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубация. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, прошедшим обработку. Биологические образцы включают, но не ограничены ими, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая полученные из них обработанные образцы.

В некоторых аспектах, образец, из которого получают или выделяют клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или представляет собой или получен из продукта афереза или лейкофереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, кишечную лимфоидную ткань, мукозальную лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган и/или полученные из них клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, *например*, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления, клетки происходят из клеточных линий, *например*, T-клеточных линий. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, получены из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата, отличного от человека,

и свиньи.

В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток включает одну или несколько стадий подготовки и/или разделения клеток на не аффинной основе. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к определенным компонентам.

В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, *например*, путем афереза или лейкоафереза. Образцы, в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, *например*, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствует кальций, и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют в полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, процессоре клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют путем фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, после промывания клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий Ca^{++}/Mg^{++} . В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте Перколла или Фиколла.

В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, *например*, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение в некоторых аспектах, включает разделение клеток и клеточных популяций на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно

маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с таким маркером, за которой обычно следуют стадии промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связавшиеся с реагентами, сохраняются для дальнейшего использования, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняются клетки, не связавшиеся с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняются для дальнейшего использования. В некоторых аспектах, отрицательная селекция может быть особенно полезной, когда нет доступных антител, которые специфически идентифицируют тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогичным образом, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно отобранная фракция с одной стадии подвергается другой стадии разделения, такой как последующая положительная или отрицательная селекция. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощать клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждое из которых специфично для маркера, предназначенного для отрицательной селекции. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах, конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, *например*, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют методами положительной или отрицательной селекции.

Например, CD3⁺, CD28⁺ Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием анти-CD3/анти-CD28-конъюгированных магнитных микроносителей (*например*, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления, выделение осуществляется путем обогащения конкретной клеточной популяции путем положительной селекции или истощения конкретной клеточной популяции путем отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления, положительная или отрицательная селекция осуществляется путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно селектированных клетках, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки выделяют из образца РВМС путем отрицательной селекции маркеров, экспрессированных на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадия селекции CD4⁺ или CD8⁺ используется для разделения CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ могут быть дополнительно отсортированы на субпопуляции с помощью положительной или отрицательной селекции по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени на одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD8⁺ клетки дополнительно обогащены или истощены наивными, центральными памяти, эффекторными памяти и/или стволовыми клетками центральной памяти, например, путем положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{CM}) проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долговременной выживаемости, размножения и/или приживления трансплантата после введения, что, в некоторых аспектах, является особенно устойчивым в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) Blood, 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, сочетание Т_{CM}-обогащенных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L⁺, так и в CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. РВМС могут быть обогащены или обеднены фракциями CD62L⁻CD8⁺ и /или CD62L⁺CD8⁺, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательной селекции клеток, экспрессирующих или высокоэкспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение популяции CD8⁺, обогащенной Т_{CM} клетками, осуществляют путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14,

CD45RA, и положительным отбором или обогащением клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте, обогащение центральными Т-клетками памяти (T_{CM}) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, селективированных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительной селекции на основе на CD62L. Такие селекции, в некоторых аспектах, осуществляют одновременно, и в других аспектах, осуществляют последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах, ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую при получении популяции или субпопуляции $CD8^+$ клеток, также используется для создания популяции или субпопуляции $CD4^+$ клеток, так что как положительные, так и отрицательные фракции из разделения на основе CD4, сохраняются и используются на последующих стадиях способов, необязательно, после одной или нескольких дополнительных стадий положительной или отрицательной селекции.

В конкретном примере, образец РВМС или другого образца лейкоцитов подвергают селекции $CD4^+$ клеток, при этом сохраняют как отрицательные, так и положительные фракции. Отрицательная фракция затем подвергается отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19 и положительной селекции на основе маркера, характерного для Т-клеток центральной памяти, таких как CD62L или CCR7, где положительная и отрицательная селекция осуществляются в любом порядке.

$CD4^+$ Т-хелперные клетки сортируются на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. $CD4^+$ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления, наивные $CD4^+$ Т-лимфоциты представляют собой $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, $CD4^+$ клетки центральной памяти представляют собой $CD62L^+$ и $CD45RO^+$. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки $CD4^+$ представляют собой $CD62L^-$ и $CD45RO^-$.

В одном примере, для обогащения $CD4^+$ клеток путем отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитный микроноситель или парамагнитный микроноситель, чтобы обеспечить разделение клеток для положительной и/или отрицательной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием методов иммуномагнитного (или аффинно-магнитного) разделения (рассмотрено в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах, образец или композицию клеток, подлежащих отделению, инкубируют с небольшим, намагничиваемым или магниточувствительным материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные

микроносители (*например*, такие как микроносители Dynabeads или MACS). Магниточувствительный материал, *например* частица, обычно прямо или косвенно присоединен к партнеру по связыванию, *например*, антителу, которое специфически связывается с молекулой, *например* поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или клеточной популяции, которые желателно разделить, *например*, которые желателно отрицательно или положительно селективировать.

В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или микроноситель содержат магниточувствительный материал, связанный со специфическим связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует много хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в способах магнитной сепарации. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патент США № 4,452,773 и в описании европейского патента EP 452342 B, которые настоящим включены посредством ссылки. Частицы коллоидного размера, такие как описанные в Owen, патент США № 4,795,698, и Liberti et al., патент США № 5,200,084, являются другими примерами.

Инкубацию обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые присоединены к магнитной частице или микроносителю, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле, и те клетки, к которым присоединены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. При положительной селекции, сохраняются клетки, притянутые к магниту; при отрицательной селекции сохраняются клетки, которые не притянуты (не меченые клетки). В некоторых аспектах, комбинация положительной и отрицательной селекции выполняется на одной и той же стадии селекции, при этом положительные и отрицательные фракции сохраняются и подвергаются дальнейшей обработке или подвергаются дополнительным стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы прикрепляются к клеткам посредством покрытия первичных антител, специфичных к одному или нескольким маркерам. В некоторых вариантах осуществления, клетки, а не микроносители, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным для типа клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (*например*, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы, покрытые стрептавидином, используются в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии подлежат инкубации, культивированию и/или конструированию; в некоторых аспектах, частицы оставляют прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, из клеток удаляют намагничиваемые или магниточувствительные частицы. Способы удаления из клеток намагничиваемых частиц известны и включают, *например*, использование конкурирующих не меченых антител и намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, селекция на основе аффинности осуществляется посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) способны к высокочистой селекции клеток с прикрепленными к ним намагниченными частицами. В некоторых вариантах осуществления, MACS работает в режиме, при котором частицы-мишени и не мишени последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные частицы элюируются. Затем, после того как эта первая стадия элюирования завершена, вещества, которые были захвачены магнитным полем и которым не позволили элюироваться, высвобождаются каким-либо образом, чтобы их можно было элюировать и восстанавливать. В некоторых вариантах осуществления, клетки, не являющиеся мишенями, помечены и удалены из гетерогенной клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение осуществляется с использованием системы, устройства или аппарата, который выполняет одну или несколько стадий выделения, подготовки клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления способов. В некоторых аспектах, система используется для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для сведения к минимуму ошибок, действий пользователя и/или загрязнения. В одном примере, система представляет собой систему, описанную в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003, или US 20110003380 A1.

В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат выполняет одну или несколько, *например* все, стадий выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или аппаратом, что позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического

разделения клеток на клиническом уровне в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер, в некоторых аспектах, управляет всеми компонентами инструмента и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитной сепарации, в некоторых аспектах, включает в себя подвижный постоянный магнит и держатель для селекционной колонки. Перистальтический насос регулирует скорость потока по всему набору трубок и вместе с пережимными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывную суспензию клеток.

Система CliniMACS, в некоторых аспектах, использует намагничиваемые частицы, связанные с антителами, которые поставляются в стерильном, апиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами, клетки промывают для удаления избыточных частиц. Пакет для подготовки клеток затем соединяется с набором трубок, который, в свою очередь, соединяется с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки остаются в колонке, а не меченые удаляются с помощью серии промывок. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования в способах, описанных в настоящем документе, являются не мечеными и не сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования с описанными в настоящем документе способами, являются мечеными и сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования с описанными в настоящем документе способами элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах, оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток путем распознавания макроскопических слоев исходного клеточного продукта. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на эритроциты, лейкоциты и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, *например*, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигеном и длительное культивирование клеток. Входные порты могут

обеспечить стерильное удаление и пополнение среды, и клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, и Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) с помощью проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные на множественные маркеры клеточной поверхности, переносят в потоке жидкости. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) посредством сортировки в препаративном масштабе (сортировка флуоресцентно-активированных клеток, FACS). В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. В обоих случаях, клетки могут быть помечены множественными маркерами, что позволяет выделить хорошо определенных субпопуляций Т-клеток высокой чистоты.

В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию помечены одним или несколькими определяемыми маркерами для облегчения разделения для положительной и/или отрицательной селекции. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах, разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, осуществляют в потоке жидкости, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и /или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с проточной цитометрической системой обнаружения. Такие способы позволяют проводить положительную и отрицательную селекцию одновременно на основе нескольких маркеров.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации клеток до или после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления, стадия замораживания и последующего размораживания удаляет гранулоциты и, до некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах, можно использовать любой из множества известных растворов и параметров замораживания. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% альбумина сыворотки человека (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем его разводят средой 1:1, так что конечная концентрация ДМСО и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки

обычно замораживают до -80°C со скоростью 1°C в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культуру, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в сосуде для культивирования, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, пакет или другой контейнер для культуры или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для подготовки клеток к генной инженерии, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать одну или несколько конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание диоксида углерода, время, агенты, *например*, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или агенты включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен активировать или стимулировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах, агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, такие как антитела, специфичные для TCR, например, анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например, анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как микроноситель, и/или с одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления анти-CD3 и/или анти-CD28 антитела в культуральную среду (например, в концентрации, по меньшей мере, примерно $0,5$ нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие агенты включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет, по меньшей мере, примерно 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах, инкубацию проводят в соответствии с методами, такими как описаны в патенте США № 6,040,177 Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножаются путем добавления к иницирующей культивирование композиции питающих клеток, таких как неделящиеся

моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), (*например*, так, чтобы полученная популяция клеток содержала, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или больше питающих клеток РВМС на каждый Т-лимфоцит в входной популяции, подлежащей размножению); и инкубации культуры (*например*, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся питающие клетки могут содержать питающие клетки РВМС, облученные гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления, РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне примерно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, примерно 30 градусов Цельсия и обычно, точно или примерно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне примерно от 6000 до 10000 рад. Питающие клетки LCL, в некоторых аспектах, представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, примерно 10:1.

В вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают стимулированием наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов антигеном. Например, антигенспецифические Т-клеточные линии или клоны могут быть созданы для антигенов цитомегаловируса путем выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимулирования клеток *in vitro* тем же антигеном.

С. Способы производства сконструированных клеток

В конкретных вариантах осуществления, сконструированные клетки получают с помощью процесса, который создает выходную композицию обогащенных Т-клеток из одной или нескольких входных композиций и/или из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, выходная композиция содержит клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR, такой как анти-CD19 CAR. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходных композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии, например терапии аутологичными клетками. В некоторых вариантах осуществления, выходная композиция представляет собой композицию обогащенных CD3⁺ Т-клеток или обогащенных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Т-клетки конструируют способами, которые включают введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, например анти-CD19 CAR, в клетки в условиях, при которых нуклеиновая кислота интегрируется в геном клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы конструирования включают трансдукцию вирусными векторами,

такими как лентивирусные векторы. В конкретных вариантах осуществления, Т-клетки активируют или стимулируют путем контакта клеток с олигомерным реагентом, например, олигомером мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, клетки конструируют с помощью процесса, который завершается в течение 96 часов или меньше, путем стимуляции клеток олигомерным реагентом, например, олигомером мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы не включают стадию расширения или увеличения количества клеток в ходе процесса. Примеры способов изготовления и сконструированных клеток, полученных такими способами, описаны в документе PCT/US2019/046062, который полностью включен посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления, предложенные способы используются в связи со всем процессом создания или продуцирования выходных клеток и/или выходных популяций сконструированных Т-клеток, таким как процесс, включающий некоторые или все стадии: стимуляции клеток из входной популяции; конструирования, трансформации, трансдукции или трансфекции стимулированных клеток для экспрессии или содержания гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; инкубирования клеток, удаления или отделения стимулирующего реагента от клеток, сбора и получения клеток, что в некоторых аспектах, приводит к созданию выходной популяции сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы используются в связи со всем процессом создания или получения выходных клеток и/или выходных композиций обогащенных Т-клеток, таким как процесс, включающий некоторые или все стадии: сбора или получения биологического образца; выделения, селекции или обогащения вводимых клеток из биологического образца; криоаморазивания и хранения, с последующим размораживанием исходных клеток; стимулирования клеток; генной инженерии стимулированных клеток для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; формирования сконструированных клеток в выходной композиции; и криоаморазивания и хранения полученных клеток до тех пор, пока клетки не будут высвобождены для инфузии и/или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы не включают стадию размножения или увеличения количества клеток в ходе процесса, например, путем культивирования клеток в биореакторе в условиях, при которых клетки размножаются, например, до порогового количества, которое в, по меньшей мере, 3, 4, 5 или больше раз превышает количество, уровень или концентрацию клеток по сравнению с исходной популяцией. В некоторых вариантах осуществления, генная инженерия клеток представляет собой или включает стадии трансдукции клеток вирусным вектором, например, путем центрифужной инокуляции клеток в присутствии вирусных частиц и затем инкубации клеток в статических условиях в присутствии вирусных частиц.

В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность предлагаемого процесса получения сконструированных клеток от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет меньше 36 часов, 42 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часов, 96 часов, 108 часов или 120 часов. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность предлагаемого процесса создания сконструированных клеток от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет меньше 1,5 дней, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность предлагаемого процесса создания сконструированных клеток от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток, составляет от или от примерно 36 часов до 120 часов, от 48 часов до 96 часов или от 48 до 72 часов, включительно, или от или от примерно 1,5 дней до 5 дней, от 2 дней до 4 дней или от 2 дней до 3 дней, включительно. В конкретных вариантах осуществления, количество времени для завершения предложенного процесса, измеренное от начала инкубации до сбора, получения или составления клеток, составляет, составляет примерно или составляет меньше 48 часов, 72 часов или 96 часов, или составляет, составляет примерно или составляет меньше 2 дней, 3 дней или 4 дней. В конкретных вариантах осуществления, количество времени для завершения предложенного процесса, измеренное от начала инкубации до сбора, получения или составления клеток, составляет 48 часов \pm 6 часов, 72 часа \pm 6 часов или 96 часов \pm 6 часов.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация, например, как описано в Разделе II-C-5, завершается между или между примерно 24 часами и 120 часами, 36 часами и 108 часами, 48 часами и 96 часами или 48 часами и 72 часами, включительно, после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается через, примерно или в течение 120 часов, 108 часов, 96 часов, 72 часов, 48 часов или 36 часов после начала стимуляции или в течение этого времени. В конкретных вариантах осуществления, инкубация завершается через 24 часа \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часа \pm 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается между или между примерно одним днем и 5 днями, 1,5 днями и 4,5 днями, 2 днями и 4 днями или 2 днями и 3 днями, включительно, после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается через, примерно или в течение 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1,5 дней после начала стимуляции.

В некоторых вариантах осуществления, весь процесс проводят с одной популяцией обогащенных Т-клеток, например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, процесс осуществляется с двумя или несколькими входными популяциями обогащенных Т-клеток (например, CD4 и CD8 клеток), которые объединяются до и/или во время процесса для создания или продуцирования одной выходной популяции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные Т-клетки представляют собой или включают сконструированные Т-клетки, например, Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция, например, популяция сконструированных Т-клеток, создается путем (i) инкубации входной популяции или содержащих Т-клеток в стимулирующих условиях в течение от или примерно от 18 до 30 часов, включительно, (ii) введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки стимулируемой популяции, (iii) инкубации клеток, и затем (iv) сбора инкубированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают в течение от 36 до 108 часов или от 1,5 до 4,5 дней после начала инкубации в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают в течение 48 часов или двух дней после того, как трансформированные (например, генетически сконструированные, трансдуцированные или трансфицированные) Т-клетки достигают стабильного интегрированного числа копий вектора (iVCN) на геном, которое не увеличивается или уменьшается больше чем на 20% в течение 24-48 часов или одного-двух дней. В некоторых вариантах осуществления, интеграция считается стабильной, когда измеренный iVCN клеточной популяции находится в пределах или в пределах примерно 20%, 15%, 10% или 5% от общего числа копий вектора (VCN), измеренного в популяции. Конкретные варианты осуществления предполагают, что для достижения стабильной интеграции клетки необходимо инкубировать в течение, в течение примерно или в течение, по меньшей мере, 48 часов, 60 часов или 72 часов, или одного дня, 2 дней или 3 дней после того, как вирусный вектор контактирует или вводится в клетки. В некоторых вариантах осуществления, стабильная интеграция происходит в течение или примерно через 72 часа после инкубации. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают в то время, когда общее количество трансформированных Т-клеток равно или меньше общего количества клеток входной популяции. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или получают за время до того, как клетки входной популяции удвоятся больше чем в три, два или один раз. Примеры способов и композиций для анализов VCN и iVCN описаны в PCT/US 2019/046048, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления выходная популяция, например, популяция сконструированных Т-клеток, создается путем (i) инкубации входной популяции, содержащей Т-клетки, в стимулирующих условиях в течение от 18 до 30 часов, включительно, в присутствии стимулирующего реагента, например, стимулирующего реагента, описанного в настоящем документе, например, в Разделе II-C-2, (ii) трансдукции стимулированных Т-клеток с вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, путем центрифужной инокуляции стимулированных Т-клеток в присутствии вирусного вектора, (iii) инкубации трансдуцированных Т-клеток в статических условиях в течение от 18 часов до 96 часов, включительно и (iv) сбора Т-клеток трансформированной популяции в течение от 36 до 108 часов после инициации инкубации в стимулирующих условиях.

В некоторых вариантах осуществления, процесс, связанный с предложенными

способами, сравнивают с альтернативным процессом. Например, в некоторых вариантах осуществления, предложенные в настоящем документе способы сравнивают с альтернативным процессом, который включает стадию размножения клеток. В конкретных вариантах осуществления, альтернативный способ может отличаться одним или несколькими конкретными аспектами, но в остальном содержит сходные или одинаковые признаки, аспекты, шаги, стадии, реагенты и/или условия процесса, связанного с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, альтернативный процесс аналогичен процессу, связанному с предложенными способами, например, не содержит или не включает размножение, но отличается тем, что включает, но не ограничен ими, одно или несколько из; различных составов реагентов и/или сред; присутствия сыворотки во время инкубации, трансдукции, трансфекции и/или инкубации сконструированных клеток; разного клеточного состава входной популяции, например соотношения CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток; различных условий стимуляции и/или различных стимулирующих реагентов; различного отношения стимулирующего реагента к клеткам; различного вектора и/или способа трансдукции; различных сроков или порядка инкубации, трансдукции и/или трансфекции клеток; отсутствия или различия одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, присутствующих во время инкубации или трансдукции (например, разных цитокинов или разных концентраций), или разных сроков сбора или получения клеток.

В некоторых вариантах осуществления, продолжительность или количество времени, необходимое для завершения предложенного процесса, измеряемое от выделения, обогащения и/или селекции входных клеток (например, CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток) из биологического образца до времени, когда выходные клетки собирают, составляют и/или подвергают криозащите, составляет, составляет примерно или составляет меньше 48 часов, 72 часов, 96 часов, 120 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 7 дней или 10 дней. В некоторых вариантах осуществления, выделенные, селектированные или обогащенные клетки не подвергают криозащите перед стимуляцией, а продолжительность или количество времени, необходимое для завершения предложенного процесса, измеряемое от выделения, обогащения и/или селекции входных клеток (до времени, в которое выходные клетки собирают, составляют и/или подвергают криозащите, составляет, составляет примерно или составляет меньше 48 часов, 72 часов, 96 часов или 120 часов, или 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные процессы осуществляются на клеточной популяции, например CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, которые были выделены, обогащены или селектированы из биологического образца. В некоторых аспектах, предложенные способы могут продуцировать или создавать композицию сконструированных Т-клеток при взятии биологического образца у субъекта в течение более короткого периода времени по сравнению с другими способами или процессами. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы могут продуцировать или создавать сконструированные Т-клетки, включая любое или все время, когда

биологические образцы или обогащенные, выделенные или селектированные клетки криоконсервируют и хранят до стадий стимуляции или трансдукции, в течение или в течение примерно 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или в течение или в течение примерно 120 часов, 96 часов, 72 часов или 48 часов с момента взятия биологического образца от субъекта до момента, когда сконструированные Т-клетки собирают, получают или составляют (например, для криоконсервации или введения). В конкретных вариантах осуществления, предложенные способы могут продуцировать или создавать сконструированные Т-клетки, включая любое или все время, когда биологические образцы или обогащенные, выделенные или селектированные клетки криоконсервируются и хранятся до стадий стимуляции или трансдукции, в пределах между или между примерно 6 днями и 8 днями, включительно, с момента сбора биологического образца у субъекта до момента сбора, получения или составления сконструированных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы используются в связи со способом создания или получения выходных клеток и/или выходных популяций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, выходные клетки и/или выходные популяции обогащенных Т-клеток представляют собой или включают клетки, которые были собраны, получены, выделены, селектированы и/или обогащены из биологического образца, такого как образец крови или образец лейкофереза; инкубированы в стимулирующих условиях; сконструированы, например, трансдуцированы, для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; инкубированы до порогового количества или плотности клеток; и/или составлены. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция была предварительно криозащищена и разморожена, например, во время, до и/или после одной или нескольких стадий процесса. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция содержит Т-клетки, например, CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 30%, 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% или по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% клеток выходной популяции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 30%, 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% CD3⁺ Т-клеток в выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах

осуществления, по меньшей мере, 50% CD3+ Т-клеток в выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, по меньшей мере, 30%, 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%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или больше 99% CD4+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% CD4+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, по меньшей мере, 30%, 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%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 99% или больше 99% CD8+ Т-клеток выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% CD8+ Т-клеток в выходной композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор.

В конкретных вариантах осуществления, клетки выходной композиции обладают улучшенной цитолитической активностью в отношении клеток, экспрессирующих антиген, связанный и/или распознаваемый рекомбинантным рецептором (например, клеток-мишеней), по сравнению с выходными клетками, полученными альтернативным процессом, например, процессом, который включает одну или несколько стадий размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки выходной композиции подвергают воздействию клеток, экспрессирующих антиген, например, клеток-мишеней, клетки выходной композиции убивают, убивают примерно или убивают, по меньшей мере, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% клеток, экспрессирующих антиген. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции убивают, по меньшей мере, 25%, 50%, 75%, 100%, 150% или в 1, 2, 3, 4 или 5 раз больше количество клеток, которые экспрессируют антиген, например клеток-мишеней, по сравнению с выходными клетками, полученными альтернативным способом в подобных или таких же условиях.

В конкретных вариантах осуществления, клетки входной популяции обладают улучшенной противоопухолевой активностью *in vivo* по сравнению с исходными клетками, полученными альтернативным процессом, например, процессом, который включает одну или несколько стадий размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки выходной композиции вводят субъекту, например, субъекту, имеющему опухоль или рак, клетки выходной популяции убивают, убивают примерно или убивают, по меньшей мере, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% опухолевых клеток, например раковых или опухолевых клеток, экспрессирующие антиген, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, клетки

выходной композиции убивают, по меньшей мере, 25%, 50%, 75%, 100%, 150% или в 1, 2, 3, 4 или 5 раз больше опухолевых клеток *in vivo*, чем выходные клетки, продуцированные альтернативным способом в аналогичных или таких же условиях.

В конкретных вариантах осуществления, большинство клеток выходной популяции представляют собой наивные клетки, центральной памяти и/или клетки эффекторной памяти. В конкретных вариантах осуществления, большинство клеток выходной популяции являются наивными или клетками центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, большинство клеток выходной популяции являются положительными в отношении одной или нескольких экспрессий CCR7 или CD27. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют большую часть клеток, подобных наивным или центральной памяти, которые являются выходными популяциями, созданными в результате альтернативных процессов, таких как процессы, включающие размножение.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются истощенными и/или стареющими. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются истощенными и/или стареющими. В некоторых вариантах осуществления, меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5% или меньше 1% клеток выходной популяции являются истощенными и/или стареющими. В некоторых вариантах осуществления, меньше 25% клеток выходной популяции являются истощенными и/или стареющими. В некоторых вариантах осуществления, меньше 10% клеток выходной популяции являются истощенными и/или стареющими. В конкретных вариантах осуществления, клетки имеют низкую долю

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются отрицательными по экспрессии CD27 и CCR7, например, поверхностной экспрессии. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту CD27-CCR7 клеток. В некоторых вариантах осуществления, меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5% или меньше 1% клеток выходной популяции представляют собой CD27-CCR7 клетки. В некоторых вариантах осуществления, меньше 25% клеток выходной популяции представляют собой CD27-CCR7 клетки. В некоторых вариантах осуществления, меньше 10% клеток выходной популяции представляют собой CD27-CCR7 клетки. В вариантах осуществления, меньше 5% клеток выходной популяции представляют собой CD27-CCR7 клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по экспрессии одного или обоих CD27 и CCR7, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют высокую долю и/или

частоту клеток, положительных по одному или обоим CD27 и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или больше 95% клеток выходной популяции положительны по одному или обоим CD27 и CCR7. В различных вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или больше 95% CD4+ CAR+ клеток выходной популяции положительны по одному или обоим CD27 и CCR7. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или больше 95% CD8+ CAR+ клеток выходной популяции положительны по одному или обоим CD27 и CCR7.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по экспрессии CD27 и CCR7, например поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют высокую долю и/или частоту CD27+ CCR7+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или больше 95% клеток выходной популяции представляют собой CD27+ CCR7+ клетки. В различных вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или больше 95% CD4+CAR+ клеток выходной популяции представляют собой CD27+ CCR7+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или больше 95% CD8+CAR+ клеток выходной популяции представляют собой CD27+ CCR7+ клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту клеток, отрицательных по CCR7 и положительных по CD45RA экспрессии, например поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной популяции имеют низкую долю и/или частоту клеток CCR7-CD45RA+. В конкретных вариантах осуществления, меньше 40%, меньше 35%, меньше 30%, меньше 25%, меньше 20%, меньше 15%, меньше 10%, меньше 5% или меньше 1% клеток выходной популяции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+. В некоторых вариантах осуществления, меньше 25% клеток выходной популяции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+. В конкретных вариантах осуществления, меньше 10% клеток выходной популяции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+. В некоторых вариантах осуществления, меньше 5% клеток выходной популяции

представляют собой клетки CCR7-CD45RA+.

В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают до, до примерно или до, по меньшей мере, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или больше удвоений клеточной популяции, например, удвоений которые возникают во время инкубации. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают до любого удвоения популяции, например удвоения, которое происходит во время инкубации. В некоторых аспектах, уменьшение удвоения, которое может происходить во время процесса конструирования, в некоторых вариантах осуществления, будет увеличивать долю сконструированных Т-клеток, которые являются подобными наивным. В некоторых вариантах осуществления, увеличение удвоения во время процесса конструирования увеличивает дифференциацию Т-клеток, которая может происходить во время процесса конструирования.

В некоторых аспектах, предполагается, что для процесса создания или продуцирования сконструированных клеточных композиций, уменьшение размножения или удвоения клеток, происходящее во время процесса, например, во время инкубации, увеличивает количество или долю Т-клеток, подобных наивным, в полученной сконструированной клеточной композиции. В конкретных аспектах, увеличение размножения или удвоения клеток, происходящее во время процесса, увеличивает количество или долю дифференцированных Т-клеток в полученной сконструированной клеточной композиции. В некоторых аспектах, предполагается, что процесс, такой как способы, предложенные в настоящем документе, который повышает или увеличивает долю подобных наивным клеток в полученной сконструированной клеточной композиции, может повышать активность, эффективность и стойкость, например, *in vivo*, после введения сконструированной клеточной композиции.

1. Клетки и подготовка клеток для генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как Т-клетки, используемые в связи с предложенными способами, применениями, готовыми изделиями или композициями, представляют собой клетки, которые были генетически сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки используют в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, такие как CD4+ или CD8+ Т-клетки.

В конкретных вариантах осуществления, предлагаемые способы используются в связи с выделением, селекцией или обогащением клеток из биологического образца для создания одной или нескольких входных популяций обогащенных клеток, например, Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают выделение клеток или их популяций из биологических образцов, таких как образцы, полученные или производные от субъекта, такого как субъект, страдающий определенным

заболеванием или состоянием, или нуждающийся в клеточной терапии, или которому клеточная терапия будет вводиться. В некоторых аспектах, субъект представляет собой человека, например, субъекта, который является пациентом, нуждающимся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой выделяют, обрабатывают и/или конструируют клетки. Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления, являются первичными клетками, например, первичными клетками человека. Образцы включают ткани, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, прошедшим обработку. Биологические образцы включают, но не ограничены ими, жидкости тела, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая полученные из них обработанные образцы.

В некоторых аспектах, образец представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или получен из продукта афереза или лейкофереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником, лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган и/или полученные из них клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкофереза. Образцы в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствует кальций, и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют в полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, процессоре клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют путем фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, после промывания клетки ресуспендируют в различных биосовместимых

буферах, таких как, например, PBS, не содержащий $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки (например, продукт афереза или продукт лейкофереза), промывают для удаления одного или нескольких антикоагулянтов, таких как гепарин, добавленных во время афереза или лейкофереза.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки (например, образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза, или продукт лейкофереза) криоконсервируют и/или криозащищают (например, замораживают), и затем размораживают и, необязательно, промывают перед любыми стадиями выделения, селекции, активации, стимуляции, конструирования, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, составления клеточной популяции и/или введения субъекту составленной клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий аутологичные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) субъекта, собирают способом, подходящим для обеспечения надлежащего качества для производства. В одном аспекте, образец, содержащий PBMC, получают из фракционированной цельной крови. В некоторых вариантах осуществления, цельную кровь субъекта фракционируют с помощью лейкофереза с использованием центробежной силы и с использованием различий в плотности между клеточными фенотипами, когда аутологичные мононуклеарные клетки (MNC) предпочтительно обогащены, в то время как другие клеточные фенотипы, такие как эритроциты, уменьшаются в собранной клеточной композиции. В некоторых вариантах осуществления, аутологичную плазму одновременно собирают во время сбора MNC, что, в некоторых аспектах, может обеспечить пролонгированную стабильность продукта лейкофереза. В одном аспекте, аутологичная плазма добавляется к продукту лейкофереза для улучшения буферной способности матрицы продукта лейкофереза. В некоторых аспектах, общий объем цельной крови, обрабатываемой для получения продукта лейкофереза, составляет или составляет примерно 2 л, 4 л, 6 л, 8 л, 10 л, 12 л, 14 л, 16 л, 18 л или 20 л, или представляет собой любое значение между любыми из вышеизложенных. В некоторых вариантах осуществления, объем собранной аутологичной плазмы составляет или составляет примерно 10 мл, 50 мл, 100 мл, 150 мл, 200 мл, 250 мл или 300 мл или больше или представляет собой объем между любыми из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкофереза подвергают процедуре, например промывке и составлению для криоконсервации в процессе, в течение примерно 48 часов после завершения сбора лейкофереза. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкофереза подвергают одной или нескольким стадиям промывки, например, в течение

примерно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов после завершения сбора лейкофереза. В некоторых аспектах, одна или несколько стадий промывки удаляют антикоагулянт во время сбора лейкофереза, клеточные отходы, которые могли накопиться в продукте лейкофереза, остаточные тромбоциты и/или клеточный дебрис. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько замен буфера выполняют во время одной или нескольких стадий промывки.

В конкретных вариантах осуществления, продукт афереза или продукт лейкофереза подвергают криоконсервации и/или криозащите (например, замораживанию), и затем размораживают перед тем, как подвергнуть стадии селекции или выделения клеток (например, стадии селекции или выделения Т-клеток), как описано *ниже*. В некоторых вариантах осуществления после того, как криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкофереза подвергается стадии селекции или выделения Т-клеток, во время или между любой из последующих стадий, таких как стадии активации, стимуляции, конструирования, трансдукции, трансфекции, инкубации, культивирования, сбора, составления клеточной популяции и/или введения составленной клеточной популяции субъекту. Например, Т-клетки, выбранные из размороженного криоконсервированного и/или криозащищенного продукта афереза или продукта лейкофереза, не подвергают повторной криоконсервации и/или криозащите перед размораживанием и, необязательно, промыванием для последующего процесса, такого как активация/стимуляция или трансдукция Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления, продукт афереза или продукт лейкофереза подвергается криоконсервации и/или криозащите (например, замораживанию) при плотности точно, примерно или, по меньшей мере, 5×10^6 клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл, 20×10^6 клеток/мл, 30×10^6 клеток/мл, 40×10^6 клеток/мл, 50×10^6 клеток/мл, 60×10^6 клеток/мл, 70×10^6 клеток/мл, 80×10^6 клеток/мл, 90×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, 110×10^6 клеток/мл, 120×10^6 клеток/мл, 130×10^6 клеток/мл, 140×10^6 клеток/мл или 150×10^6 клеток/мл, или любом значении между любыми из вышеперечисленных, в криоконсервирующем растворе или буфере. В некоторых вариантах осуществления, раствор или буфер для криоконсервации представляет собой или содержит, например, раствор ДМСО, необязательно содержащий сывороточный альбумин человека (HSA) или другую подходящую среду для замораживания клеток.

В конкретных вариантах осуществления, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкофереза банкируют (например, без селекции Т-клеток перед замораживанием образца), что в некоторых аспектах, может обеспечить большую гибкость для последующих стадий производства. В некоторых аспектах, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкофереза аликвотируют в несколько контейнеров для криоконсервации, таких как пакеты, каждый из которых по отдельности или в комбинации может использоваться при обработке продукта. Например, когда общее количество жизнеспособных клеток в продукте афереза или продукте лейкофереза составляет меньше 15×10^9 клеток,

криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкофереза аликвотируют в четыре контейнера для криоконсервации, таких как пакеты. В некоторых вариантах осуществления, когда общее количество жизнеспособных клеток в продукте афереза или продукте лейкофереза составляет $15-30 \times 10^9$ клеток, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкофереза аликвотируют в восемь контейнеров для криоконсервации, таких как пакеты.

В одном аспекте, банкирование клеток перед селекцией увеличивает выход клеток для последующего процесса, и банкированные клетки раньше могут означать, что они более здоровы и могут легче соответствовать критериям успеха производства. В другом аспекте, после оттаивания, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкофереза может подвергаться одному или нескольким различным способам селекции. Преимущества этого подхода заключаются, среди прочего, в повышении доступности, эффективности и/или других аспектов клеток клеточной терапии для лечения заболевания или состояния субъекта, например, у донора образца и/или другого получателя.

В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительной селекции клеток (например, без предварительной селекции Т-клеток, такой как селекция с помощью хроматографии), через некоторое время после того, как у донора диагностируют заболевание или состояние. В некоторых аспектах, время криоконсервации также наступает до того, как донор получил одно или несколько из следующих: любое начальное лечение заболевания или состояния, любое таргетное лечение или любое лечение, предназначенное для лечения заболевания или состояния, или любое другое лечение, отличное от лучевой и/или химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления, образец собирают после первого рецидива заболевания после первоначального лечения заболевания и до того, как донор или субъект получит последующее лечение заболевания. Первоначальное и/или последующее лечение может быть терапией, отличной от клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки можно использовать в клеточной терапии после первоначального и/или последующего лечения. В одном аспекте, криоконсервированный и/или криозащищенный образец без предварительной селекции клеток может помочь снизить первоначальные затраты, например, те, которые связаны с пациентами, не получающими лечения, в рандомизированном клиническом испытании, которые могут перейти и потребовать лечения позже.

В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительной селекции клеток (например, без предварительной селекции Т-клеток, такой как селекция с помощью хроматографии), в момент времени после второго рецидива заболевания после второй линии лечения заболевания и до того, как донор или субъект получит последующее лечение заболевания. В некоторых вариантах

осуществления, пациенты идентифицируются как пациенты с вероятностью рецидива после второй линии лечения, например, путем оценки определенных факторов риска. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска основаны на типе заболевания и/или генетике, таких как лимфома с двумя транслокациями, первичный не поддающийся лечению рак или активированная В-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления, факторы риска основаны на клинических проявлениях, таких как ранний рецидив после лечения первой линии или другие неблагоприятные прогностические показатели после лечения (например, IPI (Международный прогностический индекс) >2).

В некоторых вариантах осуществления, образец (например, образец афереза или лейкофереза) собирают и подвергают криоконсервации и/или криозащите до или без предварительной селекции клеток (например, без предварительной селекции Т-клеток, такой как селекция с помощью хроматографии), во время до того, как у донора или у субъекта диагностировано заболевание. В некоторых аспектах, можно определить, что донор или субъект подвержен риску развития заболевания. В некоторых аспектах, донор или субъект может быть здоровым субъектом. В некоторых случаях, донор или субъект может выбрать банк или хранить клетки, не подвергаясь риску развития заболевания или без диагностирования заболевания в случае, если клеточная терапия потребуется на более позднем этапе жизни. В некоторых вариантах осуществления, донор или субъект может считаться подверженным риску развития заболевания на основании таких факторов, как генетические мутации, генетические аномалии, генетические нарушения, семейный анамнез, аномалии белка (например, недостаточность продуцирования и/или процессинга белка) и образ жизни, который может увеличить риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают в профилактических целях.

В некоторых вариантах осуществления, криоконсервированный и/или криозащищенный образец клеток (например, образец афереза или лейкофереза), такой как образец клеток, который не был подвергнут предварительной селекции клеток (например, без предварительной селекции Т-клеток, такой как селекция с помощью хроматографии) хранится или банкируется в течение периода времени, превышающего или равного 12 часам, 24 часам, 36 часам или 48 часам, либо превышающего или равного 0,5 дня, одному дню, 1,5 дням или двум дням. В некоторых вариантах осуществления, образец хранится или банкируется в течение периода времени, превышающего или равного 1 неделе, 2 неделям, 3 неделям или 4 неделям. В некоторых вариантах осуществления, образец помещают на долгосрочное хранение или на долгосрочное банкирование. В некоторых аспектах, образец хранят в течение периода времени, превышающего или равного 1 месяцу, 2 месяцам, 3 месяцам, 4 месяцам, 5 месяцам, 6 месяцам, 7 месяцам, 8 месяцам, 9 месяцам, 10 месяцам, 11 месяцам, 1 году, 2 годам, 3 годам, 4 годам, 5 годам, 6 годам, 7 годам, 8 годам, 9 годам, 10 годам, 11 годам, 12 годам, 13 годам, 14 годам, 15 годам, 16 годам, 17 годам, 18 годам, 19 годам, 20 годам, 25 годам, 30 годам, 35 годам, 40 годам и больше.

В некоторых вариантах осуществления, образец афереза или лейкофереза, взятый у

донора, транспортируют в охлажденной среде в помещение для хранения или обработки и/или криогенно хранят в помещении для хранения, или обрабатывают в средстве для обработки. В некоторых вариантах осуществления, перед отправкой образец обрабатывают, например, путем отбора Т-клеток, таких как CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки и/или CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, такую обработку проводят после доставки и перед криогенным хранением образца. В некоторых вариантах осуществления, обработку проводят после оттаивания образца после криогенного хранения.

Позволяя донорам хранить свои клетки на стадии, когда доноры и, следовательно, их клетки не подвергались интенсивному лечению заболевания и/или до заражения заболеванием или состоянием или его диагностики, такие клетки могут иметь определенные преимущества для использования в клеточной терапии по сравнению с клетками, собранными после одного или нескольких циклов лечения. Например, клетки, собранные до одного или нескольких циклов лечения, могут быть более здоровыми, могут демонстрировать более высокие уровни определенных клеточных активностей, могут расти быстрее и/или могут быть более восприимчивы к генетическим манипуляциям, чем клетки, прошедшие несколько циклов лечения. Другой пример преимущества по вариантам осуществления, описанным в настоящем документе, может включать удобство. Например, путем сбора, необязательной обработки и хранения донорских клеток до того, как они потребуются для клеточной терапии, клетки будут легко доступны, если и когда они позже понадобятся реципиенту. Это может увеличить мощность лаборатории афереза, предоставив техническим специалистам большую гибкость для планирования процесса сбора афереза.

Примеры способов и систем криогенного хранения и обработки клеток из образца, такого как образец афереза, могут включать описанные в WO2018170188. В некоторых вариантах осуществления, способ и системы включают сбор афереза до того, как пациенту понадобится клеточная терапия, и затем криоконсервацию образца афереза для последующего использования в процессе конструирования клеток, например, Т-клеток, с рекомбинантным рецептором (например, CAR). В некоторых случаях, такие процессы могут включать процессы, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, образец афереза берут у субъекта и криоконсервируют перед последующей Т-клеточной селекцией, активацией, стимуляцией, конструированием, трансдукцией, трансфекцией, инкубацией, культивированием, сбором, формированием клеточной популяции и/или введением составленной клеточной популяции субъекту. В таких примерах, криоконсервированный образец афереза размораживают перед тем, как подвергнуть образец одной или нескольким стадиям селекции, таким как любая из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, криоконсервированный и/или криозащищенный образец клеток (например, образец афереза или лейкоафереза), такой как образец клеток, который не подвергался предварительной селекции клеток (например, без

предварительной селекции Т-клеток, такой как селекция с помощью хроматографии) размораживают перед использованием в последующих процессах производства клеточной популяции для клеточной терапии, например, Т-клеточной популяции, содержащей CAR+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, такой криоконсервированный и/или криозащищенный образец клеток (например, образец афереза или лейкофереза) используют в связи со способом, предложенным в настоящем документе, для генной терапии Т-клеток, такой как терапия CAR+ Т-клетками. В конкретных примерах никакая дополнительная стадия криоконсервации не проводится до или во время стадий сбора/составления.

В некоторых вариантах осуществления, селекция, выделение или обогащение клеток или популяций включает одну или несколько стадий получения и/или разделения клеток на не аффинной основе. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к определенным компонентам. В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте Перколла или Фиколла. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например Т-клетки, выделяют, селективируют или обогащают путем хроматографического выделения, такого как колоночная хроматография, включая аффинную хроматографию, или гелепроникающую хроматографию. В некоторых вариантах осуществления, в способе используется реагент, связывающийся с рецептором, который связывается с молекулой рецептора, расположенной на поверхности клетки-мишени, например клетки, подлежащей выделению, селекции или обогащению. Такие способы могут быть описаны как технология (бесследной) клеточной аффинной хроматографии (САТСН). В некоторых вариантах осуществления, способы, методы и реагенты для селекции, выделения и обогащения описаны, например, в WO 2013124474 и WO 2015164675, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Селекцию клеток можно проводить с использованием одной или нескольких хроматографических колонок. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько хроматографических колонок включены в закрытую систему. В некоторых вариантах осуществления, закрытая система представляет собой автоматизированную закрытую систему, например, требующую минимального или отсутствия вмешательства пользователя (например, человека). В некоторых вариантах осуществления, выбор клетки выполняется последовательно (например, методом последовательного выбора). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько хроматографических колонок расположены последовательно. Например, первая колонка может быть ориентирована

таким образом, что выход из колонки (например, элюент) может подаваться, например, через подсоединенную трубку во вторую хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления, несколько хроматографических колонок могут быть расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления, селекция клеток может быть достигнута путем проведения последовательных стадий положительной и отрицательной селекции, где, на последующей стадии, отрицательная и/или положительная фракция с предшествующей стадии подвергается дальнейшей селекции, где весь процесс проводят в одной и той же пробирке или комплекте трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательной селекции, при которой осуществляют первую селекцию для обогащения одной из популяций CD4⁺ или CD8⁺, и не селектированные клетки из первой селекции используют в качестве источника клеток для второй селекции для обогащения другой из популяций CD4⁺ или CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций одной или обеих популяций CD4⁺ или CD8⁺, например, Т-клеток центральной памяти (Т_{СМ}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательной селекции, при которой проводят первую селекцию для обогащения популяции CD3⁺, и селектированные клетки используют в качестве источника клеток для второй селекции для обогащения популяции CD3⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательной селекции, при которой проводят первую селекцию для обогащения популяции CD3⁺ на первой стационарной фазе (например, в первой хроматографической колонке), и поток, содержащий несвязанные клетки, используют в качестве источника клеток для второй селекции для обогащения популяции CD3⁺ на второй стационарной фазе (например, во второй хроматографической колонке), где первая и вторая стационарные фазы расположены последовательно. В некоторых вариантах осуществления, селекция представляет собой положительную селекцию CD3⁺ Т-клеток (например, с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфически связывается с CD3 клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяции CD3⁺, например, Т-клеток центральной памяти (Т_{СМ}), подобных наивным Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательной селекции, при которой проводят первую селекцию для обогащения популяции CD3⁺, и селектированные клетки используют в качестве

источника клеток для второй селекции для обогащения популяции CD4+. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяции CD3+CD4+, например, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают последовательной селекции, при которой проводят первую селекцию для обогащения популяции CD3+, и селектированные клетки используют в качестве источника клеток для второй селекции для обогащения популяции CD8+. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяции CD3+CD8+, например, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предполагается, что в некоторых аспектах, определенные субпопуляции Т-клеток (например, CD3+ клетки), такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки отбирают методами положительной или отрицательной последовательной селекции. В некоторых вариантах осуществления, выбор клеток проводится параллельно (например, методом параллельной селекции). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько хроматографических колонок расположены параллельно. Например, две или несколько колонок могут быть расположены таким образом, что образец загружается в две или несколько колонок одновременно через трубку, что позволяет наносить образец на каждую колонку без необходимости прохождения образца через первую колонку. Например, при использовании метода параллельной селекции, селекцию клеток можно проводить путем одновременного проведения положительных и/или отрицательных стадий селекции, например, в закрытой системе, где весь процесс осуществляется в одной и той же трубке или наборе трубок. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельной селекции, при которой образец загружают на две или больше хроматографические колонки, где каждая колонка влияет на селекцию клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, две или несколько колонок для хроматографии производят селекцию популяций CD3+, CD4+ или CD8+ по отдельности. В некоторых вариантах осуществления, две или несколько хроматографических колонок, включая аффинную хроматографию или гель-проникающую хроматографию, независимо влияют на селекцию одной и той же клеточной популяции. Например, две или несколько хроматографических колонок могут влиять на селекцию CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или несколько хроматографических колонок, включая аффинную хроматографию или гель-

проникающую хроматографию, независимо влияют на селекцию различных клеточных популяций. Например, две или несколько хроматографических колонок независимо друг от друга могут влиять на селекцию CD3⁺ клеток, CD4⁺ клеток и CD8⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции, например, с использованием методов последовательной селекции, для обогащения субпопуляций одной или всех клеточных популяций, отобранных посредством параллельной селекции. Например, селектированные клетки могут быть дополнительно селектированы для Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельной селекции, при которой проводят параллельную селекцию для обогащения популяции CD3⁺ в двух или нескольких колонках. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяции CD3⁺, например, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельной селекции, при которой селекцию проводят для обогащения популяции CD3⁺ и популяции CD4⁺ в двух или нескольких колонках, независимо. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяций CD3⁺ и CD4⁺, например, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельной селекции, при которой проводят параллельную селекцию для обогащения популяции CD3⁺ и популяции CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяций CD3⁺ и CD8⁺, например, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных по или экспрессирующих высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, образец, содержащий клетки-мишени, подвергают параллельной селекции, при которой проводят параллельную селекцию для обогащения популяции CD4⁺ и популяции CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления, может быть осуществлена дополнительная селекция или селекции для обогащения субпопуляций популяций CD4⁺ и CD8⁺, например, Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), наивных Т-клеток и/или клеток, положительных или экспрессирующих высокие уровни

одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+. Предполагается, что в некоторых аспектах, определенные субпопуляции Т-клеток (например, CD3+, CD4+, CD8+ Т-клеток), такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и/или CD45RO+ Т-клетки отбирают методами положительной или отрицательной параллельной селекции. В некоторых вариантах осуществления, последовательный и параллельный методы выбора могут использоваться в комбинации.

2. Активация/стимуляция

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в сосуде для культивирования, таком как блок, камера, пакет, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, мешок или другой контейнер для культивирования. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для праймирования клеток к генной инженерии, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора.

В конкретных вариантах осуществления стимулирующий реагент содержит олигомерный реагент, например реагент мутеина стрептавидина, который конъюгирован, связан или присоединен к одному или нескольким агентам, например, лиганду, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов имеют присоединенный домен связывания или партнер по связыванию (например, партнер по связыванию C), который способен связываться с олигомерным реагентом в конкретных сайтах связывания (например, сайте связывания Z). В некоторых вариантах осуществления, множество агентов обратимо связано с олигомерным реагентом. В различных вариантах осуществления, олигомерный реагент имеет множество конкретных сайтов связывания, которые в некоторых вариантах осуществления, обратимо связаны с множеством агентов в домене связывания (например, партнер по связыванию C). В некоторых вариантах осуществления, количество связанных агентов снижается или уменьшается в присутствии конкурирующего реагента, например, реагента, который также способен связываться с конкретными сайтами связывания (например, сайтом связывания Z).

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий реагент представляет собой или включает обратимые системы, в которых, по меньшей мере, один агент (например, агент, способный продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетка) ассоциирован, например, обратимо ассоциирован с олигомерным реагентом. В некоторых

вариантах осуществления, реагент содержит множество сайтов связывания, способных связываться, например, обратимо связываться с агентом. В некоторых случаях, реагент представляет собой реагент в виде олигомерных частиц, имеющий, по меньшей мере, один присоединенный агент, способный продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетка. В некоторых вариантах осуществления, агент содержит, по меньшей мере, один сайт связывания, например, сайт связывания В, который может специфически связываться с эпитопом или участком молекулы, и также содержит партнера по связыванию, также называемого в настоящем документе партнером по связыванию С, который специфически связывается, по меньшей мере, с одним сайтом связывания реагента, например сайтом связывания Z реагента. В некоторых вариантах осуществления, связывающее взаимодействие между партнером по связыванию С и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z является нековалентным взаимодействием. В некоторых случаях, связывающее взаимодействие между партнером по связыванию С и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z, представляет собой ковалентное взаимодействие. В некоторых вариантах осуществления, связывающее взаимодействие, такое как нековалентное взаимодействие, между партнером по связыванию С и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z, является обратимым.

Вещества, которые можно использовать в качестве олигомерных реагентов в таких обратимых системах, известны, см., *например*, патенты США №№ 5,168,049; 5,506,121; 6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; и международную опубликованную заявку РСТ №№ WO2013/124474 и WO2014/076277. Неограничивающие примеры реагентов и партнеров по связыванию, способных образовывать обратимое взаимодействие, а также веществ (например, конкурирующих реагентов), способных обращать такое связывание, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерный реагент представляет собой олигомер стрептавидина, мутеин стрептавидина или аналога, авидина, мутеина авидина или аналога (такого как нейтравидин) или их смесь, в которой такой олигомерный реагент содержит один или несколько сайтов связывания для обратимой ассоциации с доменом связывания агента (например, партнера по связыванию С). В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен агента может представлять собой биотин, производное или аналог биотина, или стрептавидин-связывающий пептид, или другую молекулу, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином стрептавидина или аналогом, авидином или мутеином авидина или аналогом.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов (например, агенты, которые способны продуцировать сигнал в клетке, такой как Т-клетка) ассоциированы, например, обратимо связаны с олигомерным реагентом, например, через множество конкретных сайтов связывания (например, сайты связывания Z), присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях, это приводит к тому, что агенты располагаются близко друг к другу, так что эффект авидности может иметь место, если клетка-мишень, имеющая (по меньшей мере, две копии) молекулы клеточной

поверхности, которая связана или распознается агентом, будет контактировать с агентом.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерный реагент представляет собой олигомер стрептавидина, олигомер мутеина стрептавидина, олигомер аналога стрептавидина, олигомер авидина, олигомер, состоящий из мутеина авидина или аналога авидина (такого как нейтравидин) или их смесь. В конкретных вариантах осуществления, олигомерные реагенты содержат определенные сайты связывания, которые способны связываться со связывающим доменом (например, партнером по связыванию С) агента. В некоторых вариантах осуществления, связывающий домен может представлять собой биотин, производное или аналог биотина, или стрептавидин-связывающий пептид, или другую молекулу, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином стрептавидина или аналогом, авидином или мутеином авидина или аналогом. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может представлять собой стрептавидин дикого типа, мутеины стрептавидина или аналоги, такие как стрептавидин-подобные полипептиды. Аналогичным образом, авидин, в некоторых аспектах, включает авидин дикого типа или мутеины авидина или аналоги, такие как нейтравидин, дегликозилированный авидин с модифицированными аргининами, который обычно имеет более нейтральное значение pI и доступен в качестве альтернативы нативному авидину. Как правило, дегликозилированные нейтральные формы авидина включают коммерчески доступные формы, такие как «Extravidin», доступный от Sigma Aldrich, или «NeutrAvidin», доступный, например, от Thermo Scientific или Invitrogen.

В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой стрептавидин или мутеин стрептавидина или аналог. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин дикого типа (wt стрептавидин) имеет аминокислотную последовательность, описанную Argarana et al., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 68). В общем, стрептавидин в природе встречается в виде тетрамера из четырех идентичных субъединиц, т.е. это гомо-тетрамер, где каждая субъединица содержит единственный сайт связывания биотина, производного или аналога биотина или миметика биотина. Типовой последовательностью субъединицы стрептавидина является аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 68, но такая последовательность также может включать последовательность, присутствующую в ее гомологах из других видов *Streptomyces*. В частности, каждая субъединица стрептавидина может демонстрировать сильное сродство связывания с биотином с константой диссоциации (K_d) порядка примерно 10^{-14} М. В некоторых случаях, стрептавидин может существовать в виде одновалентного тетрамера, в котором только один из четыре сайтов связывания является функциональными (Howarth et al. (2006) *Nat. Methods*, 3:267-73; Zhang et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463:1059-63)), двухвалентного тетрамера в котором два из четырех сайтов связывания являются функциональными (Fairhead et al. (2013) *J. Mol. Biol.*, 426:199-214) или могут присутствовать в мономерной или димерной форме (Wu et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280:23225-31; Lim et al. (2010) *Biochemistry*, 50:8682-91).

В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может быть в любой форме,

такой как стрептавидин дикого типа или не модифицированный, такой как стрептавидин из видов *Streptomyces* или его функционально активный фрагмент, который включает, по меньшей мере, одну функциональную субъединицу, содержащую сайт связывания биотина, производное или аналог биотина или миметик биотина, которые обычно содержат, по меньшей мере, одну функциональную субъединицу стрептавидаина дикого типа из *Streptomyces avidinii*, представленного в SEQ ID NO: 68, или его функционально активный фрагмент. Например, в некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может включать фрагмент стрептавидаина дикого типа, который усечен на N- и/или C-конце. Такие минимальные стрептавидины включают любые, которые начинаются с N-конца в области аминокислотных положений 10-16 SEQ ID NO: 68 и заканчиваются на C-конце в области аминокислотных положений 133-142 SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, функционально активный фрагмент стрептавидаина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин, такой как представлен в SEQ ID NO: 69, может дополнительно содержать N-концевой метионин в положении, соответствующее Ala13, с нумерацией, указанной в SEQ ID NO: 68. Ссылка на положение остатков в стрептавидине или мутеинах стрептавидаина относится к нумерации остатков в SEQ ID NO: 68.

Примеры стрептавидинов или мутеинов стрептавидаина упоминаются, например, в WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6,022,951, WO 98/40396 или WO 96/24606. Примеры мутеинов стрептавидаина известны в данной области техники, см., например, патенты США №№ 5,168,049; 5,506,121; 6,022,951; 6,156,493; 6,165,750; 6,103,493; или 6,368,813; или международную опубликованную заявку PCT № WO2014/076277.

В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидаина может содержать аминокислоты, которые не являются частью не модифицированного или стрептавидаина дикого типа, или может включать только часть дикого типа или не модифицированного стрептавидаина. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидаина содержит, по меньшей мере, одну субъединицу, которая может иметь на одну аминокислотную замену (замену) больше по сравнению с субъединицей не модифицированного или дикого типа стрептавидаина, например, по сравнению с субъединицей стрептавидаина дикого типа, указанной в SEQ. ID NO: 68 или его функционально активного фрагмента, например, представленного в SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания, такая как константа диссоциации (K_d), стрептавидаина или мутеина стрептавидаина для связывающего домена составляет меньше 1×10^{-4} М, 5×10^{-4} М, 1×10^{-5} М, 5×10^{-5} М, 1×10^{-6} М, 5×10^{-6} М или 1×10^{-7} М, но обычно больше 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М. Например, пептидные последовательности (например, Strep-tag), такие как описаны в патенте США № 5,506,121, может действовать как имитатор биотина и демонстрировать аффинность связывания со стрептавидином, например, с K_d приблизительно от 10^{-4} до 10^{-5} М. В некоторых случаях, аффинность связывания можно дополнительно улучшить путем внесения мутации внутри молекулы стрептавидаина, см., например, патент США №

6,103,493 или WO2014/076277. В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания можно определить способами, известными в данной области техники, такими как любые из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, реагент, такой как стрептавидин или мутеин стрептавидина, демонстрирует аффинность связывания с партнером по связыванию пептидного лиганда, где партнер по связыванию пептидного лиганда может представлять собой партнер по связыванию С, присутствующий в агенте (например, агент, связывающийся с рецептором, или агент селекции). В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность с общей формулой His-Pro-Хаа, где Хаа представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, например, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, представленную в SEQ ID NO: 72, такую как указана в SEQ ID NO: 73. В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемую Strep-tag®, представленную в SEQ ID NO: 74). В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемую Strep-tag® II, представленную в SEQ ID NO: 75). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательное расположение, по меньшей мере, двух модулей связывания стрептавидина, где расстояние между двумя модулями составляет, по меньшей мере, 0 и не больше 50 аминокислот, где один модуль связывания имеет от 3 до 8 аминокислот и содержит, по меньшей мере, последовательность His-Pro-Хаа, где Хаа представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, и где другой модуль связывания имеет такой же или другой пептидный лиганд стрептавидина, как указано в SEQ ID NO: 72 (см., например, международную опубликованную заявку РСТ № WO 02/077018, патент США № 7,981,632). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательность, имеющую формулу, указанную в любой из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 78-80 и 81-82. В большинстве случаев все эти стрептавидин-связывающие пептиды связываются с одним и тем же сайтом связывания, а именно, с сайтом связывания биотина стрептавидина. Если один или несколько таких стрептавидин-связывающих пептидов используются в качестве партнеров по связыванию С, например, С1 и С2, реагент мультимеризации и/или реагенты олигомерных частиц, связанные с одним или несколькими агентами через партнер по связыванию С, обычно состоят из одного или нескольких мутеинов стрептавидина.

В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина представляет собой мутант, как описано в патенте США № 6,103,493. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит, по меньшей мере, одну мутацию в области аминокислотных положений 44-53, исходя из аминокислотной последовательности

стрептавидина дикого типа, такой как представлена в SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит мутацию в одном или нескольких остатках 44, 45, 46 и/или 47. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит замену Glu в положении 44 стрептавидина дикого типа на гидрофобную алифатическую аминокислоту, например Val, Ala, Ile или Leu, любую аминокислоту в положении 45, алифатическую аминокислоту, такую как гидрофобная алифатическая аминокислота в положении 46 и/или замену Val в положении 47 основной аминокислотой, например Arg или Lys, обычно, Arg. В некоторых вариантах осуществления, Ala находится в положении 46, и/или Arg находится в положении 47, и/или Val или Ile находится в положении 44. В некоторых вариантах осуществления, мутант стрептавидина содержит остатки Val44-Thr45-Ala46-Arg47, как указано в типовых мутеинах стрептавидина, имеющих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83 или SEQ ID NO: 84 или 85 (также известных как мутант 1 стрептавидина, SAM1). В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит остатки Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, как указано в типовых мутеинах стрептавидина, содержащих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86, 87 или 59 (также известных как SAM2). В некоторых случаях, такие мутеины стрептавидина описаны, например, в патенте США 6,103,493 и имеются в продаже под торговой маркой Strep-Tactin®. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 89. В конкретных вариантах осуществления, молекула представляет собой тетрамер стрептавидина или мутеин стрептавидина, содержащий последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 69, 84, 87, 88, 90, 85 или 59, которая в виде тетрамера представляет собой молекулу, которая содержит 20 первичных аминов, в том числе 1 N-концевой амин и 4 лизина на мономер.

В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина демонстрирует аффинность связывания, характеризующуюся константой диссоциации (K_d), которая составляет точно или меньше $3,7 \times 10^{-5}$ М для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly, также называемого Strep-tag®, представленного в SEQ ID NO: 74), и/или которая составляет точно или меньше $7,1 \times 10^{-5}$ М для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, также называемого Strep-tag® II, представленного в SEQ ID NO: 75), и/или которая составляет точно или меньше $7,0 \times 10^{-5}$ М, $5,0 \times 10^{-5}$ М, $1,0 \times 10^{-5}$ М, $5,0 \times 10^{-6}$ М, $1,0 \times 10^{-6}$ М, $5,0 \times 10^{-7}$ М или $1,0 \times 10^{-7}$ М, но обычно больше 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М для любого из пептидных лигандов, представленных в любой из SEQ ID NO: 75, 76-77, 81-82, 78-80, 73, 74, 70, 72.

В некоторых вариантах осуществления, полученный мутеин стрептавидина демонстрирует аффинность связывания, характеризующуюся константой ассоциации (K_a), которая составляет точно или больше $2,7 \times 10^4$ М⁻¹ для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly, также называемого Strep-tag®, представленного в SEQ ID NO: 74) и/или которая составляет точно или больше $1,4 \times 10^4$ М⁻¹ для пептидного лиганда (Trp-Ser-

His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, также называемого Strep-tag® II, представленного в SEQ ID NO: 75), и/или которая составляет точно или больше $1,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,11 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,43 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,11 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, но обычно меньше $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ или $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ для любого из пептидных лигандов, представленных в любой из SEQ. ID NOS: 75, 76-77, 81-82, 78-80, 73, 74, 70, 72.

В конкретных вариантах осуществления, в настоящем документе предложен реагент на основе олигомерных частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный реагент в виде частиц, предложенный в настоящем документе, содержит множество сайтов связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или несколькими агентами, например, стимулирующим агентом и/или агентом селекции. В некоторых вариантах осуществления, олигомерная частица имеет радиус, например средний радиус, от 70 нм до 125 нм включительно; молекулярная масса от 1×10^7 г/моль до 1×10^9 г/моль включительно; и/или от 1000 до 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, реагент на основе олигомерных частиц связан, например, обратимо связан с одним или несколькими агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, например, с рецептором на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов представляют собой агенты, описанные в настоящем документе, например, в Разделе II-C-2. В некоторых вариантах осуществления, агент представляет собой анти-CD3 и/или анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как антитело или его антигенный фрагмент, который содержит партнер по связыванию, например, пептид, связывающий стрептавидин, например Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько агентов связываются с рецептором клеточной поверхности и/или вспомогательной молекулой для стимуляции клетки и могут включать антитело, таргетирующее комплекс TCR, или его компонент, антитело, таргетирующее костимулирующую молекулу, анти-CD3-антитела, анти-CD28-антитела или анти-CD3-и/или анти-CD28 Fab), и один или несколько агентов содержат партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько агентов содержат олигомер на основе стрептавидина, такой как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный с Strep-мечеными анти-CD3 и Strep-мечеными анти-CD28 Fab. В некоторых вариантах осуществления, реагент на основе олигомерных частиц представляет собой любой реагент, описанный в WO 2015/158868 или WO 2018/197949.

В конкретных вариантах осуществления, олигомерный реагент получают путем полимеризации типового мутеина стрептавидина, обозначенного как STREP-TACTIN® M2 (см., например, патент США № 6,103,493 и Voss and Skerra (1997) Protein Eng., 1:975-

982, и Argarana et al. (1986) *Nucleic Acids Research*, 1871-1882). В конкретных вариантах осуществления, для получения мутеинов стрептавидина для олигомеризации, мутеины стрептавидина, содержащие одну или несколько реакционноспособных тиоловых групп, инкубируют с мутеинами стрептавидина, активированными малеимидом. В конкретных вариантах осуществления, для получения тиолированного мутеина стрептавидина примерно 100 мг мутеина стрептавидина тиолируют путем инкубации с гидрохлоридом 2-иминотиолана в молярном соотношении 1:100 при pH примерно 8,5 при 24°C в течение 1 часа в 100 mM боратного буфера в общем объеме 2,6 мл. Для реакции активации, примерно 400 мг мутеина стрептавидина инкубируют с сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноатом (SMPH) в молярном соотношении 1:2 при pH примерно 7,2 при 24°C в течение 1 часа в общем объеме примерно 10,4 мл в натрий-фосфатном буфере. Реакции тиолирования и активации координируются таким образом, чтобы они начинались примерно в одно и то же время, и продолжительность реакций контролируется. После реакций, гидрохлорид 2-иминотиолана и SMPH удаляют из образцов путем индивидуального проведения гель-фильтрации образцов на обессоливающих колонках PD-10 (GE Healthcare). Для каждого 2,5 мл объема образца, 1 мл колонку PD-10 уравнивают и загружают либо тиолированным мутеином стрептавидина, либо малеимидным мутеином стрептавидина, и проводят элюирование, добавляя 3,5 мл буфера для связывания (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТК, pH 7,2). Гель-фильтрацию малеимидного мутеина стрептавидина проводят на 4 колонках, принимая во внимание объем >10 мл, и элюаты объединяют. Время реакций активации и тиолирования и время между окончанием реакций активации и тиолирования и началом реакций олигомеризации контролируют. Обычно от начала гель-фильтрации, т.е. окончания реакций активации и тиолирования, до начала реакции олигомеризации проходит не больше десяти минут.

В конкретных вариантах осуществления, образцы малеимидного мутеина стрептавидина и тиолированного мутеина стрептавидина затем объединяют до общего объема примерно 17,5 мл и инкубируют в течение 1 часа при pH 7,2 при 24°C в условиях перемешивания со скоростью примерно 600 об/мин. Поскольку с SMPH инкубируют в четыре раза больше мутеина стрептавидина, чем с гидрохлоридом 2-иминотиолана, молярное соотношение тиолированного мутеина стрептавидина и малеимидного мутеина стрептавидина составляет 1:4 во время реакции олигомеризации. После реакции, оставшиеся SH-группы олигомеризованного реагента мутеина стрептавидина насыщают путем инкубации с N-этилмалеимидом (NEM) в течение 15 мин при 24°C при перемешивании (примерно 600 об/мин) с последующей инкубацией в течение еще 16-20 часов при 4°C. После инкубации с NEM, образец, содержащий олигомеризованный мутеин стрептавидина, центрифугируют, и супернатант фильтруют через мембрану 0,45 мкм (Millex-HP 0,45 мкм от Merck Millipore). Затем отфильтрованный раствор загружают в колонку (Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare) для эксклюзионной хроматографии (SEC) с хроматографической системой АКТА Explorer (GE Healthcare).

Фракции с миллиединицей оптической плотности (mAU) больше или равной 1500 mAU объединяют. Объединенный образец, содержащий олигомерный мутеин стрептавидина, обрабатывают 100 мМ гидроксилamina при pH 6,35 в течение 15 минут при комнатной температуре. Для удаления гидроксилamina после обработки, образец загружают в колонку PD10 (2,5 мл на колонку) и элюируют 3,5 мл буфера, содержащего 100 мМ NaH_2PO_4 , 140 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТК, pH 7,2. Элюаты PD10 объединяют и стерильно фильтруют через 0,45 мкм фильтр, затем через 0,22 мкм фильтр, затем образцы замораживают и хранят при -80°C . Перед замораживанием, измеряют конечную концентрацию реагента олигомерного мутеина стрептавидина и определяют размер олигомерного реагента мутеина стрептавидина с помощью динамического светорассеяния (DLS).

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие агенты, такие как анти-CD3-антитело и анти-CD28 Fab антитело, мультимеризуют путем обратимого связывания с олигомерным реагентом мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие агенты, например, анти-CD3- и анти-CD28 Fab фрагменты, обратимо связаны с мутеиновым олигомером стрептавидина через партнер по связыванию пептида стрептавидина, слитый с каждым стимулирующим агентом, например, с каждым Fab фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3 Fab-фрагмент получен из моноклонального антитела, связывающего CD3, продуцируемого линией клеток гибридомы ОКТ3 (ATCC® CRL-8001™; см. также патент США № 4,361,549), и содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи анти-CD3 антитела ОКТ3, описанный в Arakawa et al. *J. Biochem.* 120, 657-662 (1996). Эти последовательности представлены в SEQ ID NO: 60 и 61, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD28 Fab фрагмент получен из антитела CD28.3 (депонированного в виде синтетической одноцепочечной Fv конструкции под № доступа GenBank AF451974.1; см. также Vanhove et al., *BLOOD*, 15 July 2003, Vol. 102, № 2, страницы 564-570) и содержит переменные домены тяжелой и легкой цепей анти-CD28 антитела CD28.3, представленные в SEQ ID NO: 62 и 63, соответственно. Примеры Fab-фрагментов с пептидной меткой см. в публикациях международной патентной заявки №№ WO 2013/011011 и WO 2013/124474.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен реагент на основе олигомерных частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный реагент в виде частиц, предложенный в настоящем документе, содержит множество сайтов связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или несколькими агентами, например, стимулирующим агентом и/или селективным агентом. В некоторых вариантах осуществления, олигомерная частица имеет радиус, например средний радиус, от 80 нм до 120 нм, включительно; молекулярная масса, например, средняя молекулярная масса от $7,5 \times 10^6$ г/моль до 2×10^8 г/моль, включительно; и/или количество, например среднее

количество, от 500 до 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления, реагент на основе олигомерных частиц связан, например, обратимо связан, с одним или несколькими агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, например, с рецептором на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, агент включает один или несколько агентов, которые связываются с рецептором клеточной поверхности и/или вспомогательной молекулой для стимуляции клетки (например, такой как антитело, таргетирующее комплекс TCR или его компонент, антитело, таргетирующее костимулирующую молекулу, анти-CD3 антитела, анти-CD28 антитела или анти-CD3/анти-CD28 Fab). В некоторых вариантах осуществления, агент представляет собой анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, такой как Fab, который содержит партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько агентов представляют собой анти-CD3 и/или анти-CD28 Fab, содержащие партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II.

В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии, примерно или, по меньшей мере, 0,01 мкг, 0,02 мкг, 0,03 мкг, 0,04 мкг, 0,05 мкг, 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,75 мкг, 1 мкг, 1,2 мкг, 1,4 мкг, 1,6 мкг, 1,8 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг олигомерный стимулирующий реагент (например, олигомер на основе стрептавидина, такой как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированный со Strep-мечеными анти-CD3 и Strep-мечеными анти-CD28 Fab) на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или примерно 4 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированного со Strep-мечеными анти-CD3 и Strep-мечеными анти-CD28 Fab) на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или примерно 1,2 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированного со Strep-меченым анти-CD3 и Strep-меченым анти-CD28 Fab) на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или примерно 0,8 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированного со Strep-меченым анти-CD3 и Strep-меченым анти-CD28 Fab) на 10^6 клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки стимулируют или подвергают стимуляции в присутствии точно или примерно 1,8 мкг олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированного со Strep-меченым анти-CD3 и Strep-меченым анти-CD28 Fab) на 10^6 клеток. В некоторых аспектах, в олигомерном стимулирующем реагенте массовое соотношение между олигомерными частицами и

присоединенными агентами составляет примерно 3:1. В некоторых аспектах, в олигомерном стимулирующем реагенте, массовое соотношение между олигомерными частицами, присоединенными анти-CD3 Fab и присоединенными анти-CD28 Fab составляет примерно 3:0,5:0,5. В некоторых аспектах, 4 мкг олигомерного стимулирующего реагента представляет собой или включает 3 мкг олигомерных частиц и 1 мкг присоединенных агентов, например, 0,5 мкг анти-CD3 Fab и 0,5 мкг анти-CD28 Fab. В других примерах, 1,2 мкг олигомерного стимулирующего реагента на 10^6 клеток представляет собой или включает 0,9 мкг олигомерных частиц и 0,3 мкг присоединенных агентов, например, 0,15 мкг анти-CD3 Fab и 0,15 мкг анти-CD28 Fab на 10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент добавляют в бессывороточную среду, и стимуляцию проводят в бессывороточной среде, например, как описано в PCT/US2018/064627.

В конкретных вариантах осуществления, количество точно или примерно 900×10^6 Т-клеток (например, 900×10^6 CD3+ Т-клеток или 450×10^6 CD4+ Т-клеток и 450×10^6 CD8+ Т-клеток) входной популяции подвергают стимуляции, например, культивированию в стимулирующих условиях, в присутствии олигомерного стимулирующего реагента (например, олигомера на основе стрептавидина, такого как олигомер мутеина стрептавидина, конъюгированного со Strep-мечеными анти-CD3 и Strep-мечеными анти-CD28 Fab). В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки входной популяции, стимулируют или подвергают стимуляции, например, культивируют в стимулирующих условиях, таких как присутствие стимулирующего реагента, при плотности, точно, примерно или, по меньшей мере, $0,01 \times 10^6$ клеток/мл, $0,1 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл, $4,0 \times 10^6$ клеток/мл, $5,0 \times 10^6$ клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл или 50×10^6 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, клетки входной популяции, стимулируют или подвергают стимуляции, например, культивируют в стимулирующих условиях, таких как присутствие стимулирующего реагента, при плотности, точно, примерно или, по меньшей мере, $3,0 \times 10^6$ клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция, например, популяция сконструированных Т-клеток, создается с помощью стадий, которые включают: инкубацию входной популяции Т-клеток или содержащей Т-клетки их с олигомерным реагентом в виде стимулирующих частиц, например, стимулирующим реагентом на основе олигомера, описанным в настоящем документе, в течение примерно от 18 до 30 часов, включительно; введение гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в Т-клетки стимулируемой популяции, (iii) инкубацию клеток в статических условиях, (iv) удаление или отделение стимулирующих реагентов от клеток путем добавления конкурентного реагента, и (v) сбор или получение инкубированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция, например, популяция сконструированных Т-клеток, создается с помощью стадий, которые включают:

инкубацию входной популяции, включающей Т-клетки, в стимулирующих условиях в течение от 18 до 30 часов, включительно, в присутствии олигомера мутеина стрептавидина с обратимо присоединенным к одному или нескольким агентам, которые связываются с рецептором клеточной поверхности и/или вспомогательной молекулой для стимуляции клетки (например, антителом, таргетирующим комплекс TCR или его компонент, антителом, таргетирующим костимулирующую молекулу, анти-CD3 антителом, анти-CD28 антителом или анти-CD3/анти-CD28 Fab); трансдукцию стимулированных Т-клеток вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, путем центрифужной инокуляции стимулированных Т-клеток в присутствии вирусного вектора, и затем инкубации трансдуцированных Т-клеток в статических условиях в течение примерно от 42 часов до 84 часов, включительно; и сбор или получение Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы получения популяции сконструированных клеток включают один или несколько способов стимуляции введенной популяции Т-клеток в присутствии олигомерного мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab в количестве от или от примерно 0,4 мкг до 8 мкг на 10^6 клеток, включительно, например, 1,2 мкг на 10^6 клеток в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15, в течение от 18 до 30 часов, включительно; трансдукции клеток вирусным вектором, кодирующим рекомбинантный рецептор, путем сначала центрифужной инокуляции клеток в присутствии вирусного вектора в течение 30 минут при усилении 693 g, и затем инкубации центрифужно инокулированных клеток с вирусным вектором в течение от 24 до 96 часов, включительно; добавления биотина (например, D-биотина) к клеткам для удаления или выделения из клеток олигомерного мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab; и сбора или получения клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают между или между примерно 36 часами и 96 часами, включительно, с момента начала стимуляции. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или получают от 36 до 108 часов или от 48 до 96 часов, включительно после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab удаляют или отделяют от клеток в период от 36 до 96 часов или от 48 до 72 часов, включительно, после начала стимуляции.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерный мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab удаляют или отделяют (например, как описано в Разделе II-C-6) от клеток через или через примерно 48 часов, например, 48 часов \pm 6 часов от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab удаляют или отделяют от клеток примерно через 72 часа, например, 72 часа \pm 6 часов, от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab удаляют или

отделяют от клеток примерно через 96 часов, например, 96 часов \pm 6 часов, от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab удаляют или отделяют от клеток после инкубации, и клетки собирают или получают после добавления биотина или аналога биотина. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный мутеин стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab удаляют или отделяют от клеток во время инкубации, так что клетки возвращают в инкубацию после добавления биотина или аналога биотина.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в присутствии рекомбинантных цитокинов (например, IL-2, IL-7 и IL-15) в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в отсутствие рекомбинантных цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в присутствии минимальной среды. В некоторых вариантах осуществления, инкубация в минимальной среде увеличивает интеграцию, например, стабильную интеграцию гетерологичного или рекомбинантного нуклеотида, увеличивает долю клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, улучшает эффективность или снижает дифференциацию клеток по сравнению с процессами, в которых клетки стимулируют с помощью олигомерных стимулирующих реагентов, инкубируют в присутствии бессывороточной среды, содержащей рекомбинантные цитокины.

В конкретных вариантах осуществления, удаление олигомерного стимулирующего реагента, например, олигомерного мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3/анти-CD28 Fab, например, путем добавления биотина или аналога биотина, снижает степень потери клеток, которая может произойти при выделении или удалении из клеток стимулирующих реагентов. В некоторых вариантах осуществления, меньше или меньше примерно 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% клеток теряются, погибают или отделяются от клеточной популяции, когда олигомерный стимулирующий реагент отделяется или удаляется из клеток. В некоторых вариантах осуществления, выходные популяции, полученные в результате процессов, в которых для стимуляции используются олигомерные стимулирующие реагенты, имеют, имеют примерно или имеют, по меньшей мере, на 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% больше всего клеток, чем выходные популяции, полученные в результате процессов, в которых используются альтернативные стимулирующие реагенты, такие как парамагнитные микроносители, конъюгированные с антителами.

3. Векторы и способы генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, используемые в связи с предложенными способами, применениями, изделиями или композициями, представляют собой клетки, которые были сконструированы с помощью генной инженерии для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетки конструируют путем введения, доставки или переноса последовательностей нуклеиновых

кислот, которые кодируют рекомбинантный рецептор и/или другие молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения сконструированных клеток включают введение полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), в клетку, например, такую, как стимулированная или активированная клетка. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантные белки представляют собой рекомбинантные рецепторы, такие как любые из описанных. Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку может осуществляться с использованием любого из ряда известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, в том числе лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Типовые способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с помощью вирусов, *например*, ретровирусов или лентивирусов, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых вариантах осуществления, с помощью конструирования получают одну или несколько сконструированных композиций обогащенных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают генетическое конструирование клеток, например, введение гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок. Такие рекомбинантные белки могут включать рекомбинантные рецепторы, такие как любые, описанные в Разделе II-A. Можно использовать любой способ введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, который привел бы к интеграции полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, в геном клетки, такой как Т-клетка, включая вирусные и не вирусные методы геномной инженерии. Введение полинуклеотидов, например, гетерологичных или рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантный белок, в клетку может осуществляться с использованием любого из ряда известных векторов. Такие векторы включают вирусные, в том числе лентивирусные и гаммаретровирусные, системы. Типовые способы включают способы переноса гетерологичных полинуклеотидов, кодирующих рецепторы, в том числе посредством вирусной, например, ретровирусной или лентивирусной, трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, популяция стимулированных клеток подвергается генетическому конструированию, например, для введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток (также называемую в настоящем документе трансформированной популяцией клеток).

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают генетическое конструирование клеток, например, введение гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, с использованием не вирусного метода, такого как электропорация, трансфекция фосфатом кальция, слияние протопластов, опосредованная катионными липосомами трансфекция,

наночастицы, такие как липидные наночастицы, бомбардировку микрочастицами с помощью частиц вольфрама, совместное осаждение ДНК с фосфатом стронция и другие подходы, описанные, например, в WO 2014055668 и патенте США № 7,446,190. Также рассматриваются системы на основе транспозонов.

В конкретных вариантах осуществления, клетки подвергают генной инженерии, трансформируют или трансдуцируют после стимуляции, активации и/или инкубации клеток в стимулирующих условиях, таких как любой из способов, представленных в настоящем документе, например, в разделе II. В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько стимулированных популяций предварительно подвергают криозащите и хранению, и затем размораживают и, необязательно, промывают перед генетическим конструированием, трансформацией, трансфекцией или трансдукцией клеток.

В конкретных вариантах осуществления, клетки подвергают генной инженерии, трансформируют или трансдуцируют после того, как клетки стимулируют или подвергают стимуляции, или культивируют в стимулирующих условиях. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы примерно через или в течение 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов, включительно, от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки подвергают генной инженерии, трансформируют или трансдуцируют в течение точно, или примерно 3 дней, двух дней или одного дня, включительно, от начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически конструируют, трансформируют или трансдуцируют точно или примерно от 12 часов до 48 часов, от 16 часов до 36 часов или от 18 часов до 30 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически конструируют, трансформируют или трансдуцируют точно или примерно от 18 часов до 30 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, клетки генетически конструируют, трансформируют или трансдуцируют точно или примерно через 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часов или 24 часов после начала стимуляции.

В некоторых вариантах осуществления, способы генной инженерии осуществляют путем контакта или введения в одну или несколько клеток популяции молекулы нуклеиновой кислоты или полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид гетерологичны клеткам. В конкретных вариантах осуществления, молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты или гетерологичный полинуклеотид не является нативным для клеток. В некоторых вариантах осуществления, молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты или гетерологичный полинуклеотид кодирует белок, например, рекомбинантный белок, который в природе не экспрессируется клеткой. В конкретных вариантах осуществления, молекула гетерологичной нуклеиновой кислоты или полинуклеотид представляет собой или содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая не обнаруживается в клетке до контакта или введения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, стимулированные клетки, сконструированы, например, трансдуцированы или в присутствии адъюванта трансдукции. Примеры адъювантов трансдукции включают, но не ограничены ими, поликатионы, фибронектин или фрагменты или варианты, полученные из фибронектина, и ретронектин. В некоторых вариантах осуществления, клетки сконструированы в присутствии поликатионов, фибронектина или фрагментов или вариантов, полученных из фибронектина, и/или ретронектин. В конкретных вариантах осуществления, клетки конструируют в присутствии поликатиона, который представляет собой полибрен, DEAE-декстран, сульфат протамина, поли-L-лизин или катионную липосому. В конкретных вариантах осуществления, клетки сконструированы в присутствии сульфата протамина. В некоторых вариантах осуществления, присутствие олигомерного стимулирующего реагента, например, как описано в Разделе II-C-2, может действовать как адъювант трансдукции, см., например, WO/2017/068419, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, генную инженерию, например трансдукцию, проводят в бессывороточной среде, например, как описано в настоящем документе или в PCT/US2018/064627. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой определенную или четко определенную среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления.

В конкретных вариантах осуществления, клетки конструируют в присутствии одного или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются T-клетками и/или являются эндогенными для них. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов из пучков 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов из группы 4-альфа-спиралей включают, но не ограничены ими, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой IL-15 или включают его. В конкретных

вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают ИЛ-7. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный ИЛ-2.

В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, стимулированные клетки, конструируют в стимулирующих условиях в присутствии ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления, ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах осуществления, ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантный ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 человека или включают их. В некоторых вариантах осуществления, клетки сконструированы, например, трансдуцированы или в условиях стимуляции в присутствии рекомбинантного ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15, такого как рекомбинантный ИЛ-2 человека (например, 100 МЕ/мл), рекомбинантный ИЛ-7 человека (например, 600 МЕ/мл) и/или рекомбинантный ИЛ-15 человека (например, 100 МЕ/мл).

В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в присутствии такой же или подобной среды, которая присутствовала во время стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в среде, содержащей те же самые цитокины, что и среда, присутствующая во время стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, клетки генетически сконструированы, трансформированы или трансдуцированы в средах, содержащих те же цитокины в тех же концентрациях, что и среды, присутствующие во время стимуляции.

В некоторых вариантах осуществления, генная инженерия клеток представляет собой или включает введение полинуклеотида, например, гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, в клетки путем трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором. В конкретных вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, вирус представляет собой ретровирусный вектор, такой как гаммаретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Известны способы лентивирусной трансдукции. Типовые способы описаны, например, в Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

В некоторых вариантах осуществления, трансдукция осуществляется путем контакта одной или нескольких клеток популяции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, контактирование можно осуществлять с помощью центрифугирования, такого как центрифужная инокуляция (например, центробежная инокуляция). Такие способы включают любые из описанных в международной публикации WO 2016/073602. Примеры центробежных камер включают камеры, производимые и продаваемые Biosafe SA, включая камеры для использования с

системами Serax® и Serax® 2, включая центрифужные камеры A-200/F и A-200 и различные комплекты для использования с такими системами. Типовые камеры, системы и технологическое оборудование и шкафы описаны, например, в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и опубликованной заявке на патент США, № публикации: US 2008/0171951, и опубликованной международной заявке на патент, № публикации WO 00/38762, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Примеры наборов для использования с такими системами включают, но не ограничены ими, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под названиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

В конкретных вариантах осуществления, количество, точно, примерно или, по меньшей мере, 50×10^6 , 100×10^6 , 150×10^6 , 200×10^6 , 250×10^6 , 300×10^6 , 350×10^6 , 400×10^6 , 450×10^6 , 500×10^6 , 550×10^6 , 600×10^6 , 700×10^6 , 800×10^6 , 900×10^6 или $1,000 \times 10^6$ клеток композиции подвергают стимуляции, например, культивируют в стимулирующих условиях, подвергают генной инженерии, например, трансдукции. В конкретных вариантах осуществления, общее количество клеток, например, жизнеспособных Т-клеток, содержащих как CD4⁺ Т-клетки, так и CD8⁺ Т-клетки, которые были подвергнуты стимуляции и впоследствии подвергнуты трансдукции, составляет точно или примерно 50×10^6 клеток, точно или примерно 100×10^6 клеток, точно или примерно 150×10^6 клеток, точно или примерно 200×10^6 клеток, точно или примерно 250×10^6 клеток, точно или примерно 300×10^6 клеток, точно или примерно 350×10^6 клеток, точно или примерно 400×10^6 клеток, точно или примерно 450×10^6 клеток, точно или примерно 500×10^6 клеток, точно или примерно 550×10^6 клеток, точно или примерно 600×10^6 клеток, точно или примерно 700×10^6 клеток, точно или примерно 800×10^6 клеток, точно или примерно 900×10^6 клеток или точно или примерно 1000×10^6 клеток, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В конкретных вариантах осуществления, до 900×10^6 клеток входной популяции подвергают стимуляции, и количество точно, примерно или до 600×10^6 клеток, которые подвергают стимуляции, подвергают генной инженерии, например, трансдукции. В конкретных вариантах осуществления, клеточная композиция, подвергнутая генетическому конструированию, например, трансдукции, содержит жизнеспособные CD4⁺ Т-клетки и жизнеспособные CD8⁺ Т-клетки в соотношении от 1:10 до 10:1, от 1:5 до 5:1, от 4:1 до 1:4, от 1:3 до 3:1, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,25:1 до 1:1,25, от 1,2:1 до 1:1,2, от 1,1:1 до 1:1,1, или примерно 1:1, или 1:1 жизнеспособных CD4⁺ Т-клеток к жизнеспособным CD8⁺ Т-клеткам.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы используются в связи с трансдукцией вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, в, в примерно или в меньше чем 300×10^6 клеток, например, в жизнеспособные Т-клетки из стимулированной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцируют или подвергают трансдукции точно или примерно 100×10^6 клеток, например, жизнеспособных Т-клеток из стимулированной клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы используются в связи с трансдукцией вирусного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, в, в примерно или в меньше чем 600×10^6 клеток, например, в жизнеспособные Т-клетки из стимулированной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцируют или подвергают трансдукции точно или примерно 600×10^6 клеток, например, жизнеспособных Т-клеток из стимулированной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, стимуляции подвергают до 900×10^6 клеток (например, жизнеспособных CD3+ клеток или смешанных жизнеспособных CD4+ клеток и жизнеспособных CD8+ клеток (например, смешанных в соотношении точно или примерно 1:1)), и количество, точно, примерно или вплоть до 600×10^6 клеток из клеток, которые были подвергнуты стимуляции, подвергают трансдукции.

В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию проводят в присутствии IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор для трансдукции замораживают и размораживают перед использованием, и размороженный вирусный вектор разводят бессывороточной средой. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточные среды для разведения вирусного вектора и трансдукции описаны в настоящем документе или в PCT/US2018/064627.

В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например, минимальную среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher)), дополненную одной или несколькими добавками. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок не содержат сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду, дополненную одним или несколькими дополнительными компонентами для поддержания, размножения и/или активации клетки (например, Т-клеток), такими, которые обеспечиваются дополнительной добавкой (например, добавкой для размножения Т-клеток OpTmizer™ (ThermoFisher)). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит замещающую сыворотку добавку, например, замещающую сыворотку иммунных клеток, например, ThermoFisher, № A2596101, замещающую сыворотку иммунных клеток STS™, или замещающую сыворотку иммунных клеток, описанную в Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такой как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин), такую как дипептид в GlutaMax™ (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека.

В конкретных вариантах осуществления, клетки, например клетки из популяции стимулированных клеток, содержат, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90% или по меньшей мере, 95% клеток, которые являются CD4+ Т-клетками или CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение от 24 до 48 часов, от 36 до 12 часов, от 18 до 30 часов или в течение точно или примерно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение или в течение примерно 24 часов, 48 часов или 72 часов, или в течение или в течение примерно 1 дня, 2 дней или 3 дней, соответственно. В конкретных вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение или в течение примерно 24 часов \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часов \pm 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение или в течение примерно 72 часов, 72 \pm 4 часов или в течение или в течение примерно 3 дней.

В некоторых вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают в течение двух дней, в течение 36 часов, в течение 30 часов, в течение 24 часов, в течение 18 часов, в течение 16 часов, в течение 14 часов или в течение 12 часов после начала или инициации инкубации, например, инкубации в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают примерно через 20 часов после начала инкубации, например инкубации в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления, стадию трансдукции начинают через 20 \pm 4 часа после начала инкубации, например инкубации в стимулирующих условиях.

В некоторых вариантах осуществления, система включена в состав и/или объединена с другим оборудованием, включая оборудование для работы, автоматизации, контроля и/или мониторинга аспектов стадии трансдукции и одной или нескольких различных других стадий обработки, выполняемых в системе, например одной или нескольких стадий обработки, которые могут быть выполнены с или в связи с системой центрифужной камеры, как описано в настоящем документе или в международной публикации номер WO2016/073602. Это оборудование в некоторых вариантах осуществления, содержится внутри шкафа. В некоторых вариантах осуществления, контрольно-измерительные приборы включают шкаф, который включает в себя корпус, содержащий схему управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Типовое устройство описано в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и US № 2008/0171951.

В некоторых вариантах осуществления, система содержит ряд контейнеров, например пакетов, трубок, запорных кранов, зажимов, соединителей и центрифужную камеру. В некоторых вариантах осуществления, контейнеры, такие как пакеты, включают один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащих трансдуцируемые клетки и частицы вирусного вектора, в одном контейнере или в отдельных контейнерах, например, одном том же пакете или отдельных пакетах. В некоторых вариантах

осуществления, система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, которую втягивают в камеру и/или другие компоненты для разведения, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или популяции во время способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или нескольких местах в системе, например, в месте, соответствующем линии ввода, линии разбавителя, линии промывки, линии отходов и/или линии вывода.

В некоторых вариантах осуществления, камера связана с центрифугой, которая способна осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубации в связи с трансдукцией клеток и/или на одной или нескольких других стадиях обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, одна или несколько различных стадий обработки выполняются при вращении, например, при определенной силе. Камера, как правило, способна к вертикальному или в общем вертикальному вращению, так что камера находится вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось вертикальны или обычно вертикальны, и торцевая(ые) стенка(и) горизонтальна(ы) или обычно горизонтальна(ы).

В некоторых вариантах осуществления, популяция, содержащая клетки, и популяция, содержащая частицы вирусного вектора и, необязательно, воздух, могут быть объединены или смешаны перед введением популяции в полость. В некоторых вариантах осуществления, популяция, содержащая клетки, и популяция, содержащая частицы вирусного вектора, и, необязательно, воздух предоставляются по отдельности и объединяются и смешиваются в полости. В некоторых вариантах осуществления, во внутреннюю полость можно в любом порядке подавать популяцию, содержащую клетки, популяцию, содержащую частицы вирусного вектора, и, необязательно, воздух. В любом из таких некоторых вариантов осуществления, популяция, содержащая клетки и частицы вирусного вектора, представляет собой входную популяцию после объединения или смешивания вместе, независимо от того, объединены ли они или смешаны внутри или вне центрифужной камеры и/или предоставлены ли клетки и частицы вирусного вектора в центрифужную камеру вместе или по отдельности, например, одновременно или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления, потребление объема газа, такого как воздух, происходит до инкубации клеток и частиц вирусного вектора, например, при вращении в способе трансдукции. В некоторых вариантах осуществления, поглощение объема газа, такого как воздух, происходит во время инкубации клеток и частиц вирусного вектора, например, при вращении в способе трансдукции.

В некоторых вариантах осуществления, объем жидкости клеток или частиц вирусного вектора, составляющих популяцию для трансдукции, и, необязательно, объем воздуха, может быть заданным объемом. Объем может быть объемом, который запрограммирован и/или управляется схемой, связанной с системой.

В некоторых вариантах осуществления, поступление популяции трансдукции и, необязательно, газа, такого как воздух, регулируется вручную, полуавтоматически и/или автоматически до тех пор, пока желаемый или заданный объем не будет введен во внутреннюю полость камеры. В некоторых вариантах осуществления, датчик, связанный с системой, может обнаруживать поток жидкости и/или газа в центрифужную камеру и из нее, например, по цвету, скорости потока и/или плотности, и может связываться с соответствующей схемой для остановки или продолжения поглощения по мере необходимости, до тех пор, пока не будет достигнуто потребление такого желаемого или заданного объема. В некоторых аспектах, датчик, который запрограммирован или способен обнаруживать только жидкость в системе, но не газ (например, воздух), может обеспечивать прохождение газа, такого как воздух, в систему без прекращения поглощения. В некоторых таких вариантах осуществления, в линию рядом с датчиком может быть помещен непрозрачный кусок трубки, в то время как желателен поступление газа, такого как воздух. В некоторых вариантах осуществления, впуск газа, такого как воздух, можно регулировать вручную.

В аспектах предложенных способов, внутреннюю полость центрифужной камеры подвергают вращению с высокой скоростью. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется до, одновременно, после или с перерывами при поглощении вводимой жидкости и, необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется после поглощения вводимой жидкости и, необязательно, воздуха. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется путем центрифугирования центрифужной камеры при относительной центробежной силе на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток точно или примерно или, по меньшей мере, примерно 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g, 3500 g или 4000 g. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется центрифугированием с силой больше или примерно 1100 g, например, больше или примерно 1200 g, больше или примерно 1400 g, больше или примерно 1600 g, больше или примерно 1800 g, больше или примерно 2000 g, больше или примерно 2400 g, больше или примерно 2800 g, больше или примерно 3000 g или больше или примерно 3200 g. В конкретных вариантах осуществления, вращение посредством центрифугирования осуществляется с силой от 600 до 800 g. В конкретных вариантах осуществления, вращение посредством центрифугирования происходит с силой точно или примерно 693 г. В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется центрифугированием с силой точно или примерно 1600 g.

В некоторых вариантах газ, такой как воздух, в полости камеры выбрасывается из камеры. В некоторых вариантах осуществления, газ, такой как воздух, выбрасывается в контейнер, который функционально связан как часть закрытой системы с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления, контейнер представляет собой свободный или пустой контейнер. В некоторых вариантах осуществления, воздух, такой

как газ, из полости камеры выбрасывается через фильтр, функционально соединенный с внутренней полостью камеры через стерильную трубку. В некоторых вариантах осуществления, воздух выбрасывается с использованием ручных, полуавтоматических или автоматических процессов. В некоторых вариантах осуществления, воздух удаляют из камеры до, одновременно, периодически или после экспрессии выходной популяции, содержащей инкубированные клетки и частицы вирусного вектора, такие как клетки, в которых была начата трансдукция, или клетки, трансдуцированные вирусным вектором, из полости камеры.

В некоторых вариантах осуществления, трансдукция и/или другая инкубация осуществляется как часть непрерывного или полунепрерывного процесса. В некоторых вариантах осуществления, непрерывный процесс включает непрерывное поглощение клеток и частиц вирусного вектора, например, композиции для трансдукции (либо в виде одной уже существующей композиции, либо путем непрерывного поглощения в один и тот же сосуд, например полость, и тем самым смешивания, его частей) и/или непрерывное выдавливание или выпуск жидкости и, необязательно, выпуск газа (например, воздуха) из сосуда в течение, по меньшей мере, части инкубации, например, во время центрифугирования. В некоторых вариантах осуществления, непрерывное поглощение и непрерывный выпуск осуществляются, по меньшей мере, частично, одновременно. В некоторых вариантах осуществления, непрерывное поглощение происходит во время части инкубации, например во время части центрифугирования, и непрерывная экспрессия происходит во время отдельной части инкубации. Они могут чередоваться. Таким образом, непрерывное поглощение и выпуск при проведении инкубации могут позволить обрабатывать большой общий объем образца, например трансдуцировать.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация является частью непрерывного процесса, где способ включает, по меньшей мере, во время части инкубации, осуществление непрерывного поступления указанной композиции трансдукции в полость во время вращения камеры, и во время части инкубации, осуществление непрерывного выпуска жидкости и, необязательно, выпуска газа (например, воздуха) из полости через, по меньшей мере, одно отверстие во время вращения камеры.

В некоторых вариантах осуществления, полунепрерывную инкубацию проводят, чередуя введение композиции в полость, инкубацию, выпуск жидкости из полости и, необязательно, выпуск газа (например, воздуха) из полости, например, в выходной контейнер, и затем прием последующей (например, второй, третьей и т.д.) композиции, содержащей большее количество клеток и других реагентов для обработки, например, частиц вирусного вектора, и повторения процесса. Например, в некоторых вариантах осуществления, инкубация является частью полунепрерывного процесса, где способ включает, до инкубации, осуществление поступления композиции трансдукции в полость через указанное, по меньшей мере, одно отверстие, и после инкубации, осуществление выпуска жидкости из полости; осуществление поступления другой композиции трансдукции, содержащей клетки и частицы вирусного вектора, в указанную внутреннюю

полость; и инкубирование другой композиции для трансдукции в указанной внутренней полости в условиях, при которых указанные клетки в указанной другой композиции для трансдукции трансдуцируются или подвергаются трансдукции указанным вектором. Процесс может быть продолжен циклически в течение ряда дополнительных раундов. В этом отношении, полунепрерывные или непрерывные способы могут обеспечивать получение еще большего объема и/или большего количества клеток.

В некоторых вариантах осуществления, часть инкубации для трансдукции проводят в центрифужной камере, которую проводят в условиях, включающих вращение или центрифугирование.

В конкретных вариантах осуществления, трансдукция клеток вирусным вектором представляет собой или включает центрифужную инокуляцию, например, центрифугирование смеси, содержащей клетки и вирусные частицы. В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки и вирусные частицы, можно вращать, как правило, с относительно низкой силой или скоростью, такой как скорость ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно или, по меньшей мере, 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется при силе, например относительной центробежной силе, от или примерно от 100 g до 4000 g (например, при или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3500 g), измеренной, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости.

В некоторых вариантах осуществления, клетки центрифужно инокулируют с вирусным вектором при силе, например, относительной центробежной силе, от или от примерно 100 g и 4000 g, 200 g и 1,000 g, 500 g и 1200 g, 1000 g и 2000 g, 600 g и 800 g, 1200 g и 1800 g или 1500 g и 1800 g. В некоторых вариантах осуществления, клетки центрифужно инокулируют частицей вирусного вектора при, при, по меньшей мере, или при примерно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1200g, 1500 g, 1600g, 2000 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g или 3500 g. В некоторых вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором с силой точно или примерно 692 g или 693 g. В конкретных вариантах осуществления, клетки трансдуцируют или подвергают трансдукции вирусным вектором с силой точно или примерно 1600 g. В некоторых вариантах осуществления, сила представляет собой силу на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки центрифужно инокулируют, например, клеточную композицию, содержащую клетки и вирусный вектор, вращают в течение больше или примерно 5 минут, например, больше или примерно 10 минут, больше или примерно 15 минут, больше или примерно 20 минут, больше или примерно 30 минут, больше или примерно 45 минут, больше или примерно 60 минут, больше или

примерно 90 минут или больше или примерно 120 минут; или от или от примерно 5 минут до 120 минут, от 30 минут до 90 минут, от 15 минут до 60 минут, от 15 минут до 45 минут, от 30 минут до 60 минут или от 45 минут до 60 минут, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, клетки центрифужно инокулируют с вирусным вектором в течение точно или примерно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления, клетки центрифужно инокулируют с вирусным вектором в течение точно или примерно 60 минут.

В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции включает центрифужную инокуляцию, например, вращение или центрифугирование композиции для трансдукции и, необязательно, воздуха в центрифужной камере в течение больше или примерно 5 минут, например, больше или примерно 10 минут, больше или примерно 15 минут, больше или примерно 20 минут, больше или примерно 30 минут, больше или примерно 45 минут, больше или примерно 60 минут, больше или примерно 90 минут или больше или примерно 120 минут. В некоторых вариантах осуществления, композицию для трансдукции и, необязательно, воздух вращают или центрифугируют в центрифужной камере в течение больше 5 минут, но не больше 60 минут, не больше 45 минут, не больше 30 минут или не больше 15 минут. В конкретных вариантах осуществления, трансдукция включает вращение или центрифугирование в течение точно или примерно 60 минут.

В некоторых вариантах осуществления, способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции и, необязательно, воздуха в центрифужной камере в течение точно или примерно от 10 минут до 60 минут, от 15 минут до 60 минут, от 15 минут до 45 минут, от 30 минут до 60 минут или от 45 минут до 60 минут, каждый включительно, и при усилении на внутренней поверхности боковой стенки внутренней полости и/или на поверхностном слое клеток примерно или точно 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g или 3600 g. В конкретных вариантах осуществления, способ трансдукции включает вращение или центрифугирование композиции для трансдукции, например, клеток и частиц вирусного вектора, при или примерно при 1600 g в течение или в течение примерно 60 минут.

4 Число копий вектора (VCN)

В некоторых вариантах осуществления, геномная интеграция трансгенных последовательностей, таких как трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный рецептор, например, CAR, может быть оценена в клетках, полученных в связи с любым из предложенных способов конструирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, оценивают интегрированное число копий, которое представляет собой число копий трансгенной последовательности, интегрированной в хромосомную ДНК или геномную ДНК клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способы оценки геномной интеграции трансгенной последовательности включают отделение высокомолекулярных фракций дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), таких как виды ДНК, которые больше или

больше примерно 10 тысяч нуклеотидов (т.н.), от ДНК, выделенной из одной или нескольких клеток. В некоторых аспектах, такое разделение можно проводить такими способами, как гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE). В некоторых аспектах, одна или несколько клеток содержат или предположительно содержат, по меньшей мере, одну сконструированную клетку, содержащую трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, способы включают определение наличия, отсутствия или количества трансгенной последовательности, интегрированной в геном одной или нескольких клеток, например, с помощью количественных методов, таких как количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР), цифровая ПЦР (цПЦР) или капельная цифровая ПЦР (кцПЦР).

В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция в основном содержит большие молекулы ДНК, такие как хромосомная или геномная ДНК, и содержит небольшое количество или почти не содержит молекул меньше порогового значения размера, таких как плазмиды, не интегрированные фрагменты ДНК, линейные комплементарные ДНК (кДНК), аутоинтегранты, циклы длинных концевых повторов (LTR) или другие остаточные виды или молекулы, которые не были интегрированы в геном. В некоторых вариантах осуществления, путем определения присутствия, отсутствия или количества трансгенных последовательностей в высокомолекулярной фракции, обнаруженные трансгенные последовательности представляют собой такие, которые были интегрированы в геном сконструированной клетки, и сводит к минимуму обнаружение не интегрированных трансгенных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, размер которых превышает или превышает примерно 10 тысяч нуклеотидов (т.н.). В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, размер которых больше или больше примерно 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25 или 30 тысяч нуклеотидов (т.н.) или больше. В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция содержит молекулы ДНК, размер которых больше или больше примерно 10, 12,5, 15, 17,5 или 20 тысяч нуклеотидов (т.н.) или больше. В некоторых аспектах, высокомолекулярная фракция содержит геномную ДНК или фрагменты геномной ДНК и исключает или разделяет не интегрированные или остаточные виды нуклеиновых кислот, которые могут присутствовать в образце ДНК. В некоторых аспектах, фракция с высокой молекулярной массой, например, образцы ДНК, которые превышают пороговое значение, такое как примерно 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 25 или 30 тысяч нуклеотидов (т.н.) или больше. В некоторых вариантах осуществления, пороговое значение больше или больше примерно 10, 12,5, 15, 17,5 или 20 тысяч нуклеотидов (т.н.) или больше.

В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярная фракция отделяется или выделяется с использованием способа на основе электрофореза. В некоторых аспектах, электрофорез разделяет биомолекулы по заряду и/или размеру за счет подвижности через разделяющую матрицу в присутствии электрического поля. В

некоторых вариантах осуществления, системы электрофореза можно использовать для фракционирования, анализа и сбора конкретных анализируемых веществ, включая молекулы нуклеиновых кислот, в зависимости от размера или молекулярной массы. В некоторых аспектах, фракция представляет собой или включает подмножество множества молекул. В некоторых аспектах, фракция может быть определена или определена по размеру или молекулярной массе или, в некоторых аспектах, по любому физическому свойству, которое заставляет ее мигрировать с большей или меньшей скоростью, чем другие молекулы или фракции из множества, когда их заставляют мигрировать через буферную композицию по настоящему изобретению за счет силы электрического поля (т.е. электрофоретической подвижности).

В некоторых вариантах осуществления, высокомолекулярную фракцию отделяют или выделяют с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE). В некоторых аспектах, PFGE включает введение переменного градиента напряжения в систему электрофореза для улучшения разрешения более крупных молекул нуклеиновых кислот, таких как хромосомная или геномная ДНК. В некоторых аспектах, напряжение системы электрофореза периодически переключают между тремя направлениями: одно проходит через центральную ось геля и два проходят под углом 60 градусов в каждую сторону. В некоторых аспектах, иллюстративные системы и способы разделения или выделения молекул нуклеиновых кислот с помощью PFGE включают системы, описанные, например, в US 9599590; US 2017/0240882; или US 2017/0254774.

В некоторых аспектах, электрофорез, такой как PFGE, можно проводить с использованием аппарата или системы. В некоторых аспектах, аппарат или система представляет собой автоматизированную систему или высокопроизводительную систему. Примеры систем для проведения PFGE включают системы, описанные, например, в US 9599590; US 2017/0240882; или US 2017/0254774, или коммерчески доступные аппараты или системы, такие как Pippin Prep, Blue Pippin или Pippin HT (Sage Science); CHEF Mapper® XA System, CHEF-DR® III Variable Angle System, CHEF-DR II System (Bio-Rad); и Biometra Rotaphor 8 System (Analytik Jena AG).

В некоторых аспектах, типовые образцы для оценки включают нуклеиновую кислоту, олигонуклеотид, молекулу ДНК, молекулу РНК или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, образец может включать аминокислоту, пептид, белок или любую их комбинацию. В некоторых аспектах, образец может представлять собой лизат целых клеток или ДНК или белковую фракцию клеточного лизата, такого как клеточный лизат, сконструированный для адоптивной клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты из образцов могут включать геномную ДНК, двухцепочечную ДНК (дцДНК), одноцепочечную ДНК (оцДНК), кодирующую ДНК (или кДНК), матричную РНК (мРНК), короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), одноцепочечную РНК, двухцепочечную РНК (дцРНК), морфолино, молекулу РНК интерференции (РНКи), митохондриальную нуклеиновую кислоту, хлоропластную

нуклеиновую кислоту, вирусную ДНК, вирусную РНК и другие органеллы с отдельным генетическим материалом. В некоторых аспектах, нуклеиновые кислоты из образца могут также включать аналоги нуклеиновых кислот, которые содержат модифицированные, синтетические или не встречающиеся в природе нуклеотиды или структурные элементы или другие альтернативные/модифицированные химические соединения нуклеиновых кислот, такие как аналоги оснований, такие как инозин, интеркаляторы (патент США № 4,835,263) и связующие малых бороздок (патент США № 5,801,115).

В некоторых вариантах осуществления, перед выделением или разделением фракции с высокой или низкой молекулярной массой, образцы могут быть объединены с реагентом, который придает суммарный отрицательный заряд, денатурирует пептид или белок или расщепляет молекулу ДНК или РНК перед оценкой в системе электрофореза. В некоторых аспектах, образцы можно комбинировать с агентами, которые придают флуоресцентные, магнитные или радиоактивные свойства образцу или его фракциям с целью обнаружения. В некоторых примерах, образец двухцепочечной ДНК смешивают с бромидом этидия, наносят на кассету для электрофореза, и фракции образца обнаруживают с помощью сверхяркого зеленого светодиода.

В некоторых аспектах, система для разделения или выделения образцов нуклеиновых кислот, такая как система электрофореза, может быть автоматизирована и/или иметь высокую производительность. В некоторых аспектах, в системе электрофореза могут использоваться одноразовые расходные материалы или реагенты, такие как кассета для электрофореза.

В некоторых аспектах, определение присутствия, отсутствия или количества трансгенной последовательности можно проводить с использованием способов определения присутствия, отсутствия или количества последовательности нуклеиновой кислоты. В частности, для определения количества копий трансгенной последовательности в образце, содержащем ДНК, или в определенной фракции, такой как высокомолекулярная фракция, которую отделяют или выделяют из образцов, содержащих ДНК. В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества трансгенной последовательности включает определение количества копий, например, с использованием любого из приведенных ниже типовых анализов для количественного определения молекул нуклеиновой кислоты.

В некоторых аспектах, присутствие, отсутствие и/или количество конкретной последовательности можно определить с помощью зонда или праймера, которые могут специфически связывать или распознавать всю трансгенную последовательность или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, количество копий можно определить с помощью зондов, которые могут специфически обнаруживать часть трансгенной последовательности, или последовательностей праймеров, которые могут специфически амплифицировать часть трансгенной последовательности. В некоторых аспектах, последовательности зонда или праймера могут специфически обнаруживать, связывать или распознавать часть трансгенной последовательности, такую как часть трансгенной

последовательности, которая является гетерологичной, экзогенной или трансгенной по отношению к клетке. В некоторых вариантах осуществления, праймеры или зонды, используемые для кПЦР или других методов на основе нуклеиновых кислот, являются специфичными в отношении связывания, распознавания и/или амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок, и/или другие компоненты или элементы плазмиды и/или вектора, включая регуляторные элементы, например промоторы, транскрипционные и/или пост-транскрипционные регуляторные элементы или элементы ответа, или маркеры, например суррогатные маркеры. В некоторых аспектах, зонды или праймеры можно использовать для типовых способов определения наличия, отсутствия и/или количества трансгенных последовательностей, таких как количественная ПЦР (кПЦР), цифровая ПЦР (цПЦР) или капельная цифровая ПЦР (кцПЦР).

В некоторых аспектах, определение присутствия, отсутствия или количества включает определение количества трансгенной последовательности, например определение массы, веса, концентрации или количества копий трансгенных последовательностей, в одной или нескольких клетках или в биологическом образце, содержащем одну или несколько клеток. В некоторых аспектах, определение наличия, отсутствия или количества последовательности нуклеиновой кислоты, или оценка массы, веса, концентрации или числа копий трансгенных последовательностей можно проводить в части клеточной популяции или части биологического образца, и их можно нормализовать, усреднить и/или экстраполировать для определения присутствия, отсутствия или количества во всем образце или во всей клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, определение присутствия, отсутствия или количества трансгенной последовательности включает определение массы, веса, концентрации или числа копий трансгенной последовательности на диплоидный геном или на клетку в одной или нескольких клетках. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько клеток содержат популяцию клеток, в которой множество клеток популяции содержат трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, число копий представляет собой среднее или среднее число копий на диплоидный геном или на клетку среди клеточной популяции.

В некоторых аспектах, определение количества копий включает определение количества копий трансгенных последовательностей, присутствующих в одной или нескольких клетках, или в биологическом образце. В некоторых аспектах, количество копий может быть выражено как среднее или среднее количество копий. В некоторых аспектах, количество копий конкретного интегрированного трансгена включает количество интегрантов (содержащих трансгенные последовательности) на клетку. В некоторых аспектах, количество копий конкретного интегрированного трансгена включает количество интегрантов (содержащих трансгенные последовательности) на диплоидный геном. В некоторых аспектах, количество копий трансгенной

последовательности выражается как количество интегрированных трансгенных последовательностей на клетку. В некоторых аспектах, количество копий трансгенной последовательности выражается как количество интегрированных трансгенных последовательностей на диплоидный геном. В некоторых аспектах, одна или несколько клеток содержат популяцию клеток, в которой множество клеток популяции содержат трансгенную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, число копий представляет собой среднее или среднее число копий на диплоидный геном или на клетку среди клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, определение количества трансгенной последовательности включает оценку массы, веса, концентрации или числа копий трансгенной последовательности на одну или больше клеток, необязательно, на CD3+, CD4+ и/или CD8+ клетку, и/или на клетку экспрессирующую рекомбинантный белок. В некоторых аспектах, поверхностные маркеры или фенотипы, экспрессированные на клетке, можно определить с использованием способов на клеточной основе, таких как проточная цитометрия или иммуноокрашивание. В некоторых аспектах, клетки, экспрессирующие рекомбинантный белок, можно определить с использованием методов на клеточной основе, таких как проточная цитометрия или иммуноокрашивание, например, с использованием анти-идиотипического антитела или окрашивание на суррогатный маркер. В некоторых аспектах, количество трансгенных последовательностей может быть нормализовано по количеству конкретных клеток, таких как клетки CD3+, CD4+ и/или CD8+, и/или на клетку, экспрессирующую рекомбинантный белок, или на общее количество клеток, например, на общее количество клеток в образце или на общее количество клеток, подвергшихся технологическому процессу.

В некоторых вариантах осуществления, определенное число копий выражается как нормализованное значение. В некоторых вариантах осуществления, определенное количество копий количественно определяется как количество копий трансгенной последовательности на геном или на клетку. В некоторых аспектах, значение на геном выражается как копия последовательности трансгена на диплоидный геном, поскольку типовая соматическая клетка, такая как Т-клетка, содержит диплоидный геном. В некоторых аспектах, определенное число копий может быть нормализовано относительно числа копий известного эталонного гена в геноме клетки. В некоторых аспектах, эталонным геном является RRP30 (кодирующий субъединицу р30 белка Р рибонуклеазы) или 18S рРНК (18S рибосомная РНК), 28S рРНК (28S рибосомная РНК), TUBA (α -тубулин), ACTB (β -актин), β 2M (β 2-микроглобулин), ALB (альбумин), RPL32 (рибосомный белок L32), TBP (белок, связывающий последовательность ТАТА), CYCC (циклофилин С), EF1A (фактор элонгации 1 α), GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), HPRT (гипоксантинфосфорибозилтрансфераза) или RPII (РНК-полимераза II). В некоторых вариантах осуществления, определенное количество копий определяется как количество копий трансгенной последовательности на микрограмм ДНК.

В некоторых аспектах, число копий представляет собой среднее, среднее или медианное число копий для множества или популяции клеток, например, множества или популяции сконструированных клеток. В некоторых аспектах, число копий представляет собой среднее или среднее число копий для множества или популяции клеток, например множества или популяции сконструированных клеток. В некоторых аспектах, среднее или среднее число копий определяют из множества или популяции клеток, например множества или популяции клеток, подвергающихся одной или нескольким стадиям конструирования или производственного процесса, или в клеточной композиции, такой как клеточная композиция для введения субъекту. В некоторых аспектах, нормализованное среднее число копий определяют, например, как среднее или среднее число копий трансгенных последовательностей, нормализованных к эталонному гену, такому как известный ген, который присутствует в двух копиях в диплоидном геноме. В некоторых аспектах, нормализация по эталонному гену, который обычно присутствует в двух копиях на диплоидный геном, может соответствовать количеству копий в клетке, такой как диплоидная клетка. Таким образом, в некоторых аспектах, нормализованное среднее или среднее число копий может соответствовать среднему или среднему числу копий обнаруженных трансгенных последовательностей среди множества или популяции клеток, например, Т-клеток, которые обычно имеют диплоидный геном.

В некоторых вариантах осуществления, определение наличия, отсутствия или количества трансгенной последовательности осуществляют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления, ПЦР представляет собой количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР), цифровую ПЦР или капельную цифровую ПЦР, такую как любая из описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления, наличие, отсутствие или количество трансгенной последовательности определяют с помощью цифровой капельной ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, ПЦР проводят с использованием одного или нескольких праймеров, комплементарных или способных специфически амплифицировать, по меньшей мере, часть трансгенной последовательности, и в некоторых случаях, одного или нескольких праймеров, комплементарных или способных специфически амплифицировать, по меньшей мере, часть эталонного гена.

В некоторых аспектах, кПЦР можно использовать для обнаружения накопления продукта амплификации, измеряемого по ходу реакции, в режиме реального времени, с количественным определением продукта после каждого цикла. Таким образом, в некоторых аспектах, кПЦР можно использовать для определения числа копий конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, такой как последовательность трансгена, в образце. В некоторых аспектах, кПЦР использует флуоресцентную репортерную молекулу в каждой реакционной лунке, что дает повышенную флуоресценцию с увеличением количества ДНК продукта. В некоторых аспектах, используемые флуоресцентные химические вещества включают ДНК-связывающие красители и флуоресцентно меченные сиквенс-специфичные праймеры или зонды. В некоторых

аспектах, в кПЦР использует специализированный термоциклер, способный освещать каждый образец на определенной длине волны и обнаруживать флуоресценцию, испускаемую возбужденным флуорофором. В некоторых аспектах, измеренная флуоресценция пропорциональна общему количеству ампликона; изменение флуоресценции во времени используется для расчета количества ампликона, продуцируемого в каждом цикле.

В некоторых вариантах осуществления, цПЦР представляет собой способ обнаружения и количественного определения нуклеиновых кислот, который позволяет проводить точный количественный анализ и высокочувствительное обнаружение молекулы нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых аспектах, цРЦР включает предельное разведение ДНК в последовательности отдельных реакций ПЦР (или разделений). В некоторых аспектах, предельное разведение может использовать принципы разделения с помощью химии нанофлюидики и эмульсий, основанные на случайном распределении оцениваемой матричной нуклеиновой кислоты, например трансгенных последовательностей, и статистике Пуассона для измерения количества ДНК, присутствующей в данной пропорции положительных разделений. В некоторых аспектах, цПЦР обычно является линейной и чувствительной, способной обнаруживать или количественно определять очень небольшие количества ДНК. В некоторых аспектах, цПЦР позволяет проводить абсолютную количественную оценку образца ДНК с использованием способа подсчета отдельных молекул без стандартной кривой, и абсолютную количественную оценку можно получить с помощью ПЦР для одного разделения на лунку (см. Pohl et al., (2004) *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4(1), 41-47).

Типовые коммерчески доступные аппараты или системы для цПЦР включают цифровую систему ПЦР Raindrop™ Digital PCR System (Raindance™ Technologies); QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad); BioMark™ HD System and qdPCR 37K™ IFC (Fluidigm Corporation) и QuantStudio™ 3D Digital PCR System (Life Technologies™) (см., например, Huggett et al. (2013) *Clinical Chemistry* 59: 1691-1693; Shuga, et al. (2013) *Nucleic Acids Research* 41(16): e159; Whale et al. (2013) *PLoS One* 3: e58177).

В некоторых вариантах осуществления, присутствие, отсутствие или количество трансгенных последовательностей, таких как трансгенные последовательности, кодирующие рекомбинантный белок, для интеграции в геном сконструированной клетки определяют с помощью капельной цифровой полимеразной цепной реакции (кцПЦР). кцПЦР представляет собой тип цифровой ПЦР, в котором раствор ПЦР делится или разделяется на больше мелкие реакции с помощью химии водно-масляной эмульсии с образованием множества капель. В некоторых аспектах, для получения капель воды в масле можно использовать определенные поверхностно-активные вещества. (см., например, Hindson et al., (2011) *Anal Chem* 83(22): 8604-8610; Pinheiro et al., (2012) *Anal Chem* 84, 1003-1011). В некоторых аспектах, каждую отдельную каплю впоследствии запускают как отдельную реакцию. В некоторых аспектах, образец ПЦР разделяют на образцы размером в нанолитр и инкапсулируется в капли масла. В некоторых аспектах,

капли масла создаются с использованием генератора капель, который создает вакуум в каждой из лунок. В типовом случае, примерно 20000 капель масла для отдельных реакций могут быть получены из образца объемом 20 мкл.

В некоторых аспектах, способы оценки интегрированного количества копий могут выполняться в различные моменты времени для определения и сравнения сроков, степени или прогресса генной инженерии, такой как интеграция введенных трансгенных последовательностей в геном клетки, в которую вводятся трансгенные последовательности. В некоторых аспектах, способы могут осуществляться на различных стадиях процесса конструирования или производства сконструированных клеточных композиций, таких как любой из описанных процессов. Например, предложенные способы могут выполняться на различных стадиях процесса конструирования с размножением или процесса конструирования без размножения.

В некоторых аспектах, клетки, сконструированные предложенными способами, оценивают на геномную интеграцию трансгенной последовательности, такой как кодирование рекомбинантного рецептора, например, CAR, с использованием анализов количества копий вектора, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение высокомолекулярной фракции размером больше или больше примерно 10 тысяч нуклеотидов (т.н.) из дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из клетки, где перед разделением в клетку вводят полинуклеотид, содержащий трансгенную последовательность в условиях интеграции трансгенной последовательности в геном клетки, например, путем вирусной трансдукции; и определение наличия, отсутствия или количества трансгенной последовательности в высокомолекулярной фракции.

5. Инкубация

В некоторых вариантах осуществления, способы создания сконструированных клеток, например, для клеточной терапии в соответствии с любым из предложенных способов, применений, изделий или композиций, включают одну или несколько стадий инкубации клеток в условиях, которые не способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях, которые не способствуют пролиферации и/или размножению после стадии генетического конструирования, например введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют после инкубации клеток в стимулирующих условиях и трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, композицию CAR-положительных Т-клеток, сконструированную путем трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим CAR, инкубируют в условиях, которые не способствуют пролиферации и/или размножению.

В конкретных вариантах осуществления, генная инженерия, например, путем трансформации (например, трансдукции) клеток вирусным вектором, дополнительно

включает одну или несколько стадий инкубации клеток после введения или контакта клеток с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например клетки трансформированной клеточной популяции (также называемые «трансформированными клетками»), инкубируют после процессов генетического конструирования, трансформации, трансдукции или трансфекции клеток для введения вирусного вектора в клетки. В конкретных вариантах осуществления, инкубация дает популяцию инкубированных клеток (также называемую в настоящем документе популяцией инкубированных клеток).

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют после введения гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида, например вирусной векторной частицы, без дальнейшей обработки клеток. В конкретных вариантах осуществления, перед инкубацией клетки промывают, например, для удаления или по существу удаления экзогенных или оставшихся полинуклеотидов, кодирующих гетерологичный или рекомбинантный полинуклеотид, например частиц вирусного вектора, таких, как оставшиеся в среде после процесса генетического конструирования, следующего за центрифужной инокуляцией.

В некоторых таких вариантах осуществления, дальнейшую инкубацию проводят в условиях, обеспечивающих интеграцию вирусного вектора в геном одной или нескольких клеток-хозяев. Например, дальнейшая инкубация дает вирусному вектору время, которое может быть связано с Т-клетками после трансдукции, например, посредством центрифужной инокуляции, для интеграции в геном клетки для доставки представляющего интерес гена. В некоторых аспектах, дальнейшую инкубацию проводят в условиях, позволяющих клеткам, например, трансформированным клеткам, отдыхать или восстанавливаться, где культура клеток во время инкубации поддерживает или сохраняет здоровье клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в статических условиях, таких как условия, которые не включают центрифугирование, встряхивание, вращение, раскачивание или перфузию, например, непрерывную или полунепрерывную перфузию среды.

Специалист в данной области техники может оценить или определить, привела ли инкубация к интеграции частиц вирусного вектора в геном хозяина, и, следовательно, эмпирически определить условия для дальнейшей инкубации. В некоторых вариантах осуществления, интеграцию вирусного вектора в геном хозяина можно оценить путем измерения уровня экспрессии рекомбинантного белка, такого как гетерологичный белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащейся в геноме частицы вирусного вектора, после инкубации. Можно использовать ряд хорошо известных способов оценки уровня экспрессии рекомбинантных молекул, таких как обнаружение с помощью способов на основе аффинности, например, способов на основе иммуноаффинности, например, в контексте белков клеточной поверхности, таких как проточная цитометрия. В некоторых примерах, экспрессию измеряют путем обнаружения маркера трансдукции и/или репортерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота,

кодирующая усеченный поверхностный белок, включена в вектор и используется в качестве маркера его экспрессии и/или усиления.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в статических условиях, таких как условия, которые не включают центрифугирование, встряхивание, вращение, раскачивание или перфузию, например, непрерывную или полунепрерывную перфузию среды. В некоторых вариантах осуществления, либо до, либо вскоре после, например, в течение 5, 15 или 30 минут от начала инкубации, клетки переносят (например, переносят в стерильных условиях) в контейнер, такой как пакет или флакон, и помещают в инкубатор.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации проводят во внутренней полости центрифужной камеры, как описано в международной публикации № WO 2016/073602.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, в которые был введен полинуклеотид, кодирующий гетерологичный или рекомбинантный полипептид, например, вирусные векторы, переносят в контейнер для инкубации. В некоторых вариантах осуществления, контейнер представляет собой флакон. В конкретных вариантах осуществления, контейнер представляет собой пакет. В некоторых вариантах осуществления, клетки и необязательно гетерологичный или рекомбинантный полипептид переносят в контейнер в закрытых или стерильных условиях. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, например, флакон или пакет, затем помещают в инкубатор для всей или части инкубации. В конкретных вариантах осуществления, инкубатор устанавливается на температуру точно, примерно или, по меньшей мере, 16°C, 24°C или 35°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубатор установлен на 37°C, примерно на 37°C или на 37°C \pm 2°C, \pm 1°C, \pm 0,5°C или \pm 0,1°C.

В некоторых аспектах, условия инкубации могут включать одну или несколько конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание диоксида углерода, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой определенную и/или четко определенную среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда представляет собой контролируемую культуральную среду, которая была обработана, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления.

В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии одного

или нескольких цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для них. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов из пучков 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов из группы 4-альфа-спиралей включают, но не ограничены ими, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой IL-15 или включают его. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают IL-7. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2.

В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах осуществления, IL-2, IL-7 и/или IL-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии рекомбинантных IL-2, IL-7 и IL-15.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют с цитокином, например, рекомбинантным цитокином человека, в концентрации от 1 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 250 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ /мл и 1000 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют с IL-2, например, рекомбинантным IL-2 человека, в концентрации от 1 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 125 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-2 в концентрации, равной точно или примерно 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл, или 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или примерно 100 МЕ/мл рекомбинантного IL-2, например рекомбинантного IL-2 человека.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным ИЛ-7, например, рекомбинантным ИЛ-7 человека, в концентрации от 100 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 750 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл или от 550 МЕ/мл до 650 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют с ИЛ-7 в концентрации точно или примерно 50 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 200 МЕ/мл, 250 МЕ/мл, 300 МЕ/мл, 350 МЕ/мл, 400 МЕ/мл, 450 МЕ/мл, 500 МЕ/мл, 550 МЕ/мл, 600 МЕ/мл, 650 МЕ/мл, 700 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 800 МЕ/мл, 750 МЕ/мл, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или примерно 600 МЕ/мл ИЛ-7.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным ИЛ-15, например, рекомбинантным ИЛ-15 человека, в концентрации от 1 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 125 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл или от 10 МЕ/мл и 100 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным ИЛ-15 в концентрации точно или примерно 50 МЕ/мл, 60 МЕ/мл, 70 МЕ/мл, 80 МЕ/мл, 90 МЕ/мл, 100 МЕ/мл, 110 МЕ/мл, 120 МЕ/мл, 130 МЕ/мл, 140 МЕ/мл, 150 МЕ/мл, 160 МЕ/мл, 170 МЕ/мл, 180 МЕ/мл, 190 МЕ/мл или 200 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или примерно 100 МЕ/мл рекомбинантного ИЛ-15, например рекомбинантного ИЛ-2 человека.

В конкретных вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют в присутствии ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления, ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются рекомбинантными. В некоторых вариантах осуществления, ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 являются человеческими. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают рекомбинантный ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии рекомбинантных ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15.

В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, процесса без размножения, проводят в среде, содержащей минимальную среду (например, минимальную среду CTS OpTmizer (ThermoFisher)), глутамин и один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления, среда может содержать один или несколько дополнительных компонентов. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов могут включать дипептидную форму L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных компонентов обеспечиваются дополнительной добавкой, например добавкой OpTmizer® (ThermoFisher). В некоторых вариантах осуществления, среда представляет собой бессывороточную среду и не содержит какой-

либо компонент сыворотки. В некоторых аспектах, среда может содержать один или несколько замещающих сыворотку белков, таких как один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина (например, CTS™ Immune Cell Serum Replacement).

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в присутствии такой же или подобной среды, которая присутствовала во время стимуляции клеток, например, проводимой в связи со способами или процессами стимуляции, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в средах, содержащих те же самые цитокины, что и среды, присутствующие во время стимуляции клеток, например, проводимой в связи со способами или процессами стимуляции, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в средах, содержащих те же цитокины в тех же концентрациях, что и среда, присутствующая во время стимуляции клеток, например, проводимой в связи со способами или процессами стимуляции, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие одного или нескольких цитокинов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие всех описанных в настоящем документе цитокинов.

В некоторых аспектах, дальнейшую инкубацию проводят в условиях, позволяющих клеткам отдыхать или восстанавливаться, которые не включают наличие стимулирующих условий, например, в форме рекомбинантных цитокинов или других стимулирующих агентов. Например, инкубацию проводят в присутствии обедненной среды, достаточной для поддержания или сохранения культуры здоровья клеток во время инкубации.

В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации проводят в минимальной среде, такой как минимальная среда без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов или без какого-либо рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, среда не содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека. В некоторых аспектах, инкубацию проводят без каких-либо рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда дополнена дополнительными добавками. В некоторых вариантах минимальная среда не дополняется какими-либо дополнительными добавками. Добавки к средам для культивирования клеток могут включать, но не ограничены ими, питательные вещества, сахара, например глюкозу, аминокислоты, витамины или добавки, такие как АТФ и NADH. Другие добавки также могут быть добавлены, но, как правило, конкретные добавки и количества таковы, что инкубация среды с клетками облегчает поддержание клеток, но сводит к минимуму, ограничивает и/или не индуцирует метаболическую активность клеток во время инкубации.

В конкретных вариантах осуществления, среда представляет собой минимальную среду, не содержащую один или несколько рекомбинантных цитокинов и не содержащую сывороточный компонент, т.е. бессывороточную среду, но может содержать один или

несколько дополнительных компонентов. В конкретных вариантах осуществления, использование такой бессывороточной среды во время всей инкубации или ее части, например, в процессе без размножения, дает обедненную среду, которая обеспечивает поддержание клеток, но не включает определенные факторы, которые могут активировать или делать клетки метаболически активными, тем самым переводя клетки в состояние, которое является или может быть состоянием покоя или заторможенности. В некоторых аспектах, инкубация в присутствии такой бессывороточной среды позволяет клеткам восстанавливаться или отдыхать после стимуляции и генной инженерии (например, трансдукции). В некоторых аспектах, инкубация в присутствии такой бессывороточной среды дает выходную композицию, содержащую клетки, менее подверженные повреждению или потере жизнеспособности, например, во время или после производственного процесса, когда собранные/составленные клетки криоконсервируют и затем размораживают непосредственно перед использованием. В некоторых вариантах осуществления, клетки в выходной композиции при размораживании имеют больше низкие уровни каспазы или другого маркера апоптоза, чем клетки, инкубированные в аналогичной среде, но содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, сыворотку или другие факторы, которые могут сделать клетки больше метаболически активными при криоконсервации выходной композиции.

В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов или других хорошо известных питательных веществ для клеточных культур. В дополнение к питательным веществам, среда также помогает поддерживать pH и осмоляльность. В некоторых аспектах, реагенты минимальной среды поддерживают рост, пролиферацию и/или размножение клеток. Специалистам в данной области техники хорошо известно большое разнообразие имеющихся в продаже минимальных сред, включая модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM), среду Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), модифицированную по Искову среду Дульбекко и среду Хэмса. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда представляет собой модифицированную по Искову среду Дульбекко, RPMI-1640 или α -MEM.

В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда представляет собой сбалансированный солевой раствор (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда выбрана из модифицированной по Дульбекко среды Игла (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), минимальной среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной питательной среды Глазго (GMEM), минимальной питательной среды альфа (альфа MEM), модифицированной по Искову среды Дульбекко и M199. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда представляет собой комплексную среду (например, RPMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда представляет собой минимальную среду для размножения T-клеток OpTmizer™ CTST™ (ThermoFisher).

В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит белок. В

некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит белок человека (например, белок сыворотки человека). В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит сыворотку крови человека. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит человеческий белок и рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда не содержит один или несколько или все цитокины, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, процесса без размножения, проводят в минимальной среде без каких-либо дополнительных добавок или рекомбинантных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда представляет собой минимальную среду CTS OpTmizer (Thermofisher) без каких-либо дополнительных добавок или рекомбинантных цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, процесса без размножения, проводят в среде, содержащей минимальную среду и глутамин, например, минимальную среду CTS OpTmizer (Thermofisher) с глутамином.

В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации, например, процесса без размножения, проводят в среде, содержащей минимальную среду (например, минимальную среду CTS OpTmizer (Thermofisher)) без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, таких как как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, среда дополнена одним или несколькими дополнительными не сывороточными компонентами. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько добавок является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнительно содержит свободную форму аминокислоты, такой как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит замещающую сыворотку добавку. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит дипептидную форму L-глутамин (например, L-аланил-L-глутамин). В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда не содержит никакой рекомбинантный цитокин. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду, дополненную T-клеточной добавкой и свободной формой L-глутамин, и не содержит какую-либо замену сыворотки иммунных клеток, какую-либо дипептидную форму L-глутамин или любого рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например, минимальную среду для размножения T-клеток OpTmizer™), L-глутамин и один или несколько дополнительных компонентов, таких как добавки (например, добавку для размножения T-клеток OpTmizer™).

В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или примерно $0,25 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, $0,75 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток /мл, $1,25 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,75 \times 10^6$ клеток/мл

или $2,0 \times 10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или примерно $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, инкубация проводится в течение точно или примерно от 18 часов до 30 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубация проводится в течение точно или примерно 24 часов или в течение точно или примерно одного дня. В некоторых вариантах осуществления, инкубация проводится в течение точно или примерно 48 часов или 72 часов, или в течение точно или примерно 2 дней или 3 дней, соответственно. В конкретных вариантах осуществления, инкубация проводится в течение точно или примерно 24 часов \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часов \pm 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубация проводится в течение точно или примерно 72 часов, 72 ± 4 часов или примерно 3 дней, например, в течение этого времени клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или примерно $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, всю или часть инкубации проводят в бессывороточной среде, содержащей минимальную среду (например, минимальную среду CTS OpTmizer (ThermoFisher)) без одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-7 человека и/или рекомбинантный IL-15 человека. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда дополнена L-глутамином и/или одной или несколькими клеточными добавками, например добавкой для размножения T-клеток OpTmizer™, но не содержит заменители сыворотки иммунных клеток, любую дипептидную форму L-глутамин или любой рекомбинантный цитокин.

В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие какого-либо рекомбинантного цитокина. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в отсутствие одного или нескольких рекомбинантных цитокинов, таких как рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15.

В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда дополнительно содержит глутамин, такой как L-глутамин. В некоторых аспектах, глутамин представляет собой свободную форму глутамин, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамин, такого как L-глутамин, в минимальной среде составляет примерно или меньше примерно 0,5мМ-1мМ, 0,5мМ-1,5мМ, 0,5мМ-2мМ, 0,5мМ-2,5мМ, 0,5мМ-3мМ, 0,5мМ-3,5мМ, 0,5мМ-4мМ, 0,5мМ-4,5мМ, 0,5мМ-5мМ, 1мМ-1,5мМ, 1мМ-2мМ, 1мМ-2,5мМ, 1мМ-3мМ, 1мМ-3,5мМ, 1мМ-4мМ, 1мМ-4,5мМ, 1мМ-5мМ, 1,5мМ-2мМ, 1,5мМ-2,5мМ, 1,5мМ-3мМ, 1,5мМ-3,5мМ, 1,5мМ-4мМ, 1,5мМ-4,5мМ, 1,5мМ-5мМ, 2мМ-2,5мМ, 2мМ-3мМ, 2мМ-3,5мМ, 2мМ-4мМ, 2мМ-4,5мМ, 2мМ-5мМ, 2,5мМ-3мМ, 2,5мМ-3,5мМ, 2,5мМ-4мМ, 2,5мМ-4,5мМ, 2,5мМ-5мМ, 3мМ-3,5мМ, 3мМ-4мМ, 3мМ-4,5мМ, 3мМ-5мМ, 3,5мМ-4мМ, 3,5мМ-4,5мМ, 3,5мМ-5мМ, 4мМ-4,5мМ, 4мМ-5мМ или 4,5мМ-5мМ, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамин, такого как L-глутамин, в минимальной среде составляет, по меньшей мере, примерно 0,5 мМ, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5

мМ или 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамин, такого как L-глутамин, в минимальной среде составляет не больше примерно 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамин, такого как L-глутамин, в минимальной среде составляет примерно 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления, минимальная среда может дополнительно содержать белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один белок имеет происхождение не от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один белок является человеческим или происходит от человека. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой альбумин или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой альбумин человеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой природный сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления, альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин нечеловеческого происхождения. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких образцов белков или полипептидов включают, но не ограничены ими, экстракт гипофиза крупного рогатого скота, гидролизат растений (например, гидролизат риса), эмбриональный альбумин теленка (фетуин), яичный альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA) или другие альбумины животного происхождения, экстракт цыпленка, экстракт эмбриона крупного рогатого скота, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит трансферрин. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит фибронектин. В некоторых вариантах осуществления, белок или пептид содержит апротинин. В некоторых вариантах осуществления, белок содержит фетуин.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных белков являются частью добавки для замещения сыворотки, которую добавляют к минимальной среде. Примеры добавок для замены сыворотки включают, например, замену сыворотки иммунных клеток (ThermoFisher, #A2598101) или добавки, описанные Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют после введения полинуклеотида, кодирующего гетерологичный или рекомбинантный белок, например, вирусный вектор, в течение, в течение примерно или в течение, по меньшей мере, 18

часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 40 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часов, 96 часов или больше 96 часов. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют после введения полинуклеотида, кодирующего гетерологичный или рекомбинантный белок, например, вирусный вектор, в течение, в течение примерно или в течение, по меньшей мере, одного дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней или больше 4 дней. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение времени от 30 минут до 2 часов, от 1 часа до 8 часов, от 6 часов до 12 часов, от 12 часов до 18 часов, от 16 часов до 24 часов, от 18 часов до 30 часов, от 24 часов до 48 часов, от 24 часов до 72 часов, от 42 часов до 54 часов, от 60 часов до 120 часов, от 96 часов до 120 часов, от 90 часов и от 1 дня до 7 дней, от 3 дней до 8 дней, от 1 дня до 3 дней, от 4 дней до 6 дней или от 4 дней до 5 дней до генетического конструирования. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение или в течение примерно от 18 часов до 30 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение или в течение примерно 24 часов или в течение или в течение примерно одного дня.

В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет, составляет примерно или составляет, по меньшей мере, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 30 часов, 36 часов, 42 часа, 48 часов, 54 часа, 60 часов, 72 часа, 84 часа, 96 часов, 108 часов или 120 часов. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет, составляет примерно или составляет, по меньшей мере, один день, 2 дня, 3 дня, 4 дня или 5 дней. В конкретных вариантах осуществления, инкубация завершается через, через примерно или в течение 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часа, 72 часа, 60 часов, 54 часа, 48 часов, 42 часа, 36 часов, 30 часов, 24 часа, 18 часов или 12 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубация завершается через, через примерно или в течение дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет от или примерно от 12 часов до 120 часов, от 18 часов до 96 часов, от 24 часов до 72 часов или от 24 часов до 48 часов, включительно. В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации составляет от или примерно от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, включительно. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение или в течение примерно 24 часов, 48 часов или 72 часов, или в течение или в течение примерно 1 дня, 2 дней или 3 дней, соответственно. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение 24 часов \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часов \pm 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение или в течение примерно 72 часов или в течение или в течение примерно 3 дней.

В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, через примерно или через, по меньшей мере, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 30 часов, 36 часов, 42 часа, 48 часов после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, через примерно или через, по меньшей мере, 0,5 дня, один день, 1,5 дня или 2 дня после начала стимуляции. В конкретных вариантах

осуществления, инкубацию начинают через, через примерно или через, по меньшей мере, 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часа, 72 часа, 60 часов, 54 часа, 48 часов, 42 часа, 36 часов, 30 часов, 24 часа, 18 часов или 12 часов от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию начинают через, через примерно или через, по меньшей мере, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня, 1 день или 0,5 дня после начала стимуляции.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается между или между примерно 24 часами и 120 часами, 36 часами и 108 часами, 48 часами и 96 часами или 48 часами и 72 часами, включительно, после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается через, примерно через или в течение 120 часов, 108 часов, 96 часов, 72 часов, 48 часов или 36 часов после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается через, примерно через или в течение 5 дней, 4,5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1,5 дней после начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, инкубация завершается через 24 часа \pm 6 часов, 48 часов \pm 6 часов или 72 часа \pm 6 часов после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается через или примерно через 72 часа или через или примерно через 3 дня.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, достаточного для интеграции гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида в геном. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, достаточного, по меньшей мере, для интегрированного числа копий вируса (iVCN), равного точно, примерно или, по меньшей мере, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 или больше 5 на диплоидный геном. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение времени, достаточного, по меньшей мере, для iVCN, равного точно, примерно, или, по меньшей мере, 0,5 или 1. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение времени, достаточного для стабильной интеграции гетерологичного или рекомбинантного полинуклеотида в геном. В конкретных вариантах осуществления, гетерологичный или рекомбинантный полинуклеотид считается стабильно интегрированным, если iVCN на диплоидный геном не изменяется больше на 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или 0,1% в течение определенного периода времени, например, по меньшей мере, 12, 24 или 48 часов. В конкретных вариантах осуществления, инкубация завершается до стабильной интеграции.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию осуществляют или проводят, по меньшей мере, до тех пор, пока интегрированный вектор не будет обнаружен в геноме. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до достижения стабильного интегрированного числа копий вектора (iVCN) на диплоидный геном. В конкретных вариантах осуществления, инкубацию осуществляют или проводят, по меньшей мере, до тех пор, пока интегрированный вектор не будет обнаружен в геноме, но до достижения стабильного iVCN на диплоидный геном. В некоторых вариантах осуществления, стабильное iVCN на диплоидный геном достигается, когда iVCN достигает максимума и/или остается неизменным, или не изменяется в пределах

допустимой ошибки в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления, допустимая ошибка составляет, составляет в пределах или составляет примерно $\pm 40\%$, $\pm 35\%$, $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ или меньше $\pm 1\%$. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет, составляет примерно или составляет, по меньшей мере, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 60 часов, или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет, составляет примерно или составляет, по меньшей мере, один день, 2 дня или 3 дня. В некоторых вариантах осуществления, стабильное iVCN на диплоидный геном достигается, когда iVCN достигает максимума и остается неизменным или не изменяется в пределах допустимой ошибки, например, $\pm 25\%$, в течение периода времени, который составляет, составляет примерно или составляет, по меньшей мере, 24 часа или один день. В некоторых вариантах осуществления, стабильное iVCN на диплоидный геном достигается, когда отношение iVCN к общему числу копий вектора (VCN) в диплоидном геноме популяции трансформированных клеток в среднем составляет, составляет, по меньшей мере, или составляет примерно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5, или находится в пределах допустимой ошибки, например, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$. В некоторых вариантах осуществления, стабильное iVCN на диплоидный геном достигается, когда отношение iVCN к общему количеству копий вектора (VCN) в диплоидном геноме популяции трансформированных клеток в среднем составляет или составляет примерно 0,8, или находится в пределах допустимой ошибки. В некоторых вариантах осуществления, стабильное iVCN на диплоидный геном достигается, когда отношение iVCN к общему числу копий вектора (VCN) в диплоидном геноме популяции трансформированных клеток в среднем составляет или составляет примерно 1,0, или находится в пределах допустимой ошибки.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как iVCN достигает, достигает примерно или достигает, по меньшей мере, 5,0, 4,0, 3,0, 2,5, 2,0, 1,75, 1,5, 1,25, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 или 0,25 копий на диплоидный геном. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как iVCN достигает или примерно 1,0 копии на диплоидный геном. В конкретных вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как iVCN достигает или примерно 0,5 копий на диплоидный геном.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают до, примерно до или до, по меньшей мере, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или больше удвоенной клеточной популяции, например, удвоенной которые возникают во время инкубации. В конкретных вариантах осуществления, количество удвоенных клеток можно рассчитать путем измерения количества жизнеспособных клеток в популяции в разные моменты времени, например, в разные моменты времени или на разных стадиях процесса конструирования. В конкретном варианте осуществления, удвоение клеток можно рассчитать путем сравнения общего количества жизнеспособных клеток в один момент времени с общим количеством жизнеспособных клеток, присутствующих в более ранний

момент времени. В некоторых вариантах инкубация завершается до, примерно до или, по меньшей мере, до одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или больше удвоений клеточной популяции, например, удвоений, которые происходят во время инкубации. В некоторых аспектах, удвоение клеток рассчитывают путем определения общего числа ядросодержащих клеток (TNC) в начале инкубации и после завершения инкубации, с последующим определением натурального логарифма продукта TNC в конце, деленного на TNC в начале, с последующим делением указанного натурального логарифма продукта на натуральный логарифм 2.

В некоторых аспектах, количество удвоений, которое происходит в популяции, например, во время процесса конструирования, определяется с использованием следующей формулы:

$$1) \text{ Удвоение клеток} = \frac{\ln \left(\frac{\text{TNC при сборе}}{\text{TNC через 3 дня после активации}} \right)}{\ln 2}$$

В некоторых аспектах, количество удвоений, происходящих в популяции, например, во время процесса конструирования, определяется по следующей формуле:

$$2) \text{ Удвоение клеток} = \frac{\ln \left(\frac{\text{TNC при сборе}}{\text{TNC при начале стимуляции}} \right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления, количество удвоений, происходящих в популяции, например, во время процесса конструирования, определяется по следующей формуле:

$$3) \text{ Удвоение клеток} = \frac{\ln \left(\frac{\text{TNC при сборе}}{\text{TNC после стимуляции}} \right)}{\ln 2}$$

В различных вариантах осуществления, количество удвоений, происходящих в популяции, например, во время процесса конструирования, определяется по следующей формуле:

$$4) \text{ Удвоение клеток} = \frac{\ln \left(\frac{\text{TNC при сборе}}{\text{TNC при трансдукции}} \right)}{\ln 2}$$

В конкретных вариантах осуществления, количество удвоений, происходящих в популяции, например, в ходе процесса конструирования, определяется по следующей формуле:

$$5) \text{ Удвоение клеток} = \frac{\ln \left(\frac{\text{TNC при сборе}}{\text{TNC в начале инкубации}} \right)}{\ln 2}$$

В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как общее количество клеток, например, общее количество инкубированных клеток или клеток, подвергающихся инкубации, превышает или превышает примерно в один, два, три,

четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать, или больше чем в двадцать раз превышает число клеток входной популяции, например, общее число клеток, контактировавших со стимулирующим реагентом. В различных вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как общее количество инкубированных клеток превышает или превышает примерно в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или больше чем в двадцать раз общее количество клеток, которые были трансформированы, трансдуцированы или центрифужно инокулированы, например, общее количество клеток, которые контактировали с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой Т-клетки, жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующие CAR, или комбинацию любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как общее количество клеток превысит общее количество клеток входной популяции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток превысит общее количество жизнеспособных CD3+ клеток входной популяции. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как общее количество клеток превысит общее количество трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, инкубация завершается до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток превысит общее количество жизнеспособных CD3+ трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления, общее количество клеток или общее количество жизнеспособных клеток в клеточной популяции остается подобным, одинаковым или по существу одинаковым во время инкубации. В конкретных вариантах осуществления, общее количество клеток или общее количество жизнеспособных клеток в клеточной популяции не изменяется во время инкубации. В некоторых аспектах, общее количество клеток или общее количество жизнеспособных клеток уменьшается во время инкубации. В конкретных аспектах, общее количество жизнеспособных клеток составляет, составляет примерно или составляет меньше 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% от 50% от общего количества клеток или общего количества жизнеспособных клеток входной популяции до, например, непосредственно до или в начале стимуляции.

6. Удаление стимулирующих реагентов

В некоторых вариантах осуществления, популяцию инкубированных Т-клеток продуцируют или создают в соответствии с любым из способов, представленных в настоящем документе, в которых вещество, такое как конкурентный агент, добавляется к Т-клеткам для разрушения, такого как уменьшение и/или прекращение, подачи сигнала стимулирующего агента или агентов. В некоторых вариантах осуществления, популяция инкубированных Т-клеток содержит вещество, такое как конкурентный агент, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин. В некоторых вариантах осуществления,

вещество, такое как конкурентный агент, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин, присутствует в количестве, которое, по меньшей мере, в 1,5 раза превышает, по меньшей мере, в 2 раза, по меньшей мере, в 3 раза, по меньшей мере, в 4 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 10 раз, по меньшей мере, в 100 раз, по меньшей мере, в 1000 раз или больше, чем количество вещества в эталонной популяции или препарате культивируемых Т-клеток в котором вещество не добавлялось экзогенно во время инкубации. В некоторых вариантах осуществления, количество вещества, такого как конкурентный агент, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин, в популяции культивируемых Т-клеток составляет от или примерно от 10 мкМ до 100 мкМ, от 100 мкМ до 1 мМ, от 100 мкМ до 500 мкМ или от 10 мкМ до 100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, 10 мкМ или примерно 10 мкМ биотина или аналога биотина, например, D-биотина, добавляют к клеткам или клеточной популяции для отделения или удаления олигомерного стимулирующего реагента из клеток или клеточной популяции.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов (например, агентов, которые стимулируют или активируют TCR и/или корецептор) связываются с, например, обратимо связываются с олигомерным реагентом, например, через множество конкретных сайтов связывания (например, сайтов связывания Z), присутствующих на олигомерном реагенте. В некоторых случаях, это приводит к тому, что агенты располагаются близко друг к другу, так что эффект авидности может иметь место, если клетка-мишень, имеющая (по меньшей мере, две копии) молекулы клеточной поверхности, которые связываются или распознаются агентом, контактирует с агентом. В некоторых аспектах, реагент для связывания рецептора имеет низкую аффинность к молекуле рецептора клетки в сайте связывания B, так что реагент для связывания рецептора диссоциирует от клетки в присутствии конкурирующего реагента. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, агенты удаляются из клеток в присутствии конкурирующего реагента.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент представляет собой олигомер мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab. В некоторых вариантах осуществления, присоединенные Fab содержат домены связывания стрептавидина, например, которые обеспечивают обратимое присоединение к олигомеру мутеина стрептавидина. В некоторых случаях, анти-CD3 и анти-CD28 Fab расположены близко друг к другу, так что эффект авидности может иметь место, если Т-клетка, экспрессирующая CD3 и/или CD28, контактирует с олигомерным стимулирующим реагентом с обратимо присоединенными Fab. В некоторых аспектах, Fab имеют низкую аффинность к CD3 и CD28, так что Fab диссоциируют от клетки в присутствии конкурирующего реагента, например, биотина или варианта или аналога биотина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, Fab удаляют или диссоциируют из клеток в присутствии конкурирующего реагента, например, D-биотина.

В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или

отделяют от клеток или клеточных популяций перед сбором, получением или составлением клеток. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток или клеточных популяций через контакт или воздействие конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, после или во время инкубации, например инкубации, описанной в настоящем документе, например, в Разделе II-C-5. В некоторых вариантах осуществления, клетки или клеточная популяция контактирует или подвергается воздействию конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления олигомерного стимулирующего реагента, например, олигомерного стимулирующего реагента мутеина стрептавидина, после инкубации, но перед стадиями сбора, получения или составления клеток. В конкретных вариантах осуществления, клетки или клеточная популяция контактирует или подвергается воздействию конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления олигомерного стимулирующего реагента, например, олигомерного стимулирующего реагента мутеина стрептавидина, после инкубации. В некоторых аспектах, когда олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток во время инкубации, например, через контакт или воздействие на конкурирующий реагент, например, биотин или аналог биотина, такой как D-биотин, клетки возвращают в те же условия инкубации, что и до разделения или удаления, на оставшуюся продолжительность инкубации.

В некоторых вариантах осуществления, клетки контактируют с, с примерно или с, по меньшей мере, 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мМ, 1 мМ или 10 мМ конкурентного реагента для удаления или отделения олигомерного стимулирующего реагента от клеток. В различных вариантах осуществления, клетки контактируют с, с примерно или с, по меньшей мере, 0,01 мкМ, 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, 0,01 мМ, 1 мМ или 10 мМ биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления или отделения стимулирующих олигомеров мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab, из клеток. В различных вариантах осуществления, клетки контактируют с биотином в количестве от или от примерно 100 мкМ до 10 мМ, например, 1 мМ, аналогом биотина, таким как D-биотин, для удаления или отделения олигомерного стимулирующего реагента, такого как олигомеры мутеина стрептавидина с обратимо присоединенными анти-CD3 и анти-CD28 Fab, из клеток. В различных вариантах осуществления, клетки контактируют с биотином в концентрации от или от примерно 100 мкМ до 10 мМ, например, 1 мМ, например, биотином или аналогом биотина, таким как D-биотин, в течение или в течение примерно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов., 24 часа, 30 часов, 36 часов, 42 часа или 48 часов после контакта или воздействия D-биотина.

В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток в течение или в течение примерно 120 часов, 108 часов, 96 часов, 84 часов, 72 часов, 60 часов, 48 часов, 36 часов, 24 часов или 12 часов, включительно, от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток в течение или в течение примерно 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней, одного дня или 0,5 дней, включительно, от начала стимуляции. В конкретных вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток точно или примерно через 48 часов или точно или примерно через 2 дня после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток точно или примерно через 72 часа или точно или примерно через 3 дня после начала стимуляции. В некоторых вариантах осуществления, олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, удаляют или отделяют от клеток точно или примерно через 96 часов или точно или примерно через 4 дня после начала стимуляции.

В некоторых вариантах осуществления, клетки или клеточная популяция контактирует или подвергается воздействию конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина, такого как D-биотин, для удаления олигомерного стимулирующего реагента, например, олигомерного стимулирующего реагента мутеина стрептавидина, точно или примерно через 48 часов или точно или примерно через 2 дня после начала стимуляции, например, во время или после описанной в настоящем документе инкубации, такой как в разделе II-C-5. В некоторых аспектах, когда олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток во время инкубации, например, путем контакта или воздействия на конкурирующий реагент, например, биотин или аналог биотина, такой как D-биотин, клетки возвращают в те же условия инкубации, что и до разделения или удаления, на оставшуюся продолжительность инкубации. В других аспектах, когда олигомерный стимулирующий реагент, например, олигомерный стимулирующий реагент мутеина стрептавидина, отделяют или удаляют из клеток после инкубации, например, путем контакта или воздействия на конкурирующий реагент, например, биотин или аналог биотина, такой как D-биотин, клетки дополнительно инкубируют в течение или в течение примерно 2 часов, 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 30 часов, 36 часов, 42 часов или 48 часов после контакта или воздействия конкурирующего реагента. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцированные клетки, обработанные D-биотином, дополнительно инкубируют в течение или в течение примерно 48 часов после добавления D-биотина.

7. Сбор, получение или составление клеток

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают после завершения инкубации. В некоторых вариантах осуществления, собранные или полученные клетки представляют собой клетки выходной популяции. В некоторых вариантах осуществления, выходная популяция включает клетки, которые являются жизнеспособными, CD3+, CD4+, CD8+ и/или положительными в отношении рекомбинантного рецептора, например, CAR+. В конкретных вариантах осуществления, собранные CD4+ Т-клетки и составленные CD8+ Т-клетки представляют собой выходные CD4+ и CD8+ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, составленная клеточная популяция, например, составленная популяция обогащенных CD4+ и CD8+ клеток, представляет собой выходную популяцию клеток, например выходную популяцию обогащенных CD4+ и CD8+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки или клеточная популяция, которые собирают, получают или составляют, не подвергались какому-либо размножению, например, любым условиям, в которых клетки инкубировали или культивировали в условиях, увеличивающих количество жизнеспособных клеток во время инкубации или культивирования. Например, в некоторых аспектах, собранные клетки не подвергались какой-либо инкубации или культивированию, при этом общее количество жизнеспособных клеток увеличивалось в конце инкубации или культивирования по сравнению с общим количеством жизнеспособных клеток в начале инкубации или культивирования. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, не подвергались какой-либо стадии инкубации или культивирования явно с целью увеличения (например, размножения) общего количества жизнеспособных клеток в конце процесса инкубации или культивирования по сравнению с началом указанного процесса инкубации или культивации. В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют в условиях, которые могут привести к размножению, но условия инкубации не осуществляют с целью размножения клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, собранные клетки могут подвергаться размножению, несмотря на то, что они были произведены в процессе, который не включает стадию размножения. В некоторых вариантах осуществления, производственный процесс, не включающий стадию расширения, называется процессом без размножения или с минимальным размножением. Процесс «без размножения» может также упоминаться как процесс «с минимальным размножением». В некоторых вариантах осуществления, процесс без размножения или с минимальным размножением может дать клетки, которые размножились, несмотря на то, что процесс не включает стадию размножения. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые собирают, могут быть подвергнуты стадии инкубации или культивирования, которая включает композицию среды, предназначенную для уменьшения, подавления, сведения к минимуму или устранения размножения клеточной популяции в целом. В некоторых вариантах осуществления, собранные, полученные или составленные клетки ранее не подвергались инкубации или культивированию, которое

проводилось в биореакторе или в условиях, когда клетки раскачивали, вращали, встряхивали или перфузировали в течение всей или части инкубации или культивации. Примеры производственных процессов без размножения и сконструированных клеток, полученных с помощью таких процессов, описаны в документе PCT/US 2019/046062, который полностью включен посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, стадию селекции, выделения, разделения, обогащения и/или очистки клеток проводят до того, как клетки или клеточную популяцию собирают, получают или составляют. В некоторых вариантах осуществления, стадию селекции, выделения, разделения, обогащения и/или очистки клеток проводят с использованием хроматографии, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, стадию селекции Т-клеток с помощью хроматографии проводят после трансдукции Т-клеток, но перед сбором, перед получением и/или перед составлением клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадию селекции Т-клеток с помощью хроматографии проводят непосредственно перед сбором клеток.

В некоторых вариантах осуществления, количество времени от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток составляет, составляет примерно или меньше 36 часов, 42 часов, 48 часов, 54 часов, 60 часов, 72 часов, 84 часа, 96 часов, 108 часов или 120 часов. В некоторых вариантах осуществления, количество времени от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток составляет, составляет примерно или составляет меньше 1,5 дней, 2 дней, 3 дней, 4 дней или 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, количество времени от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток для получения сконструированных клеток, от начала стимуляции до сбора, получения или составления клеток, составляет от или от примерно 36 часов до 120 часов, от 48 часов до 96 часов или от 48 часов до 72 часов, включительно, или от или от примерно 1,5 дней до 5 дней, от 2 дней до 4 дней или от 2 дней до 3 дней, включительно. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, получения или составления клеток составляет точно, примерно или меньше 48 часов, 72 часов или 96 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, получения или составления клеток составляет точно, примерно или меньше 2 дней, 3 дней или 4 дней. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, получения или составления клеток составляет 48 часов \pm 6 часов, 72 часа \pm 6 часов или 96 часов \pm 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, количество времени от начала инкубации до сбора, получения или составления клеток составляет или составляет примерно 96 часов или четыре дня.

В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают, получают или составляют в бессывороточной среде, такой как среда, описанная в настоящем документе или в PCT/US2018/064627, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают, получают или составляют в той же бессывороточной среде, которая использовалась во время инкубации.

В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают, получают или составляют в минимальной среде, которая не содержит один или несколько рекомбинантных цитокинов и не содержит сывороточный компонент, т.е. является бессывороточной средой, но может содержать один или несколько дополнительных компонентов. В конкретных вариантах осуществления, использование такой бессывороточной среды дает обедненную среду, которая обеспечивает поддержание клеток, но не включает определенные факторы, которые могут активировать или делать клетки метаболически активными, тем самым оставляя клетки в состоянии, которая является или вероятно является состоянием покоя или отдыха. В некоторых аспектах, инкубация в присутствии такой бессывороточной среды позволяет клеткам восстанавливаться или отдыхать после стимуляции и генетического конструирования (например, трансдукции). В некоторых аспектах, сбор, получение или составление клеток в присутствии такой бессывороточной среды дает состав выходной композиции, содержащий клетки, которые меньше подвержены повреждению или потере жизнеспособности, например, когда собранные/составленные клетки криоконсервируют и затем размораживают непосредственно перед использованием. В некоторых вариантах осуществления, клетки в выходной композиции при оттаивании имеют более низкие уровни каспазы или другого маркера апоптоза, чем клетки, инкубированные в аналогичной среде, но содержащей один или несколько рекомбинантных цитокинов, сыворотку или другие факторы, которые могут сделать клетки более метаболически активными при криоконсервации выходной композиции.

В некоторых вариантах осуществления, составляют одну или несколько популяций обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, одну или несколько популяций обогащенных Т-клеток составляют после того, как одна или несколько популяций были сконструированы и/или инкубированы. В конкретных вариантах осуществления, одна или несколько популяций являются входными популяциями. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько входных популяций предварительно криозащищены и сохранены, и перед инкубацией их размораживают.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают, по меньшей мере, когда интегрированный вектор обнаруживается в геноме. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают до получения стабильного интегрированного числа копий вектора (iVCN) на диплоидный геном. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают после обнаружения интегрированного вектора в геноме, но до достижения стабильного iVCN на диплоидный геном.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают до того, как iVCN достигает, достигает примерно или достигает, по меньшей мере, 5,0, 4,0, 3,0, 2,5, 2,0, 1,75, 1,5, 1,25, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 или 0,25 копий на диплоидный геном. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как iVCN достигнет или составит примерно 1,0 копию на диплоидный геном. В некоторых

вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как iVCN достигнет или составит примерно 0,5 копий на диплоидный геном.

В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают до, примерно до или до, по меньшей мере, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, восьми, десяти, двадцати или больше удвоений клеточной популяции, например, удвоений которые возникают во время инкубации.

В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество клеток, например, общее количество инкубированных клеток или клеток, подвергающихся инкубации, станет больше или чем или больше чем примерно в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или больше двадцати раз от количества клеток входной популяции, например, общего количества клеток, контактировавших со стимулирующим реагентом. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество инкубированных клеток превысит или превысит примерно в один, два, три, четыре, пять, шесть, восемь, десять, двадцать или больше двадцати раз общее количество клеток, которые были трансформированы, трансдуцированы или центрифужно инокулированы, например, общее количество клеток, которые контактировали с вирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой Т-клетки, жизнеспособные Т-клетки, CD3+ Т-клетки, CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, Т-клетки, экспрессирующие CAR, или комбинацию любых из вышеперечисленных. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество клеток превысит общее количество клеток входной популяции. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток превысит общее количество жизнеспособных CD3+ клеток входной популяции. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или собирают до того, как общее количество клеток превысит общее количество клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество жизнеспособных CD3+ Т-клеток превысит общее количество жизнеспособных CD3+ клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток превысит общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток во входной популяции. В конкретных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество клеток превысит общее количество клеток трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клеток. В различных вариантах осуществления, клетки собирают или получают до того, как общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток превысит общее количество жизнеспособных CD4+ клеток и CD8+ клеток в трансформированных, трансдуцированных или центрифужно инокулированных клетках.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает стадию фильтрования клеточной композиции во время или после сбора или получения, например, с использованием фильтра (например, 40 мкм фильтра), например, для удаления крупных частиц. В некоторых вариантах осуществления, стадию фильтрации выполняют во время сбора или получения клеток. Например, фильтр может быть встроен между инкубируемыми после трансдукции клетками и устройством сбора/получения, таким как системы обработки клеток Sepax® или Sepax 2®. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают, и затем фильтруют перед необязательной промывкой отфильтрованной композиции. В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают или получают, промывают, и промытую клеточную композицию фильтруют.

В некоторых вариантах осуществления, составленные клетки представляют собой выходные клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция обогащенных Т-клеток в рецептуре представляет собой выходную популяцию обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, составленные CD4⁺ Т-клетки и составленные CD8⁺ Т-клетки представляют собой выходные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. В конкретных вариантах осуществления, составленная клеточная популяция, например, составленная популяция обогащенных CD4⁺ и CD8⁺ клеток, представляет собой выходную популяцию клеток, например, выходную популяцию обогащенных CD4⁺ и CD8⁺ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки могут быть помещены в контейнер, такой как пакет или флакон. В некоторых вариантах осуществления, флакон может представлять собой флакон для инфузий. В некоторых вариантах осуществления, флакон содержит одну стандартную дозу сконструированных клеток, например, количество клеток для введения в заданной дозе или ее части.

В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют в фармацевтически приемлемом буфере, который может, в некоторых аспектах, включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает замену среды на среду или буфер для составления, который является фармацевтически приемлемым или желательным для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в фармацевтически приемлемом буфере, который может включать один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Примерами таких фармацевтических форм, включая фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, могут быть любые из описанных ниже в сочетании с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен

для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничен ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах, используется смесь двух или нескольких консервантов. Консервант или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% массовых от общей массы композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Буферные агенты, в некоторых аспектах, включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах, используется смесь двух или нескольких буферных агентов. Буферный агент или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% массовых от общей массы композиции. Способы приготовления фармацевтических композиций для введения известны. Типовые способы более подробно описаны, например, в Remington: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция может также содержать более одного активного ингредиента, подходящего для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится с помощью клеток или агентов, при этом соответствующие действия не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Таким образом, в некоторых

вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин /или винкристин. В некоторых вариантах осуществления, агенты или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например п-толуолсульфоновая кислота.

Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит агенты или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность, в некоторых вариантах осуществления, контролируют путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако другие схемы дозирования могут быть полезны и могут быть определены. Желаемая доза может быть доставлена путем однократного болюсного введения композиции, путем многократного болюсного введения композиции или путем непрерывного инфузионного введения композиции.

Агенты или клетки можно вводить любым подходящим способом, например болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, внутрихориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или задней окологсклеральной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления, их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально, и при необходимости для местного лечения, внутриочаговым введением. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят путем однократного болюсного введения клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят путем многократного болюсного введения клеток или агента, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения клеток или агента.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза может зависеть от

типа заболевания, подлежащего лечению, типа агента или агентов, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, того, вводят ли агент или клетки в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни субъекта и ответа на агент или клетки, а также на усмотрение лечащего врача. Композиции в некоторых вариантах осуществления, подходящим образом вводят субъекту за один раз или в течение серии обработок.

Клетки или агенты можно вводить с использованием стандартных методов введения, составов и/или устройств. Предложены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. В отношении клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или клетки-предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомки (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить посредством локальной инъекции, включая катетерное введение, системную инъекцию, локальную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированную иммунореактивную клетку или агент, который лечит или ослабляет симптомы нейротоксичности), ее обычно готовят в виде стандартной дозированной формы для инъекций (раствора, суспензии, эмульсии).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, сублингвального введения или введения в виде суппозиториев. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят парентерально. Термин «парентеральный», используемый в данном документе, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых вариантах осуществления, представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые, в некоторых аспектах, могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть составлены в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий

полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения агента или клеток в растворитель, такой как смесь с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, солевой раствор, глюкоза, декстроза и подобные.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

В некоторых вариантах осуществления, вводимая доза клеток представляет собой криоконсервированную композицию. В некоторых аспектах, композицию вводят после размораживания криоконсервированной композиции. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят в течение точно или примерно 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 150 минут или 180 минут после размораживания. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят в течение точно или примерно 120 минут после размораживания.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят с помощью шприца. В некоторых вариантах осуществления, объем шприца составляет точно или примерно 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7,5, 10, 20 или 25 мл или диапазон, определяемый любым из предшествующих.

Также предложены готовые изделия и наборы, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, или их композиции, и, необязательно, инструкции по применению, например, инструкции по введению в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, в инструкциях указаны критерии выбора или идентификации субъектов для терапии в соответствии с любым из предложенных способов.

В некоторых вариантах осуществления, предложены готовые изделия и/или наборы, которые включают композицию, содержащую терапевтически эффективное количество любой из сконструированных клеток, описанных в настоящем документе, и инструкции по введению субъекту для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, в инструкциях могут быть указаны некоторые или все элементы предложенных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах осуществления, в инструкциях указаны конкретные инструкции по введению клеток для клеточной терапии, например дозы, сроки, выбор и/или идентификация субъектов для введения и условия введения. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия и/или наборы дополнительно включают одно или несколько дополнительных средств для терапии, например, противолимфомную терапию и/или комбинированную терапию, такие как любые из описанных в настоящем документе, и, необязательно, дополнительно включают инструкции по введению дополнительного агента для терапии. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия и/или наборы дополнительно содержат агент для противолимфомной терапии и, необязательно, дополнительно включают инструкции

по проведению противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, инструкции могут быть включены в виде этикетки или листка-вкладыша, сопровождающего композиции для введения.

Могут быть добавлены различные добавки, повышающие стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Профилактика действия микроорганизмов может быть обеспечена различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой. Длительное всасывание инъекционной дозированной формы может быть вызвано применением средств, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых вариантах осуществления, буфер состава содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют с раствором криоконсерванта, который содержит от 1,0% до 30% раствора ДМСО, например, от 5% до 20% раствора ДМСО или от 5% до 10% раствора ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или другую подходящую среду для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления, раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, по меньшей мере или примерно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в растворе криоконсерванта. В некоторых вариантах осуществления, клетки замораживают, например криозащищают или криоконсервируют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или примерно 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0% ДМСО, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% ДМСО. В конкретных вариантах осуществления, клетки замораживают, например криозащищают или криоконсервируют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или примерно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% HSA.

В конкретных вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток, например Т-клеток, которые были стимулированы, сконструированы и/или инкубированы, составляют, подвергают криозащите и затем хранят в течение определенного времени. В некоторых вариантах осуществления, составленные криозащищенные клетки в составе препарата хранятся до тех пор, пока клетки не будут высвобождены для инфузии. В конкретных вариантах осуществления, составленные криозащищенные клетки хранятся от 1 дня до 6 месяцев, от 1 месяца до 3 месяцев, от 1 дня до 14 дней, от 1 дня до 7 дней, от 3 дней до 6 дней, от 6 месяцев до 12 месяцев или больше 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, клетки подвергают криозащите и хранят в течение точно, примерно или меньше 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления, клетки размораживают

и вводят субъекту после хранения. В некоторых вариантах осуществления, клетки хранятся в течение точно или примерно 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, клетки, содержащиеся в составе, не подвергаются криоконсервации.

В некоторых вариантах осуществления, состав готовят с использованием одной или нескольких стадий обработки, включая промывание, разведение или концентрирование клеток. В некоторых вариантах осуществления, обработка может включать разведение или концентрирование клеток до желаемой концентрации или количества, например, композиции в форме стандартной дозы, включающей количество клеток для введения в данной дозе или ее части. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать уменьшение объема, чтобы тем самым повысить желаемую концентрацию клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать объемное добавление, чтобы таким образом уменьшить концентрацию клеток по желанию. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает добавление объема буфера для состава к трансдуцированным и/или инкубированным клеткам. В некоторых вариантах осуществления, объем буфера состава составляет от или примерно от 10 мл до 1000 мл, например, по меньшей мере или примерно, по меньшей мере или примерно или 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

В некоторых вариантах осуществления, такие стадии обработки для составления клеточной композиции осуществляются в закрытой системе. Примеры таких стадий обработки могут быть выполнены с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или несколькими системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такими как центрифужная камера, производимая и продаваемая Biosafe SA, в том числе для использования с системами обработки клеток Sepax® или Sepax 2®. Типовая система и процесс описаны в международной публикации № WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, способ включает осуществление экспрессии составленной композиции из внутренней полости центрифужной камеры, где композиция представляет собой полученную в результате композицию клеток, составленную в буфере для составления, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из приведенных выше вариантов осуществления, как описано. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия составленной композиции осуществляется в контейнер, такой как пакет, который функционально связан как часть закрытой системы с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, такой как пакет, соединяется с системой на линии вывода или в положении вывода.

В некоторых вариантах осуществления, закрытая система, например, связанная с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает в себя мультипортовый выходной комплект, содержащий многоходовой трубчатый коллектор, связанный на каждом конце трубопроводной линии с портом, к которому могут быть присоединены одна или множество емкостей для экспрессии составленной композиции. В некоторых аспектах, желаемое количество или множество выходных контейнеров, например,

пакетов, может быть стерильно соединено с одним или несколькими, как правило, двумя или несколькими, например, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портами многопортового выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько контейнеров, например, пакетов, могут быть присоединены к портам или не ко всем портам. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, система может осуществлять экспрессию выходной композиции во множество выходных пакетов.

В некоторых аспектах, клетки могут быть экспрессированы в один или больше из множества выходных пакетов в количестве для введения дозы, например, для введения разовой стандартной дозы или введения многократной дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления, каждый выходной пакет может содержать количество клеток для введения в заданной дозе или ее части. Таким образом, в некоторых аспектах, каждый пакет может содержать одну стандартную дозу для введения или может содержать часть желаемой дозы, так что больше одного из множества выходных пакетов, например, два выходных пакета или 3 выходных пакета вместе составляют дозу для введения.

Таким образом, контейнеры, например, выходные пакеты, обычно содержат клетки, подлежащие введению, например, одну или несколько их стандартных доз. Стандартная доза может представлять собой количество или число клеток, которые должны быть введены субъекту, или удвоенное количество (или больше) клеток, которые должны быть введены. Это может быть самая низкая доза или самая низкая возможная доза клеток, которые могут быть введены субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров, например, пакетов, отдельно содержит стандартную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров содержит одинаковое или примерно или по существу одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая стандартная доза содержит, по меньшей мере или примерно, по меньшей мере, 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 сконструированных клеток, всего клеток, Т-клеток или РВМС. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом пакете равен от 10 мл до 100 мл, например, по меньшей мере или примерно, по меньшей мере, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл.

В некоторых вариантах осуществления, такие клетки, полученные данным способом, или композицию, содержащую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

III. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

Предлагаемые способы и применения включают использование или введение дозы сконструированных клеток композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), например, анти-CD19 CAR, такой как CAR, таргетирующий CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления, композиция представляет собой терапевтическую композицию, обогащенную Т-клетками, например, композицию, обогащенную CD3+ Т-клетками, или композицию, обогащенную

CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, изготовленную с использованием процесса получения или продуцирования сконструированных клеток, и/или выходных композиций, включающих сконструированные Т-клетки, описанные в настоящем документе, например, в Разделе II-C. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные Т-клетки представлены в виде композиции, состава или дозы, такой как фармацевтическая композиция, состав или доза. Такие композиции, составы или дозы можно использовать в соответствии с предложенными способами или применениями и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями, например, для профилактики или лечения заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогноза.

В конкретных вариантах осуществления, композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR, обогащена CD3⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD45⁺ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой CD3⁺, например, CD3⁺ Т-клетки или CAR+CD3⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления от точно или примерно 75% до точно или примерно 80%, от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95%, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых клетки CD45⁺ или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой CD3⁺, например, CD3⁺ Т-клетки или CAR+CD3⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, точно или примерно 80%, точно или примерно 81%, точно или примерно 82%, точно или примерно 83%, точно или примерно 84%, точно или примерно 85%, точно или примерно 86%, точно или примерно 87%, точно или примерно 88%, точно или примерно 89%, точно или примерно 90%, точно или примерно 91%, точно или примерно 92%, точно или примерно 93%, точно или примерно 94%, точно или примерно 95%, точно или примерно 96%, точно или примерно 97%, точно или примерно 98%, точно или примерно 99% всего живых CD45⁺ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой CD3⁺, например, CD3⁺ Т-клетки или CAR+CD3⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, от примерно 80% до примерно 100%, от примерно 85% до примерно 99%, от примерно 88% до примерно 98%, от примерно 96% до примерно 99% или от примерно 97% до примерно 99% всего живых

CD4+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой CD3+, например, CD3+ Т-клетки или CAR+CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, композиция состоит из или состоит по существу из CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 80% всего клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки и, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере или примерно 40%, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 90%, или, по меньшей мере или примерно 95% всего клеток в композиции экспрессируют анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 97%, по меньшей мере или примерно 98% или по меньшей мере или примерно 99% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+ и, по меньшей мере или примерно 40% или, по меньшей мере или примерно 50% всего клеток в композиции экспрессируют анти-CD19 CAR.

В некоторых вариантах осуществления, меньше или меньше примерно 2,5%, меньше или меньше примерно 2%, меньше или меньше примерно 1,5%, меньше или меньше примерно 1%, меньше или меньше примерно 0,5%, меньше или меньше примерно 0,4%, меньше или меньше примерно 0,3%, меньше или меньше примерно 0,2%, меньше или меньше примерно 0,1%, меньше или меньше примерно 0,05% или точно или примерно 0% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции являются положительными для экспрессии маркера NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 2,5% до точно или примерно 2%, от точно или примерно 2% до точно или примерно 1,5%, от точно или примерно 1,5% до точно или примерно 1%, от точно или примерно 1% до точно или примерно 0,5% и точно или примерно 0,4%, от точно или примерно 0,4% до точно или примерно 0,3%, от точно или примерно 0,3% до точно или примерно 0,2%, от точно или примерно 0,2% до точно или примерно 0,1%, от точно или примерно 0,1% до точно или примерно 0,05%, меньше точно или примерно 0,05% или точно или примерно 0% от всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой NK клетки. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 1,5% до точно или примерно 0%, или от точно или примерно 0,5% до точно или примерно 0% всего живых CD45+ клеток в композиции составляют NK клетки. В некоторых вариантах осуществления, композиция не содержит или по существу не содержит NK клетки или клетки, положительные в отношении экспрессии маркера NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, меньше или меньше примерно 0,2%,

меньше или меньше примерно 0,15%, меньше или меньше примерно 0,1%, меньше или меньше примерно 0,05%, меньше или меньше примерно 0,01% или точно или примерно 0% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции, являются CD19+. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 0,2% до точно или примерно 0,15%, от точно или примерно 0,15% до точно или примерно 0,1%, от точно или примерно 0,1% до точно или примерно 0,05%, от точно или примерно 0,05% до точно или примерно 0,01%, меньше чем точно или примерно 0,01%, или точно или примерно 0% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой CD19+. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 0,1% до точно или примерно 0%, или от точно или примерно 0,05% до точно или примерно 0% всего живых CD45+ клеток в композиции составляют CD19+. В некоторых вариантах осуществления, композиция не содержит или по существу не содержит CD19+ клетки.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 80% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+, по меньшей мере или примерно 40% всего клеток в композиции экспрессируют анти-CD19 CAR, меньше чем примерно 1,5% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой NK-клетки или клетки, положительные в отношении экспрессии маркера NK-клеток, и меньше примерно 0,1% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD19+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 96% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+, по меньшей мере или примерно 50% всего клеток в композиции экспрессируют анти-CD19 CAR, меньше чем примерно 0,5% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой NK-клетки или клетки, положительные в отношении экспрессии маркера NK-клеток, и меньше примерно 0,05% всего живых CD45+ клеток в композиции представляют собой CD19+.

В конкретных вариантах осуществления, композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR, обогащена CD4+ и CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции

представляют собой CD4+ или CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 75% до точно или примерно 80%, от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95%, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего CD4+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляет собой CD4+ или CD8+. В некоторых вариантах осуществления, точно или примерно 80%, точно или примерно 81%, точно или примерно 82%, точно или примерно 83%, точно или примерно 84%, точно или примерно 85%, точно или примерно 86%, точно или примерно 87%, точно или примерно 88%, точно или примерно 89%, точно или примерно 90%, точно или примерно 91%, точно или примерно 92%, точно или примерно 93%, точно или примерно 94%, точно или примерно 95%, точно или примерно 96%, точно или примерно 97%, точно или примерно 98%, точно или примерно 99% всего живых CD4+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляют собой CD4+ или CD8+. В некоторых вариантах осуществления, от примерно 80% до примерно 100%, от примерно 85% до примерно 99%, от примерно 88% до примерно 98%, от примерно 96% до примерно 99% или от примерно 97% до примерно 99% всего живых CD4+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции представляет собой CD4+ или CD8+. В некоторых вариантах осуществления, композиция состоит или по существу состоит из CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 80% всего клеток в композиции составляют CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки и, по меньшей мере или примерно 30%, по меньшей мере или примерно 40%, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 90%, или по меньшей мере или примерно 95% всего клеток в композиции экспрессируют анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 97%, по меньшей мере или примерно 98% или по меньшей мере или примерно 99% всего живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, и, по меньшей мере или примерно 40% или по меньшей мере или примерно 50% всего клеток в композиции экспрессируют анти-CD19 CAR.

В конкретных вариантах осуществления, клетки CD3+CD4+ составляют по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по

меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+CD4+ клетки составляют от точно или примерно 50% до точно или примерно 70%, от точно или примерно 50% до точно или примерно 55%, от точно или примерно 55% до точно или примерно 60%, от точно или примерно 60% до точно или примерно 65%, или от точно или примерно 65% до точно или примерно 70% всего живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, клетки CD3+CD8+ составляют, по меньшей мере или примерно 30%, по меньшей мере или примерно 35%, по меньшей мере или примерно 40%, по меньшей мере или примерно 45%, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 55%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD4+ клеток или их клеток, экспрессирующих CAR, в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+CD8+ клетки составляют от точно или примерно 30% до точно или примерно 50%, от точно или примерно 30% до точно или примерно 35%, от точно или примерно 35% до точно или примерно 40%, от точно или примерно 40% до точно или примерно 45%, или от точно или примерно 45% до точно или примерно 50% всего живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CD3+CD4+ клетки составляют от примерно 55% до примерно 65% всего живых CD4+ клеток в композиции, в то время как CD3+CD8+ клетки составляют от примерно 35% до примерно 45% всего живых CD4+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+CD4+ клетки составляют примерно 60%, в то время как CD3+CD8+ клетки составляют примерно 40% всего живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD3+ клетки (например, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, по меньшей мере или примерно 40%, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере

или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD4+ клеток или CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD3+ клетки (например, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют от точно или примерно 40% до точно или примерно 100%, от точно или примерно 40% до точно или примерно 45%, от точно или примерно 45% до точно или примерно 50%, от точно или примерно 50% до точно или примерно 55%, от точно или примерно 55% до точно или примерно 60%, от точно или примерно 60% до точно или примерно 65%, от точно или примерно 65% до точно или примерно 70%, от точно или примерно 70% до точно или примерно 75%, от точно или примерно 75% до точно или примерно 80%, от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95% или от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% всего живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки (например, CD4+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, по меньшей мере или примерно 40%, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD4+ клеток или CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки (например, CD4+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют от точно или примерно 20% до точно или примерно 60%, от точно или примерно 20% до точно или примерно 25%, от точно или примерно 20% до точно или примерно 25% и точно или примерно 30%, от точно или примерно 30% до точно или примерно 35%, от точно или примерно 35% до точно или примерно 40%, от точно или примерно 40% до точно или примерно 45%, от точно или примерно 45% до точно или примерно 50%, от точно или примерно 50% до точно или примерно 55% или от точно или примерно 55% до точно или примерно 60% всего живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD8+ клетки (например, CD8+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют, по меньшей мере или примерно 10%, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, по

меньшей мере или примерно 35%, по меньшей мере или примерно 40%, по меньшей мере или примерно 45%, по меньшей мере или примерно 50%, по меньшей мере или примерно 55%, по меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 96%, по меньшей мере или примерно 98%, по меньшей мере или примерно 98,5%, по меньшей мере или примерно 99%, по меньшей мере или примерно 99,5%, по меньшей мере или примерно 99,9%, 100% или примерно 100% всего клеток, всего жизнеспособных клеток, всего живых клеток, всего Т-клеток, всего жизнеспособных Т-клеток, всего живых Т-клеток, всего живых CD4+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD8+ клетки (например, CD8+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют от точно или примерно 5% до точно или примерно 35%, от точно или примерно 5% до точно или примерно 10%, от точно или примерно 5% до точно или примерно 10% и от точно или примерно 15%, от точно или примерно 15% до точно или примерно 20%, от точно или примерно 20% до точно или примерно 25%, от точно или примерно 25% до точно или примерно 30%, от точно или примерно 30% до точно или примерно 35% от общего количества живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, клетки CAR+CD3+ (например, клетки CD3+, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют от примерно 35% до примерно 65% всего живых CD4+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки (например, CD4+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR) составляют от примерно 25% до примерно 55% всего живых CD4+ клеток в композиции, в то время как CAR+CD8+ клетки (например, CD8+ клетки экспрессирующие анти-CD19 CAR), составляют от примерно 10% до примерно 30% всего живых CD4+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR, составляют примерно 50% всего живых CD4+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки составляют примерно 30%, в то время как CAR+CD8+ клетки составляют примерно 20% всего живых CD4+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR, составляют примерно 60% всего живых CD4+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки составляют примерно 40%, тогда как CAR+CD8+ клетки составляют примерно 20% всего живых CD4+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит соотношение от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток имеет соотношение точно или примерно 3:1, точно или примерно 2,8:1, точно или примерно 2,5:1, точно или примерно 2,25:1,

точно или примерно 2:1, точно или примерно 1,8:1, точно или примерно 1,7:1, точно или примерно 1,6:1, точно или примерно 1,5:1, точно или примерно 1,4:1, точно или примерно 1,3:1, точно или примерно 1,2:1, точно или примерно 1,1:1, точно или примерно 1:1, точно или примерно 1:1,1, точно или примерно 1:1,2, точно или примерно 1:1,3, точно или примерно 1:1,4, точно или примерно 1:1,5, точно или примерно 1:1,6, точно или примерно 1:1,7, точно или примерно 1:1,8, точно или примерно 1:2, точно или примерно 1:2,25, точно или примерно 1:2,5, точно или примерно 1:2,8 или точно или примерно 1:3 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам.

В некоторых вариантах, выходная композиция содержит соотношение от 3:1 до 1:3, от 2,5:1 до 1:2,5, от 2:1 до 1:2, от 1,5:1 до 1:1,5, от 1,4:1 до 1:1,4, от 1,3:1 до 1:1,3, от 1,2:1 до 1:1,2 или от 1,1:1 до 1:1,1 CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, анти-CD19 CAR, к CD8+ Т-клеткам, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления, соотношение CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), к CD8+ Т-клеткам, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), в выходной композиции составляет точно или примерно 3:1, точно или примерно 2,8:1, точно или примерно 2,5:1, точно или примерно 2,25:1, точно или примерно 2:1, точно или примерно 1,8:1, точно или примерно 1,7:1, точно или примерно 1,6:1, точно или примерно 1,5:1, точно или примерно 1,4:1, точно или примерно 1,3:1, точно или примерно 1,2:1, точно или примерно 1,1:1, точно или примерно 1:1, точно или примерно 1:1,1, точно или примерно 1:1,2, точно или примерно 1:1,3, точно или примерно 1:1,4, точно или примерно 1:1,5, точно или примерно 1:1,6, точно или примерно 1:1,7, точно или примерно 1:1,8, точно или примерно 1:2, точно или примерно 1:2,25, точно или примерно 1:2,5, точно или примерно 1:2,8 или точно или примерно 1:3.

В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит соотношение от примерно 2,5:1 до примерно 1:2 или от примерно 2:1 до примерно 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток имеет отношение точно или примерно 1,5:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит отношение от примерно 3:1 до примерно 1:1 CAR+CD4+ клеток к CAR+CD8+ клеткам. В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит отношение от примерно 2,5:1 до примерно 1,5:1 CAR+CD4+ клеток к CAR+CD8+ клеткам. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток имеет соотношение точно или примерно 2:1 CAR+CD4+ клеток к CAR+CD8+ клеткам. В некоторых вариантах осуществления, композиция клеток имеет соотношение точно или примерно 1,5:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам и соотношение точно или примерно 2:1 CAR+CD4+ клеток к CAR+CD8+ клеткам.

В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере,

В конкретных вариантах осуществления, композиция имеет низкую долю и/или частоту клеток, которые подвергаются и/или готовятся, примируются и/или вступают в апоптоз. В конкретных вариантах осуществления, композиция имеет низкую долю и/или частоту клеток, положительных в отношении маркера апоптоза. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 40%, меньше точно или примерно 35%, меньше точно или примерно 30%, меньше точно или примерно 25%, меньше точно или примерно 20%, меньше точно или примерно 15%, меньше точно или примерно 10%, меньше точно или примерно 5% или меньше точно или примерно 1% клеток композиции экспрессируют, содержат и/или являются положительными в отношении маркера апоптоза. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 25% клеток композиции экспрессируют, содержат и/или являются положительными в отношении маркера апоптоза. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно меньше точно или примерно 10% клеток композиции экспрессируют, содержат и/или являются положительными в отношении маркера апоптоза.

В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или по меньшей мере, точно или примерно 99,9% экспрессирующих анти-CD19 CAR клеток композиции являются жизнеспособными клетками, например, клетками, отрицательными по маркеру апоптоза, такому как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере точно или примерно 85%, по меньшей мере точно или примерно 90%, или по меньшей мере точно или примерно 95% экспрессирующих анти-CD19 CAR клеток композиции являются отрицательными по маркеру апоптоза, такого как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CD3+ Т-клеток композиции являются жизнеспособными клетками, например, клетками, отрицательными по маркеру апоптоза, такой как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90% или, по меньшей мере, точно или примерно 95% CD3+ Т-клеток композиции являются отрицательными по маркеру апоптоза, такому как каспаза (например, активированная каспаза-3). В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 90% CD3+ Т-клеток в композиции являются жизнеспособными клетками, например, клетками, отрицательными по маркеру апоптоза,

такого как каспаза (например, активированная каспаза-3). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95%, по меньшей мере, точно или примерно 99% или, по меньшей мере, точно или примерно 99,9% CAR+CD3+ Т-клеток композиции представляют собой жизнеспособные клетки, например, клетки, отрицательные по маркеру апоптоза, такому как каспаза (например, активированная каспаза-3). В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90% или, по меньшей мере, точно или примерно 95% анти-CD19 CAR-экспрессирующих CD3+ Т-клеток композиции представляют собой жизнеспособные клетки, например клетки, отрицательные по маркеру апоптоза, такому как каспаза (например, активированная каспаза-3).

В некоторых вариантах осуществления, меньше или меньше примерно 30%, меньше или меньше примерно 25%, меньше или меньше примерно 20%, меньше или меньше примерно 15%, меньше или меньше примерно 10% или меньше или меньше примерно 5% от всего клеток, всего Т-клеток, всего CD4+ клеток, всего CD3+ клеток, всего CD4+ клеток и CD8+ или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 30% до точно или примерно 25%, от точно или примерно 25% до точно или примерно 20%, от точно или примерно 20% до точно или примерно 15%, от точно или примерно 15% до точно или примерно 10%, от точно или примерно 10% до точно или примерно 5% всего клеток, всего Т-клеток, всего CD4+ клеток, всего CD3+ клеток, всего CD4+ клеток и CD8+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В некоторых вариантах осуществления, точно или примерно 6%, точно или примерно 8%, точно или примерно 10%, точно или примерно 12%, точно или примерно 14%, точно или примерно 16%, точно или примерно 18%, точно или примерно 20%, точно или примерно 22%, точно или примерно 24%, точно или примерно 26%, точно или примерно 28%, точно или примерно 30% CD3+ клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессия анти-CD19 CAR может включать, но не ограничена ими, наличие одного или нескольких рекомбинантных рецепторных белков, локализованных на клеточной мембране и/или поверхности клетки, наличие определяемого количества рекомбинантного рецепторного белка, наличие обнаруживаемого количества мРНК, кодирующей рекомбинантный рецептор, наличие или содержание рекомбинантного полинуклеотида, который кодирует рекомбинантный рецептор, и/или наличие или содержание содержащей мРНК или белка, который является

меньшей мере или примерно 60%, по меньшей мере или примерно 65%, по меньшей мере или примерно 70%, по меньшей мере или примерно 75%, по меньшей мере или примерно 80%, по меньшей мере или примерно 85%, по меньшей мере или примерно 90%, по меньшей мере или примерно 95%, по меньшей мере или примерно 97%, по меньшей мере или примерно 99% или больше 99% живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+CAR+ (например, CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR), CD4+CAR+ (например, CD4+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR) и/или CD8+CAR+ (например, CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 60% до точно или примерно 65% живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 35% до точно или примерно 45%, от точно или примерно 35% до точно или примерно 40%, или от точно или примерно 40% до точно или примерно 45% живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления от точно или примерно 15% до точно или примерно 25%, от точно или примерно 15% до точно или примерно 20%, или от точно или примерно 20% до точно или примерно 25% живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 60% живых CD45+ клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, по меньшей мере или примерно 40% представляют собой CD4+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, и по меньшей мере или примерно 20% представляют собой CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-CD19 CAR.

В любом из последующих вариантов осуществления, композиция может содержать примерно или, по меньшей мере, примерно 10×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 20×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 25×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 50×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 100×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 200×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 400×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 600×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 800×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 1000×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 1200×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 1400×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 1600×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 1800×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 2000×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 2500×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 3000×10^6 , или примерно или, по меньшей мере, примерно 4000×10^6 всего клеток, например, всего жизнеспособных клеток, в одном или нескольких контейнерах, таких как флаконы. В любом из следующих вариантов осуществления,

объем композиции может составлять от 1,0 мл до 10 мл, включительно, необязательно, точно или примерно 2 мл, точно или примерно 3 мл, точно или примерно 4 мл, точно или примерно 5 мл, точно или примерно 6 мл, точно или примерно 7 мл, точно или примерно 8 мл, точно или примерно 9 мл, или точно или примерно 10 мл, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержится во множестве контейнеров, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более флаконах. В любом из следующих вариантов осуществления, композиция может содержать примерно или, по меньшей мере, примерно 5×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 10×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 20×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 25×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 50×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 100×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 150×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 200×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 250×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 300×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 350×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 400×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 450×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 500×10^6 , примерно или, по меньшей мере, примерно 550×10^6 , или примерно или, по меньшей мере, примерно 600×10^6 всего клеток, например, всего жизнеспособных клеток, на один контейнер, например, на флакон. В некоторых вариантах осуществления, клетки композиции в одном или нескольких контейнерах имеют плотность, точно, примерно или, по меньшей мере, 5×10^6 клеток/мл, 10×10^6 клеток/мл, 20×10^6 клеток/мл, 30×10^6 клеток/мл, 40×10^6 клеток/мл, 50×10^6 клеток/мл, 60×10^6 клеток/мл, 70×10^6 клеток/мл, 80×10^6 клеток/мл, 90×10^6 клеток/мл, 100×10^6 клеток/мл, 110×10^6 клеток/мл, 120×10^6 клеток/мл, 130×10^6 клеток/мл, 140×10^6 клеток/мл или 150×10^6 клеток/мл в растворе или буфере, например, в растворе или буфере для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, от примерно или до примерно 900×10^6 клеток (например, жизнеспособных CD4⁺ Т-клеток и жизнеспособных CD8⁺ Т-клеток или жизнеспособных CD3⁺ Т-клеток) подвергают стимуляции, где примерно или до примерно 600×10^6 клеток (например, жизнеспособных CD4⁺ Т-клеток и жизнеспособных CD8⁺ Т-клеток или жизнеспособных CD3⁺ Т-клеток) стимулированной композиции подвергают генной инженерии, например, с вирусным вектором, например, путем трансдукции, или не вирусному способу генной инженерии с последующей инкубацией в бессывороточной минимальной среде (например, с добавлением одной или нескольких добавок) без какого-либо рекомбинантного цитокина в течение примерно 72 часов или примерно трех дней. В некоторых вариантах осуществления, полученная выходная композиция содержит от примерно 100×10^6 до примерно 1400×10^6 клеток, например, всего жизнеспособных клеток, в одном или нескольких контейнерах, таких как флаконы.

В конкретных вариантах осуществления, большинство клеток композиции являются наивными или подобными наивным клетками, клетками центральной памяти и/или клетками эффекторной памяти. В конкретных вариантах осуществления, большинство клеток композиции представляют собой наивные или клетки центральной

памяти. В некоторых вариантах осуществления, большинство клеток выходной композиции являются клетками центральной памяти. В некоторых аспектах, менее дифференцированные клетки, например клетки центральной памяти, живут дольше и истощаются медленнее, тем самым повышая жизнестойкость и долговечность. В некоторых аспектах, у человека, отвечающего на клеточную терапию, такую как CAR-T-клеточная терапия, наблюдается повышенная экспрессия генов центральной памяти. *См., например, Fraietta et al. (2018) Nat Med. 24(5):563-571.*

В некоторых вариантах осуществления, клетки композиции имеют высокую долю и/или частоту подобных наивным Т-клеток или Т-клеток, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления, клетки композиции имеют большую долю и/или частоту подобных наивным клеткам, чем композиции, полученные с помощью альтернативных процессов, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, предназначенные для размножения клеток). В некоторых вариантах осуществления, подобными наивным Т-клетками могут включать клетки в различных состояниях дифференциации и могут характеризоваться положительной или высокой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) определенных клеточных маркеров и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых аспектах, подобные наивным Т-клетки характеризуются положительной или высокой экспрессией CCR7, CD45RA, CD28 и/или CD27. В некоторых аспектах, подобные наивным Т-клетки характеризуются отрицательной экспрессией CD25, CD45RO, CD56, CD62L и/или KLRG1. В некоторых аспектах, подобные наивным Т-клетки характеризуются низкой экспрессией CD95. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках, представляют собой CCR7+CD45RA+, где клетки представляют собой CD27+ или CD27-. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках, представляют собой CD27+CCR7+, где клетки представляют собой CD45RA+ или CD45RA-. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным Т-клетки или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках, представляют собой CD62L-CCR7+.

В конкретных вариантах осуществления, клетки композиции обогащены клетками CCR7+. CCR7 представляет собой хемокиновый рецептор, участвующий в проникновении Т-клеток в лимфатические узлы. В конкретных аспектах, CCR7 экспрессируется наивными или подобными наивным Т-клетками (например, CCR7+CD45RA+ или CCR7+CD27+) и Т-клетками центральной памяти (CCR7+CD45RA-). В некоторых

вариантах осуществления, предложенные композиции сконструированных Т-клеток, полученных предложенными способами, включают популяцию Т-клеток, в которой больше точно или примерно 50%, больше точно или примерно 55%, больше или больше точно или примерно 60%, больше или больше точно или примерно 65%, больше или больше точно или примерно 70%, больше или больше точно или примерно 75%, больше или больше точно или примерно 80%, больше или больше точно или примерно 85%, или больше или больше точно или примерно 90% Т-клеток популяции представляют собой центральные клетки памяти и подобные наивным Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, предложенные композиции сконструированных Т-клеток, полученных предложенными способами, включают популяцию Т-клеток, в которой больше точно или примерно 50%, больше точно или примерно 55%, больше или больше точно или примерно 60%, больше или больше точно или примерно 65%, больше или больше точно или примерно 70%, больше или больше точно или примерно 75%, больше или больше точно или примерно 80%, больше или больше точно или примерно 85%, или больше или больше точно или примерно 90% Т-клеток популяции представляют собой Т-клетки CCR7+. В некоторых вариантах осуществления, предложенные композиции сконструированных Т-клеток, полученных предложенными способами, включают популяцию Т-клеток, в которой больше точно или примерно 50%, больше точно или примерно 55%, больше или больше точно или примерно 60%, больше или больше точно или примерно 65%, больше или больше точно или примерно 70%, больше или больше точно или примерно 75%, больше или больше точно или примерно 80%, больше или больше точно или примерно 85%, или больше или больше точно или примерно 90% Т-клеток популяции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, предложенные композиции сконструированных Т-клеток, полученных предложенными способами, включают популяцию Т-клеток, в которой больше точно или примерно 50%, больше точно или примерно 55%, больше или больше точно или примерно 60%, больше или больше точно или примерно 65%, больше или больше точно или примерно 70%, больше или больше точно или примерно 75%, больше или больше точно или примерно 80%, больше или больше точно или примерно 85%, или больше или больше точно или примерно 90% Т-клеток популяции представляют собой CCR7+CD45RA-.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют высокую долю и/или частоту Т-клеток центральной памяти или Т-клеток, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют большую долю и/или частоту клеток центральной памяти, чем выходные композиции, созданные в альтернативных процессах, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, предназначенные для размножения клеток). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки центральной памяти могут включать клетки в различных состояниях дифференциации и могут характеризоваться

положительной или высокой экспрессией (например, поверхностной экспрессией) определенных клеточных маркеров и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых аспектах, Т-клетки центральной памяти характеризуются положительной или высокой экспрессией CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127. В некоторых аспектах, Т-клетки центральной памяти характеризуются отрицательной или низкой экспрессией CD45RA и/или гранзима В. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках центральной памяти, представляют собой CCR7+CD45RA-.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют большую долю и/или частоту подобных наивным клеткам и клеткам центральной памяти, чем выходные композиции, созданные в альтернативных процессах, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, предназначенные для размножения клеток).

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту Т-клеток эффекторной памяти и/или эффекторной памяти RA или Т-клеток, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках эффекторной памяти и/или эффекторной памяти RA. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют более низкую долю и/или частоту Т-клеток эффекторной памяти и/или эффекторной памяти RA, чем выходные композиции, полученные в результате альтернативных процессов, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, предназначенные для размножения клеток). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки эффекторной памяти и/или эффекторной памяти RA могут включать клетки в различных состояниях дифференциации и могут характеризоваться положительной или высокой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) определенных клеточных маркеров и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки эффекторной памяти или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках эффекторной памяти, представляют собой CCR7-CD45RA-. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки эффекторной памяти RA или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на эффекторных Т-клетках RA, представляют собой CCR7-CD45RA+.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют меньшую долю и/или частоту Т-клеток эффекторной памяти, чем выходные композиции, полученные в результате альтернативных процессов, таких как процессы, которые

включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, направленные на размножение клеток). В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют меньшую долю и/или частоту Т-клеток эффекторной памяти RA, чем выходные композиции, полученные в результате альтернативных процессов, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, направленные на размножение клеток). В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют большую долю и/или частоту подобных наивным клеткам и клеток центральной памяти и меньшую долю и/или частоту Т-клеток эффекторной памяти и эффекторной памяти RA, чем выходные композиции, полученные в альтернативных процессах, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают в себя отдельную операцию размножения и/или включают стадии, предназначенные для размножения клеток).

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют высокую долю и/или частоту подобных наивным и/или клеток центральной памяти. В определенных вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют высокую долю и/или частоту клеток центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95% или больше 95% клеток выходной композиции имеют фенотип памяти, имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, или представляют собой подобные наивным или Т-клетки центральной памяти, или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или Т-клетки центральной памяти, или Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95% или больше 95% CD4+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD4+ Т-клетки центральной памяти или представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых

по меньшей мере, или точно или примерно 65% CAR+ Т-клеток (например, CD4 +CAR+ Т-клеток и CD8+CAR+ Т-клеток) выходной композиции представляют собой подобные наивным или Т-клетки центральной памяти, или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95% или больше 95% CAR+ Т-клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим В- и/или CD127+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CAR+ Т-клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим В- и/или CD127+.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 85% клеток выходной композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти или представляют собой подобные наивным или центральной памяти Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, меньше или точно или примерно 15% клеток выходной композиции имеют фенотип эффекторный или эффекторный RA или являются Т-клетками эффекторными или эффекторными RA. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые истощаются и/или стареют. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые истощаются и/или стареют. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 40%, меньше точно или примерно 35%, меньше точно или примерно 30%, меньше точно или примерно 25%, меньше точно или примерно 20%, меньше точно или примерно 15%, меньше точно или примерно 10%, меньше точно или примерно 5%, или меньше точно или примерно 1% клеток выходной композиции истощены и/или стареют. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 25% клеток выходной композиции истощены и/или стареют. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно меньше точно или примерно 10% клеток выходной композиции истощены и/или стареют.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые являются отрицательными по экспрессии CD27 и CD28, например, поверхностной экспрессии. В конкретных вариантах осуществления, клетки выводимой композиции имеют низкую долю и/или частоту CD27-CD28-клеток. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 40%, меньше точно или примерно 35%, меньше точно или примерно 30%, меньше точно или

примерно 25%, меньше точно или примерно 20%, меньше точно или примерно 15%, меньше точно или примерно 10%, меньше точно или примерно 5% или меньше точно или примерно 1% клеток выходной композиции представляют собой CD27-CD28- клетки. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 25% клеток выходной композиции составляют CD27-CD28- клетки. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно меньше точно или примерно 10% клеток выходной композиции представляют собой CD27-CD28- клетки. В вариантах осуществления, меньше точно или примерно 5% клеток выходной композиции составляют CD27-CD28 клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по экспрессии CD27 и CD28, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах клетки выводимой композиции имеют высокую долю и/или частоту клеток CD27+CD28+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 50%, по меньшей мере, точно или примерно 60%, по меньшей мере, точно или примерно 70%, по меньшей мере, точно или примерно 75%, по меньшей мере, точно или примерно 80%, по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90%, по меньшей мере, точно или примерно 95% или по меньшей мере, точно или примерно 95% клеток выходной композиции представляют собой клетки CD27+CD28+. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 25% клеток выходной композиции представляют собой клетки CD27-CD28-. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 50% клеток выходной композиции представляют собой клетки CD27+CD28+. В вариантах осуществления, по меньшей мере, точно или примерно 75% клеток выходной композиции представляют собой клетки CD27+CD28+.

В конкретных вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток, которые представляют собой клетки T_{EMRA}. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 40%, меньше точно или примерно 35%, меньше точно или примерно 30%, меньше точно или примерно 25%, меньше точно или примерно 20%, меньше точно или примерно 15%, меньше точно или примерно 10%, меньше точно или примерно 5% или меньше точно или примерно 1% клеток выходной композиции представляют собой клетки T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 25% клеток выходной композиции представляют собой клетки T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 10% клеток выходной композиции представляют собой клетки T_{EMRA}. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 5% клеток выходной композиции представляют собой клетки T_{EMRA}.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток, отрицательных по CCR7 и положительных по CD45RA экспрессии, например поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах

осуществления, клетки выводимой композиции имеют низкую долю и/или частоту клеток CCR7-CD45RA+. В конкретных вариантах осуществления, меньше точно или примерно 40%, меньше точно или примерно 35%, меньше точно или примерно 30%, меньше точно или примерно 25%, меньше точно или примерно 20%, меньше точно или примерно 15%, меньше точно или примерно 10%, меньше точно или примерно 5% или меньше точно или примерно 1% клеток выходной композиции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 25% клеток выходной композиции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+. В конкретных вариантах осуществления, меньше точно или примерно 10% клеток выходной композиции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+. В некоторых вариантах осуществления, меньше точно или примерно 5% клеток выходной композиции представляют собой клетки CCR7-CD45RA+.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют высокую долю и/или частоту Т-клеток на ранней стадии дифференциации или Т-клеток, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках на ранней стадии дифференциации. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют большую долю и/или частоту Т-клеток на ранней стадии дифференциации, чем выходные композиции, полученные в результате альтернативных процессов, таких как процессы, которые включают размножение (например, процессы, которые включают отдельную операцию размножения и/или включают стадии, предназначенные для размножения клеток). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки на ранней стадии дифференциации могут характеризоваться положительной или высокой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) определенных клеточных маркеров и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых аспектах, Т-клетки на ранней стадии дифференциации характеризуются положительной или высокой экспрессией CCR7 и/или CD27. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки на ранней стадии дифференциации или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках на ранней стадии дифференциации, представляют собой CCR7+CD27+.

В определенных вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту Т-клеток на промежуточной стадии дифференциации или Т-клеток, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках на промежуточной стадии дифференциации. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют меньшую долю и/или частоту Т-клеток на промежуточной стадии дифференциации, чем выходные композиции, полученные в результате альтернативных процессов, таких как процессы, включающие размножение. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки на промежуточной стадии дифференциации могут характеризоваться положительной или высокой экспрессией

(например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) определенных клеточных маркеров и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки на промежуточной стадии дифференциации или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках на промежуточной стадии дифференциации, представляют собой CCR7+CD27-. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки на промежуточной стадии дифференциации или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках на промежуточной стадии дифференциации, представляют собой CCR7-CD27+. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки на промежуточной стадии дифференциации или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках на промежуточной стадии дифференциации, включают клетки, которые представляют собой CCR7+CD27-, и клетки, которые представляют собой CCR7-CD27+.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют низкую долю и/или частоту высокодифференцированных Т-клеток или Т-клеток, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на высокодифференцированных Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют более низкую долю и/или частоту высокодифференцированных Т-клеток, чем выходные композиции, полученные в результате альтернативных процессов, таких как процессы, которые включают размножение. В некоторых вариантах осуществления, высокодифференцированные Т-клетки могут характеризоваться положительной или высокой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) определенных клеточных маркеров и/или отрицательной или низкой экспрессией (например, поверхностной экспрессией или внутриклеточной экспрессией) других клеточных маркеров. В некоторых аспектах, высокодифференцированные Т-клетки характеризуются отрицательной или низкой экспрессией CCR7 и/или CD27. В некоторых вариантах осуществления, высокодифференцированные Т-клетки или Т-клетки, которые являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на высокодифференцированных Т-клетках, представляют собой CCR7-CD27-.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют большую долю и/или частоту Т-клеток на ранней стадии дифференциации (например, клеток, которые представляют собой CCR7+CD27+), меньшую долю и/или частоту Т-клеток на промежуточной стадии дифференциации (например, клеток, которые являются CCR7+CD27-, и/или клеток, которые являются CCR7-CD27+), и более низкую долю и/или частоту высокодифференцированных Т-клеток (например, клеток, которые являются CCR7-CD27-), чем выходные композиции, созданные в альтернативных процессах, таких как процессы, включающие размножение.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходных композиций имеют

большую долю и/или частоту подобных наивным клеткам и клеткам центральной памяти, чем выходные композиции, созданные в альтернативных процессах, таких как процессы, которые включают размножение. В некоторых вариантах осуществления, подобные наивным клетки и клетки центральной памяти включают клетки в различных состояниях дифференциации, включая Т-клетки на ранней стадии дифференциации, например, клетки, которые представляют собой CCR7+CD27+.

В некоторых вариантах осуществления, клетки выходной композиции имеют высокую долю и/или частоту клеток, которые являются положительными по экспрессии CCR7 и CD27, например, поверхностной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, клетки выводимой композиции имеют высокую долю и/или частоту клеток CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, меньше или меньше примерно 5%, меньше или меньше примерно 10%, меньше или меньше примерно 15%, меньше или меньше примерно 20%, меньше или меньше примерно 25% или меньше или меньше примерно 30% клеток выходной композиции представляют собой CCR7- или CD27- клетки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95%, по меньшей мере, или точно или примерно 98% или больше 98% клеток выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95% или больше 95% CD4+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CD4+ Т-клеток в выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 40% до точно или примерно 65%, от точно или примерно 40% до точно или примерно 45%, от точно или примерно 45% до точно или примерно 50%, от точно или примерно 50% до примерно 55%, от точно или примерно 55% до точно или примерно 60% или от точно или

CD8+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CD8+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, от точно или примерно 40% до точно или примерно 65%, от точно или примерно 40% до точно или примерно 45%, от точно или примерно 45% до точно или примерно 50%, от точно или примерно 50% до точно или примерно 55%, от точно или примерно 55% до точно или примерно 60% или от точно или примерно 60% до точно или примерно 65% CD8+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95% или больше 95% CAR+ Т-клеток (например, CD4+CAR+ Т-клеток и CD8+CAR+ Т-клеток) выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CAR+ Т-клеток (например, CD4 +CAR+ Т-клеток и CD8+CAR+ Т-клеток) выходной композиции представляют собой CCR7+CD27+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 30%, по меньшей мере, или точно или примерно 40%, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, по меньшей мере, или точно или примерно 70%, по меньшей мере, или точно или примерно 75%, по меньшей мере, или точно или примерно 80%, по меньшей мере, или точно или примерно 85%, по меньшей мере, или точно или примерно 90%, по меньшей мере, или точно или примерно 95% или больше 95% CAR+ Т-клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим В- и/или CD127+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или точно или примерно 50%, по меньшей мере, или точно или примерно 55%, по меньшей мере, или точно или примерно 60%, или по меньшей мере, или точно или примерно 65% CAR+ Т-клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим В- и/или CD127+.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлена терапевтическая Т-клеточная композиция, содержащая и/или обогащенная CD3+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% от общего количества рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере

мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 50% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺ CCR7⁺ и, по меньшей мере, 50% всех рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺ CCR7⁺, и, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлена терапевтическая Т-клеточная композиция, содержащая и/или обогащенная CD3⁺ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, при, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере

мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95% клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток в композиции являются CD3+ Т-клетками, по меньшей мере, 50% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти, или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти, и, по меньшей мере, 50% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти, или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти, или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти, и по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложена терапевтическая Т-клеточная композиция, содержащая и/или обогащенная CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ и рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых вариантах

осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлена терапевтическая Т-клеточная композиция, содержащая и/или обогащенная CD4+ Т-клетками и CD8+ Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор+/CD4+ и рецептор+/CD8+ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, при, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор+/CD4+ и рецептор+/CD8+ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор+/CD4+ и рецептор+/CD8+ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор+/CD4+ и рецептор+/CD8+ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной

памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток в композиции составляют CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 50% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти, и, по меньшей мере, 50% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% клеток в композиции представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти, и, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или Т-клетки центральной памяти или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описана терапевтическая Т-клеточная композиция, содержащая CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 97%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 99%, примерно 100% или 100% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описана терапевтическая Т-клеточная композиция, содержащая CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96%, по меньшей мере, или, по

по меньшей мере, примерно 90% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых аспектах, по меньшей мере, 90% клеток в композиции представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 60% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 40% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых аспектах, по меньшей мере, 90% клеток в композиции представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 70% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 50% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых аспектах, по меньшей мере, 90% клеток в композиции представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 70% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 60% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых аспектах, по меньшей мере, 95% клеток в композиции представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 70% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 70% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺. В некоторых аспектах, по меньшей мере, 95% клеток в композиции представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, по меньшей мере, 80% всего рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и, по меньшей мере, 80% всего рецептор⁺/CD4⁺ клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺.

В любом из предыдущих вариантов осуществления, доля клеток, положительных/отрицательных по одному или нескольким маркерам (например, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7 или CD45RA и т. д.) в клеточной популяции или композиции может быть средней, средней или медианной долей от множества выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом. В некоторых вариантах осуществления, доля положительных по маркеру клеток в клеточной популяции или композиции представляет собой среднее таких долей от множества выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом. В некоторых вариантах осуществления, множество выходных композиций получают способом, описанным в настоящем документе, из множества входных композиций, которые могут быть получены из одного и того же биологического образца или разных биологических образцов (например, РВМС или образца афереза или лейкофереза), например, от одного и того же донора или разных доноров. В некоторых аспектах, среднее значение основано на множестве примерно или, по меньшей мере, примерно 5, примерно или, по меньшей мере, примерно 10, примерно или, по меньшей мере, примерно 15, примерно или, по меньшей мере, примерно 20, примерно или, по меньшей мере, примерно 25, примерно или по меньшей мере, по меньшей мере, примерно 30, примерно или, по меньшей мере, примерно 35, примерно или, по меньшей мере, примерно 40, примерно

или, по меньшей мере, примерно 45, примерно или, по меньшей мере, примерно 50, примерно или, по меньшей мере, примерно 55, примерно или, по меньшей мере, примерно 60, примерно или, по меньшей мере, примерно 100 или больше примерно 100 выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом.

В некоторых вариантах осуществления, где в среднем во множестве выходных композиций (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5), полученных данным способом, по меньшей мере, точно или примерно, или точно или примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% всего Т-клеток в композиции или всего Т-клеток в композиции, экспрессирующей рекомбинантный белок, представляют собой CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, в среднем, во множестве выходных композиций (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5), полученных данным способом, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% всего рецептор⁺/CD4⁺ и рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках (например, CD27+CCR7+-клетках). В некоторых вариантах осуществления, множество (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5) выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом, в среднем содержат, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% подобных наивным Т-клеток или Т-клеток центральной памяти, или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной памяти, из всего рецептор⁺/CD4⁺ и рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции. В некоторых вариантах осуществления, множество (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5) выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом, в среднем содержат, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток CD27+CCR7+ из всего рецептор⁺/CD4⁺ и рецептор⁺/CD8⁺ клеток в композиции. В некоторых вариантах осуществления, множество (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5) выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом, в среднем составляют, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% CD3⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, множество (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5) выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом, в среднем содержат, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% подобных наивным Т-клеток или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках (например, клетках CD27+CCR7+), из всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции. В некоторых вариантах осуществления, множество (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5) выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом, в среднем содержат, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% подобных наивным Т-клеток или Т-клеток центральной памяти, или являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на подобных наивным Т-клетках или Т-клетках центральной

памяти, из всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции. В некоторых вариантах осуществления, множество (например, примерно или, по меньшей мере, примерно 5) выходных композиций, полученных описанным в настоящем документе способом, в среднем содержат, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток CD27+CCR7+ от всего рецептор⁺/CD3⁺ клеток в композиции.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит Т-клетки, содержащие гетерологичный или рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий анти-CD19 CAR, интегрированный в геномы Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, интегрированное число копий вектора (iVCN) клеток в композиции в среднем составляет примерно или, по меньшей мере, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 или больше 5 на диплоидный геном. В конкретных вариантах осуществления, iVCN CAR⁺ клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 3,0 копий на диплоидный геном, включительно. В конкретных вариантах осуществления, iVCN CAR⁺ клеток в композиции в среднем составляет примерно 0,4, примерно 0,5, примерно 0,6, примерно 0,7, примерно 0,8, примерно 0,9, примерно 1,0, примерно 1,1, примерно 1,2, примерно 1,3, примерно 1,4, примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,7, примерно 1,8, примерно 1,9, примерно 2,0, примерно 2,1, примерно 2,2, примерно 2,3, примерно 2,4, примерно 2,5, примерно 2,6, примерно 2,7, примерно 2,8, примерно 2,9 или примерно 3,0 копий на диплоидный геном, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, доля iVCN по отношению к общему числу копий вектора (VCN) в диплоидном геноме популяции трансформированных клеток в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,9, например, составляет по меньшей мере, или составляет примерно 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или находится в пределах допустимой ошибки, например, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$. В некоторых вариантах осуществления, доля iVCN от общего числа копий вектора (VCN) в диплоидном геноме популяции трансформированных клеток в среднем составляет или составляет примерно 0,8 или находится в пределах допустимой ошибки.

В некоторых вариантах осуществления, общее количество копий вектора (VCN) клеток в композиции составляет в среднем меньше или меньше примерно 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 копии, включительно. В некоторых вариантах осуществления, общее число копий вектора (VCN) CD3⁺ клеток в композиции составляет в среднем меньше или меньше примерно 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 копии включительно. В некоторых вариантах осуществления, общее количество копий вектора (VCN) CD3⁺CAR⁺ клеток в композиции составляет в среднем меньше или меньше примерно 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 копии, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, композиция включает остаточные стимулирующие реагенты, например, стимулирующие реагенты, не удаленные ни одним из способов, описанных в Разделе II-C-6. В некоторых вариантах осуществления остаточные стимулирующие реагенты включают любые олигомерные стимулирующие реагенты, описанные в Разделе II-C-2. В некоторых вариантах осуществления, остаточные

стимулирующие реагенты включают любой из олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, описанных в Разделе II-C-2. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от 50 до 2000 нг/мл остаточного стимулирующего реагента, например, между или между примерно 50 и 1900 нг/мл, 50 и 1800 нг/мл, 50 и 1700 нг/мл, 50 и 1600 нг/мл, 50 и 1500 нг/мл, 50 и 1400 нг/мл, 50 и 1300 нг/мл, 50 и 1200 нг/мл, 50 и 1100 нг/мл, 50 и 1000 нг/мл, 50 и 900 нг/мл, 50 и 800 нг/мл, 50 и 700 нг/мл, 50 и 600 нг/мл, 50 и 500 нг/мл, 50 и 400 нг/мл, 50 и 300 нг/мл, 50 и 200 нг/мл, 50 и 100 нг/мл, 100 и 2000 нг/мл, 100 и 1900 нг/мл, 100 и 1800 нг/мл, 100 и 1700 нг/мл, 100 и 1600 нг/мл, 100 и 1500 нг/мл, 100 и 1400 нг/мл, 100 и 1300 нг/мл, 100 и 1200 нг/мл, 100 и 1100 нг/мл, 100 и 1000 нг/мл, 100 и 900 нг/мл, 100 и 800 нг/мл, 100 и 700 нг/мл, 100 и 600 нг/мл, 100 и 500 нг/мл, 100 и 400 нг/мл, 100 и 300 нг/мл, 100 и 200 нг/мл, 200 и 2000 нг/мл, 200 и 1900 нг/мл, 200 и 1800 нг/мл, 200 и 1700 нг/мл, 200 и 1600 нг/мл, 200 и 1500 нг/мл, 200 и 1400 нг/мл, 200 и 1300 нг/мл, 200 и 1200 нг/мл, 200 и 1100 нг/мл, 200 и 1000 нг/мл, 200 и 900 нг/мл, 200 и 800 нг/мл, 200 и 700 нг/мл, 200 и 600 нг/мл, 200 и 500 нг/мл, 200 и 400 нг/мл, 200 и 300 нг/мл, 300 и 2000 нг/мл, 300 и 1900 нг/мл, 300 и 1800 нг/мл, 300 и 1700 нг/мл, 300 и 1600 нг/мл, 300 и 1500 нг/мл, 300 и 1400 нг/мл, 300 и 1300 нг/мл, 300 и 1200 нг/мл, 300 и 1100 нг/мл, 300 и 1000 нг/мл, 300 и 900 нг/мл, 300 и 800 нг/мл, 300 и 700 нг/мл, 300 и 600 нг/мл, 300 и 500 нг/мл, 300 и 400 нг/мл, 400 и 2000 нг/мл, 400 и 1900 нг/мл, 400 и 1800 нг/мл, 400 и 1700 нг/мл, 400 и 1600 нг/мл, 400 и 1500 нг/мл, 400 и 1400 нг/мл, 400 и 1300 нг/мл, 400 и 1200 нг/мл, 400 и 1100 нг/мл, 400 и 1000 нг/мл, 400 и 900 нг/мл, 400 и 800 нг/мл, 400 и 700 нг/мл, 400 и 600 нг/мл, 400 и 500 нг/мл, 500 и 2000 нг/мл, 500 и 1900 нг/мл, 500 и 1800 нг/мл, 500 и 1700 нг/мл, 500 и 1600 нг/мл, 500 и 1500 нг/мл, 500 и 1400 нг/мл, 500 и 1300 нг/мл, 500 и 1200 нг/мл, 500 и 1100 нг/мл, 500 и 1000 нг/мл, 500 и 900 нг/мл, 500 и 800 нг/мл, 500 и 700 нг/мл, 500 и 600 нг/мл, 600 и 2000 нг/мл, 600 и 1900 нг/мл, 600 и 1800 нг/мл, 600 и 1700 нг/мл, 600 и 1600 нг/мл, 600 и 1500 нг/мл, 600 и 1400 нг/мл, 600 и 1300 нг/мл, 600 и 1200 нг/мл, 600 и 1100 нг/мл, 600 и 1000 нг/мл, 600 и 900 нг/мл, 600 и 800 нг/мл, 600 и 700 нг/мл, 700 и 2000 нг/мл, 700 и 1900 нг/мл, 700 и 1800 нг/мл, 700 и 1700 нг/мл, 700 и 1600 нг/мл, 700 и 1500 нг/мл, 700 и 1400 нг/мл, 700 и 1300 нг/мл, 700 и 1200 нг/мл, 700 и 1100 нг/мл, 700 и 1000 нг/мл, 700 и 900 нг/мл, 700 и 800 нг/мл, 800 и 2000 нг/мл, 800 и 1900 нг/мл, 800 и 1800 нг/мл, 800 и 1700 нг/мл, 800 и 1600 нг/мл, 800 и 1500 нг/мл, 800 и 1400 нг/мл, 800 и 1300 нг/мл, 800 и 1200 нг/мл, 800 и 1100 нг/мл, 800 и 1000 нг/мл, 800 и 900 нг/мл, 900 и 2000 нг/мл, 900 и 1900 нг/мл, 900 и 1800 нг/мл, 900 и 1700 нг/мл, 900 и 1600 нг/мл, 900 и 1500 нг/мл, 900 и 1400 нг/мл, 900 и 1300 нг/мл, 900 и 1200 нг/мл, 900 и 1100 нг/мл, 900 и 1000 нг/мл, 1000 и 2000 нг/мл, 1000 и 1900 нг/мл, 1000 и 1800 нг/мл, 1000 и 1700 нг/мл, 1000 и 1600 нг/мл, 1000 и 1500 нг/мл, 1000 и 1400 нг/мл, 1000 и 1300 нг/мл, 1000 и 1200 нг/мл, 1000 и 1100 нг/мл, 1100 и 2000 нг/мл, 1100 и 1900 нг/мл, 1100 и 1800 нг/мл, 1100 и 1700 нг/мл, 1100 и 1600 нг/мл, 1100 и 1500 нг/мл, 1100 и 1400 нг/мл, 1100 и 1300 нг/мл, 1100 и 1200 нг/мл, 1200 и 2000 нг/мл, 1200 и 1900 нг/мл, 1200 и 1800 нг/мл, 1200 и 1700 нг/мл, 1200 и 1600 нг/мл, 1200 и 1500 нг/мл, 1200 и 1400 нг/мл, 1200 и 1300 нг/мл, 1300 и 2000 нг/мл, 1300 и 1900 нг/мл, 1300 и 1800 нг/мл, 1300 и

1700 нг/мл, 1300 и 1600 нг/мл, 1300 и 1500 нг/мл, 1300 и 1400 нг/мл, 1400 и 2000 нг/мл, 1400 и 1900 нг/мл, 1400 и 1800 нг/мл, 1400 и 1700 нг/мл, 1400 и 1600 нг/мл, 1400 и 1500 нг/мл, 1500 и 2000 нг/мл, 1500 и 1900 нг/мл, 1500 и 1800 нг/мл, 1500 и 1700 нг/мл, 1500 и 1600 нг/мл, 1600 и 2000 нг/мл, 1600 и 1900 нг/мл, 1600 и 1800 нг/мл, 1600 и 1700 нг/мл, 1700 и 2000 нг/мл, 1700 и 1900 нг/мл, 1700 и 1800 нг/мл, 1800 и 2000 нг/мл, 1800 и 1900 нг/мл, от 1900 и 2000 нг/мл, каждый включительно.

В настоящем документе также описан способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), включающий введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие CAR, который таргетирует CD19, где вводимая композиция производится с помощью производственного процесса для получения выходной композиции, демонстрирующей заданную характеристику, где повторы производственного процесса производят множество выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, при выполнении среди множества различных индивидуальных субъектов, у которых заданная характеристика выходной композиции среди множества выходных композиций выбрана из характеристик композиции, описанных в Разделе III, в любой комбинации, включая долю CD3⁺ клеток, соотношения CD4⁺/CD8⁺ или CD4CAR⁺/CD8⁺CD8⁺ клеток, долю клеток, экспрессирующих маркер апоптоза, долю менее дифференцированных клеток и iVCN и значения iVCN/VCN.

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины в области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях, термины с общепринятыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в настоящем документе не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники.

Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков и не ограничиваются минимальной длиной. Полипептиды, включая предоставленные рецепторы и другие полипептиды, например, линкеры или пептиды, могут включать аминокислотные остатки, в том числе природные и/или неприродные аминокислотные остатки. Термины также включают модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиалирование, ацетилирование и фосфорилирование. В некоторых аспектах, полипептиды могут содержать модификации по отношению к нативной или природной последовательности до тех пор, пока белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, в результате направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или

ошибок из-за ПЦР амплификации.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, субъект, например пациент, которому вводят агент или агенты, клетки, клеточные популяции или композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых вариантах осуществления, примат представляет собой мартышку или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной, и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и пожилых людей. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является млекопитающее, не относящееся к приматам, такое как грызун.

Используемый в настоящем документе термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «лечение») относится к полному или частичному улучшению или уменьшению заболевания, состояния или нарушения, или симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или фенотипа, связанного с ним. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничены ими, профилактику возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, профилактику метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или паллиативное лечение, болезненное состояние, ремиссию или улучшение прогноза. Эти термины не подразумевают полное излечение заболевания или полное устранение любого симптома или воздействия на все симптомы или исходы.

Используемый в настоящем документе термин «задержка развития заболевания» означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию, подавление и/или отсрочку развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть разной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, проходящего лечение. В некоторых вариантах осуществления, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать профилактику в том смысле, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов, может быть отсрочена.

«Профилактика», как используется в данном документе, включает проведение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. В некоторых вариантах осуществления, предложенные клетки и композиции используют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

Используемый в настоящем документе термин «подавить» функцию или активность означает снижение функции или активности по сравнению с теми же условиями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, подавляющие рост

опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

«Эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава, клеток или композиции, в контексте введения относится к количеству, эффективному в дозах/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, например как лечебный или профилактический результат.

«Терапевтически эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава или клеток, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния, или нарушения, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес субъекта, а также популяции вводимых клеток. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество. В контексте меньшей опухолевой массы, профилактически эффективное количество в некоторых аспектах, будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «примерно» значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые связаны с этим значением или параметром как таковым.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Например, «a» или «an» означает «по меньшей мере, один» или «один или несколько».

На протяжении всего этого описания, различные аспекты заявленного объекта представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема заявленного предмета изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, когда предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим

установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне охватывается заявленным предметом изобретения. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также охватываются заявленным объектом, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включаются в заявленный объект изобретения. Это применимо независимо от широты диапазона.

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой смеси двух или нескольких продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, неводный или любая их комбинация.

Используемый в настоящем документе термин «обогащение» применительно к одному или нескольким конкретным типам клеток или клеточной популяции относится к увеличению числа или долевого содержания клеточного типа или популяции, например, по сравнению с общим числом клеток в или объеме композиции, или по отношению к другим типам клеток, например, путем положительной селекции на основе маркеров, экспрессируемых популяцией или клеткой, или путем отрицательной селекции на основе маркера, отсутствующего в клеточной популяции или клетке, подлежащей истощению. Термин не требует полного удаления других клеток, типов клеток или популяций из композиции и не требует, чтобы клетки, обогащенные таким образом, присутствовали в обогащенной композиции на уровне или даже близком к 100%.

В контексте настоящего документа утверждение о том, что клетка или популяция клеток является «положительной» в отношении определенного маркера, относится к выявляемому присутствию на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин относится к наличию поверхностной экспрессии, выявляемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание выявляется с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем уровень окрашивания, обнаруженный при проведении той же процедуры с изотипически подобранным контролем или контролем гейтирования флуоресценция минус один (FMO) при идентичных в остальных условиях и/или на уровне, существенно сходным с уровнем для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера и/или на уровне, значительно превышающем уровень для клеток, о которых известно, что они являются отрицательными в отношении маркера.

В контексте настоящего документа утверждение о том, что клетка или популяция клеток являются «отрицательными» в отношении определенного маркера, относится к отсутствию существенного обнаруживаемого присутствия на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, выявляемой с помощью

проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание не выявляется с помощью проточной цитометрии на уровне, значительно превышающем уровень окрашивания, обнаруженный при выполнении той же процедуры с контрольным изотипом или контрольным гейтированием флуоресценция минус один (FMO) при идентичных в остальном условиях, и/или на уровне, существенно более низком, чем уровень для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера, и/или на уровне, существенно сходном с таковым для клеток, о которых известно, что они являются отрицательными в отношении маркера.

Термин «вектор», используемый в данном документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самовоспроизводящуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии».

V. ТИПОВЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Среди предложенных вариантов осуществления:

1. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

2. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 2,5:1;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

3. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:1 до примерно 2,5:1;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 50×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки.

4. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (т/г В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип подобный наивному или центральной памяти.

5. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (т/г В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и/или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD8⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺.

6. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-

клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные T-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ T-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ T-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих T-клеток до точно или примерно 50×10^6 CAR-экспрессирующих T-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки;

и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ T-клеток в композиции имеют фенотип подобный наивному или центральной памяти.

7. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (т/г В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные T-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ T-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ T-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих T-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих T-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и

доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR⁺ T-клетках в композиции в среднем меньше или меньше примерно 0,9.

8. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (т/г В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные T-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ T-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ T-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих T-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих T-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и

интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ T-клеток в композиции в среднем составляет между или между примерно 0,4 копии на диплоидный геном и 3,0 копиями на диплоидный геном, включительно.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где композиция содержит

CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2 до примерно 2:1, от примерно 1:1,5 до примерно 1,5:1 или точно или примерно 1:1.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:1 до примерно 2,5:1, от примерно 1,5:1 до примерно 2:1, точно или примерно 1,5:1 или точно или примерно 2:1.

11. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-10, где композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

12. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-10, где композиция содержит от точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

13. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-10, где композиция содержит точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

14. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-10, где композиция содержит точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

15. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-10, где композиция содержит точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

16. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-15, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 93%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где от точно или примерно 5% до точно или примерно 30%, необязательно, от точно или примерно 5% до точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где от точно или примерно 10% до точно или примерно 15% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где от точно или примерно 15% до точно или примерно 20% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где от точно или примерно 20% до точно или примерно 25% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где от точно или примерно 25% до точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют

маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

22. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-16, где точно или примерно 5%, точно или примерно 10%, точно или примерно 15%, точно или примерно 20%, точно или примерно 25%, или точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где от точно или примерно 80% до точно или примерно 85% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

24. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-22, где от точно или примерно 85% до точно или примерно 90% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где от точно или примерно 90% до точно или примерно 95% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

27. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти.

29. Способ по варианту осуществления 28, где маркер, экспрессируемый на Т-клетке подобной наивной или центральной памяти, выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD27, CD28 и CCR7.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ и/или CD62L⁻CCR7⁺.

31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, где от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95%, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ и/или CD62L⁻CCR7⁺.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, где точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ и/или CD62L⁻CCR7⁺.

или, по меньшей мере, примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 1-48, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 1-48, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

51. Способ по любому из вариантов осуществления 1-48, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 1-48, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 1-48, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

54. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,9 до точно или примерно 0,8.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,8.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,8 до точно или примерно 0,7.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,7 до точно или примерно 0,6.

58. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,6 до точно или примерно 0,5.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к общему VCN в CAR^+ Т-клетках в

композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,5 до точно или примерно 0,4.

60. Способ по любому из вариантов осуществления 1-59, где интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,8 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

61. Способ по любому из вариантов осуществления 1-59, где интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,8 копии на диплоидный геном до 1,0 копии на диплоидный геном, включительно.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-59, где интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 1,0 копии на диплоидный геном до 1,5 копий на диплоидный геном, включительно.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 1-59, где интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 1,5 копий на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где r/t В-клеточная NHL выбрана из группы, состоящей из: диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), необязательно, неуточненной DLBCL (DLBCL NOS; включая de novo или трансформированную DLBCL, например, из фолликулярной лимфомы или лимфомы маргинальной зоны); В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (HGBCL), необязательно HGBCL с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL; первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL); и фолликулярной лимфомы (FL), необязательно, фолликулярной лимфомы степени 3b (FL3B).

65. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где r/t В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где r/t В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому, неуточненную.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где r/t В-клеточная NHL представляет собой de novo диффузную В-крупноклеточную лимфому.

68. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где r/t В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому, трансформированную из фолликулярной лимфомы.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где r/t В-клеточная NHL представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому, трансформированную из лимфомы маргинальной зоны.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где r/t В-клеточная NHL представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности (HGBCL).

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с гистологией DLBCL.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL представляет собой лимфому с двумя транслокациями или лимфому с тремя транслокациями.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL представляет собой первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL представляет собой фолликулярную лимфому.

76. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL представляет собой фолликулярную лимфому степени 3b.

77. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где г/г В-клеточная NHL подтверждена гистологически.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 1-77, где во время или непосредственно перед введением композиции сконструированных Т-клеток у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения или он стал невосприимчивым к: (i) двум или нескольким предшествующим терапиям г/г В-клеточной NHL и/или (ii) терапии трансплантацией аутологичных стволовых клеток (ASCT).

79. Способ по варианту осуществления 78, где во время или непосредственно перед введением композиции сконструированных Т-клеток у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым после лечения двумя или несколькими предшествующими терапиями г/г В-клеточной NHL.

80. Способ по варианту осуществления 78, где во время или непосредственно перед введением композиции сконструированных Т-клеток у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым после лечения тремя или несколькими предшествующими терапиями г/г В-клеточной NHL.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 78-80, где две или несколько предшествующих терапий г/г В-клеточной NHL не включают другую дозу клеток, экспрессирующих CAR.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 78-81, где две или несколько предшествующих терапий включают антрациклин и агент, таргетирующий CD20.

83. Способ по любому из вариантов осуществления 78-82, где две или несколько предшествующих терапий не включают те, которые назначались для предшествующей индолентной лимфомы.

84. Способ по любому из вариантов осуществления 78-83, где две или несколько предшествующих терапий не включают антрациклин, назначаемый для индолентной

DLBCL.

85. Способ по любому из вариантов осуществления 78-84, где две или несколько предшествующих терапий включают агент, таргетирующий CD20, и две или несколько предшествующих терапий могут исключать антрациклин, если он назначается для предшествующей индолентной лимфомы.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 82-85, где агент, таргетирующий CD20, содержит анти-D20 моноклональное антитело.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 82-86, где агент, таргетирующий CD20, содержит ритуксимаб.

88. Способ по любому из вариантов осуществления 1-77, где во время или непосредственно перед введением композиции сконструированных Т-клеток у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчив после терапии трансплантацией аутологичных стволовых клеток (ASCT).

89. Способ воплощения 88, где субъекта имеет рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению DLBCL.

90. Способ по варианту осуществления 88 или 89, где ASCT не дает объективного ответа (частичный ответ (PR) или лучше).

91. Способ по любому из вариантов осуществления 78-90, где после ASCT заболевание субъекта прогрессирует.

92. Способ по любому из вариантов осуществления 1-91, где во время или до введения композиции клеток у субъекта было выявлено агрессивное заболевание, или заболевание высокого риска, или субъект имел плохой прогноз.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 1-92, где во время или до введения композиции клеток у субъекта было выявлено не поддающееся химиотерапии заболевание или хроническое или рецидивирующее заболевание после химиотерапии.

94. Способ по любому из вариантов осуществления 1-93, где у субъекта имеется патологически подтвержденное вторичное поражение центральной нервной системы (ЦНС) злокачественным новообразованием.

95. Способ по любому из вариантов осуществления 1-94, где у субъекта нет поражения только центральной нервной системы (ЦНС) злокачественным новообразованием.

96. Способ по любому из вариантов осуществления 1-95, где субъект ранее не получал терапию CAR Т-клетками или генетически модифицированными Т-клетками.

97. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-96, где субъект ранее не получал CD19-таргетную терапию, такую как анти-CD19 моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

98. Способ по любому из вариантов осуществления 1-97, дополнительно включающий получение образца лейкофереза от субъекта для изготовления композиции сконструированных Т-клеток.

99. Способ по варианту осуществления 98, где субъект не получал

терапевтическую дозу кортикостероида, необязательно в течение точно или примерно 14 дней до момента проведения лейкафереза.

100. Способ по варианту осуществления 98 или 99, где субъект не получал цитотоксический химиотерапевтический агент, который не является лимфотоксическим химиотерапевтическим агентом или интратекальной терапией, в течение точно или примерно 7 дней до момента проведения лейкафереза.

101. Способ по любому из вариантов осуществления 98-100, где субъект не получал лимфотоксический химиотерапевтический агент в течение точно или примерно 4 недель до момента проведения лейкафереза.

102. Способ по любому из вариантов осуществления 98-101, где субъект не получал иммунодепрессивную терапию в течение точно или примерно 4 недель до момента проведения лейкафереза.

103. Способ по любому из вариантов осуществления 98-102, где субъект не подвергался облучению в течение точно или примерно 6 недель до момента проведения лейкафереза.

104. Способ по любому из вариантов осуществления 98-103, где субъекту не проводили трансплантацию аутологичных стволовых клеток в течение точно или примерно 3 месяцев до момента проведения лейкафереза.

105. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-104, где субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию.

106. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-105, где субъект не достиг объективного ответа (частичный ответ (PR) или лучше) в ответ на предшествующую терапию.

107. Способ по любому из вариантов осуществления 1-106, где во время или до введения композиции клеток субъект оценивается на наличие лимфомы, ассоциированной с или включающей поражение центральной нервной системы (ЦНС) или вторичной лимфомы ЦНС.

108. Способ по любому из вариантов осуществления 1-107, где во время или до введения композиции клеток субъект имеет или был идентифицирован как имеющий:

адекватную сердечную функцию, необязательно с фракцией выброса левого желудочка (LVEF) точно или примерно 40%, больше 40% или больше примерно 40%; и/или

адекватную функцию почек, необязательно с расчетным клиренсом креатинина точно или примерно 45 мл/мин, больше 45 мл/мин или больше примерно 45 мл/мин; и/или

адекватную функцию печени, необязательно с аспартатаминотрансферазой (AST) и аланинаминотрансферазой (ALT) точно или менее чем в 2,5 раза от верхней границы нормы (ULN) и общим билирубином меньше чем в 1,5 раза от ULN; и/или

адекватную функцию легких, необязательно с одышкой \leq степени 1 по STCAE и насыщением кислородом (например, $\text{SaO}_2 \geq 92\%$) на комнатном воздухе.

109. Способ по любому из вариантов осуществления 1-108, где во время или до

введения композиции клеток субъект имеет или был идентифицирован как имеющий абсолютное количество нейтрофилов (ANC) точно или примерно $1,0 \times 10^9$ клеток/л, больше $1,0 \times 10^9$ клеток/л или больше примерно $1,0 \times 10^9$ клеток/л без поддержки фактора роста.

110. Способ по любому из вариантов осуществления 1-109, где во время или до введения композиции клеток субъект имеет или был идентифицирован как имеющий тромбоциты точно или примерно 50×10^9 клеток/л, больше 50×10^9 клеток/л или больше 50×10^9 клеток/л без трансфузионной поддержки.

111. Способ по любому из вариантов осуществления 1-110, где во время или до введения композиции клеток субъект получил переходную химиотерапию между моментом проведения лейкафереза для получения композиции сконструированных Т-клеток и введением композиции сконструированных клеток.

112. Способ по любому из вариантов осуществления 1-111, где во время или до введения композиции клеток субъект получил переходную химиотерапию для контроля заболевания после предшествующей терапии.

113. Способ по любому из вариантов осуществления 1-112, где субъект имеет или был идентифицирован как имеющий общее состояние по оценке Восточной объединенной онкологической группы (ECOG PS) 0 или 1.

114. Способ по любому из вариантов осуществления 1-113, где до введения композиции клеток субъект имеет или был идентифицирован как имеющий исходное высокое опухолевое бремя, например, измеренное по сумме произведений перпендикулярных диаметров (SPD), или высокий уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке (LDH), такой как $LDH \geq 500$ ЕД/л.

115. Способ по любому из вариантов осуществления 1-114, где во время или до введения композиции клеток у субъекта имеется заболевание, положительное по результатам позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

116. Способ по любому из вариантов осуществления 1-115, дополнительно включающий, перед введением клеточной композиции, идентификацию или выбор субъекта для введения клеточной композиции.

117. Способ по любому из вариантов осуществления 1-116, где перед введением субъекту была предварительно проведена противолимфомная терапия.

118. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-117, где способ дополнительно включает, непосредственно перед введением дозы клеток, введение субъекту противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфамида.

119. Способ воплощения 117 или 118, где введение композиции клеток и/или противолимфомной терапии осуществляется амбулаторно, например, не в центре медицинской помощи третьего уровня.

120. Способ по любому из вариантов осуществления 117-119, где противолимфомная терапия включает введение флударабина в дозе 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, ежедневно, и циклофосфамида в дозе 300 мг/м^2 площади

поверхности тела субъекта, ежедневно, в течение 3 дней.

121. Способ по любому из вариантов осуществления 117-120, где композицию сконструированных Т-клеток вводят в период от точно или примерно 48 часов до точно или примерно 9 дней, включительно, после завершения противолимфомной терапии.

122. Способ по любому из вариантов осуществления 117-121, где клиренс креатинина у субъекта составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 30 мл/мин при получении противолимфомной терапии.

123. Способ по любому из вариантов осуществления 1-122, где до начала введения композиции клеток субъекту не вводили агент или лечение для лечения или профилактики, или уменьшения, или ослабления нейротоксичности и/или синдрома высвобождения цитокинов или его риска.

124. Способ по любому из вариантов осуществления 1-123, дополнительно включающий введение субъекту агента или лечения для лечения или профилактики, или снижения, или ослабления нейротоксичности и/или синдрома высвобождения цитокинов, или его риска.

125. Способ воплощения 123 или 124, где агент представляет собой или содержит анти-IL-6 антитело, антитело против рецептора IL-6 или стероид.

126. Способ по любому из вариантов осуществления 123-125, где агент представляет собой или содержит тоцилизумаб или метилпреднизолон.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 1-126, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

128. Способ по любому из вариантов осуществления 1-127, где Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

129. Способ по любому из вариантов осуществления 1-128, где:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR);

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR, демонстрируют CR, который сохраняется в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR к одному месяцу и/или к 3 месяцам, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования, в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев и/или точно или больше 9 месяцев после достижения CR; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR);

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR, демонстрируют OR, который сохраняется в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3

месяцев и/или точно или больше 6 месяцев после достижения OR.

130. Способ по любому из вариантов осуществления 1-129, где:

по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR);

по меньшей мере, 60% субъектов, достигших CR, демонстрируют CR, который длится в течение точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60% субъектов, достигших CR к 1 месяцу и/или к 3 месяцам, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение точно или больше 6 месяцев после достижения CR; и/или

по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR);

по меньшей мере, 60% субъектов, достигших OR, демонстрируют OR, который сохраняется в течение точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 50% субъектов, достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 6 месяцев после достижения OR.

131. Способ по варианту осуществления 129 или 130, где:

CR или OR является устойчивым в течение больше 3 месяцев или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают CR, который является устойчивым в течение больше 3 месяцев или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу и достигших CR, остаются в CR или остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев или точно или больше 9 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу, которые достигли CR через один месяц и/или через 3 месяца, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования, в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев и/или точно или больше 9 месяцев; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR);

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов достигают OR, который является устойчивым в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу и достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев.

132. Способ по любому из вариантов осуществления 1-131, где клетки являются

аутологичными по отношению к субъекту, и

минимальное абсолютное число лимфоцитов (ALC) для афереза не требуется и/или не указывается для проведения терапии; и/или

клетки продуцируются в процессе, который, по меньшей мере, у 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% субъектов, страдающих заболеванием или состоянием, или выбранной популяции субъектов, способен создавать клеточный продукт для введения в соответствии со способом.

133. Способ по любому из вариантов осуществления 1-132, где:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR) или ремиссии заболевания ЦНС;

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR, остаются в CR в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR или ремиссии заболевания ЦНС через один месяц и/или через 3 месяца, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования, в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев и/или точно или больше 9 месяцев; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR) или ремиссии заболевания ЦНС;

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR, в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR или ремиссии заболевания ЦНС, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев; и/или

поражение головного мозга уменьшается в размере или объеме на больше или больше примерно 25%, 50%, 75% или больше; и/или

уменьшение или ремиссия или устранение заболевания ЦНС достигается, по меньшей мере, у 35%, по меньшей мере, у 40% или, по меньшей мере, у 50% субъектов, получавших лечение по способу.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 1-133, где:

больше или больше примерно 50%, примерно 60%, примерно 70% или примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют степень нейротоксичности 3 или выше, и/или больше 40%, 50% или 55% не демонстрируют нейротоксичность или CRS.

135. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-134, где больше или больше примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром

высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

136. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-135, где больше 95% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют CRS 3 степени или выше.

137. Способ по любому из вариантов осуществления 1-136, где больше 85% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

138. Способ по любому из вариантов осуществления 1-137, где:

больше или больше примерно 30%, 35%, 40% или 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какой-либо степени синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и/или

по меньшей мере, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют начала CRS ранее, чем через 3 дня после начала введения и/или не демонстрируют нейротоксичность ранее, чем через 5 дней после начала введения; и/или

медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, находится точно или после медианного пика или среднего времени до разрешения CRS у субъектов, получавших лечение по способу, и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу больше, чем точно или примерно 8, 9, 10 или 11 дней.

139. Способ по любому из вариантов осуществления 1-138, где:

больше или больше примерно 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какой-либо степени синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и/или

по меньшей мере, точно или примерно 45% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют проявления CRS ранее, чем через 3 дня после начала введения, и/или не демонстрируют проявления нейротоксичности ранее, чем через 5 дней после начала введения; и/или

медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, находится точно или после медианного пика или среднего времени до разрешения CRS у субъектов, получавших лечение по способу, и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу больше, чем точно или примерно 8 дней.

140. Способ по любому из вариантов осуществления 1-139, где:

по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR);

по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR); и

больше или больше примерно 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какой-либо степени синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или

нейротоксичности; и

больше или больше примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

141. Способ по любому из вариантов осуществления 1-140, где:

CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для антигена, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая необязательно представляет собой 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, который необязательно представляет собой CD3дзета;

CAR включает, по порядку, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для антигена, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM; или

CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий цепь CD3-дзета (CD3 ζ) и костимулирующую сигнальную область, которая представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

142. Способ по любому из вариантов осуществления 1-141, где CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из CD3дзета.

143. Способ по варианту осуществления 142, где антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

144. Способ по варианту осуществления 143, где scFv содержит аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) и/или аминокислотную последовательность DYGVVS (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40) или где scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи FMC63 и вариабельную область легкой цепи FMC63 и/или последовательность CDRL1 FMC63, последовательность CDRL2 FMC63, последовательность CDRL3 FMC63, последовательность CDRH1 FMC63, последовательность CDRH2 FMC63 и последовательность CDRH3 FMC63 или связывается с тем же эпитопом, что и любой из вышеперечисленных, или конкурирует за связывание с любым из вышеперечисленных, и необязательно, где scFv содержит, по порядку, VH, линкер, необязательно содержащий SEQ ID NO: 24, и VL, и/или scFv содержит гибкий линкер и/или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

145. Способ по варианту осуществления 143 или 144, где scFv содержит

вариабельную область тяжелой цепи FMC63 и вариабельную область легкой цепи FMC63.

146. Способ по любому из вариантов осуществления, 141-145, где костимулирующая сигнальная область представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

147. Способ по любому из вариантов осуществления 141-146, где костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

148. Способ по любому из вариантов осуществления, 141-147, где первичный сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3дзета.

149. Способ по любому из вариантов осуществления 141-148, где первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющие, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

150. Способ по любому из вариантов осуществления, 141-149, где CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv.

151. Способ согласно варианту осуществления 150, где спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, необязательно шарнира IgG4 или его модифицированной версии.

152. Способ по варианту осуществления 150 или 151, где спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот.

153. Способ по любому из вариантов осуществления 150-152, где:

спейсер имеет или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или варианта любой из вышеперечисленных, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности; и/или

спейсер содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин.

154. Способ по любому из вариантов осуществления 150-153, где:

спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который (а) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно шарнира IgG4 или его модифицированной версии, и/или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (с) имеет длину примерно 12 аминокислот и/или содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно IgG4 или его модифицированной версии; или (d) имеет или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности, кодируемой SEQ

ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или варианта любой из предыдущих, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности, или (е) содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин; и/или

костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности; и/или

первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющие, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности; и/или

scFv содержит аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) и/или аминокислотную последовательность DYGVVS (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40), или где scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63 и/или последовательность CDRL1 FMC63, последовательность CDRL2 FMC63, последовательность CDRL3 FMC63, последовательность CDRH1 FMC63, последовательность CDRH2 FMC63 и последовательность CDRH3 FMC63 или связывается с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с любой из вышеперечисленных, и необязательно, где scFv содержит, по порядку, VH, линкер, необязательно содержащий SEQ ID NO: 24, и VL, и/или scFv содержит гибкий линкер и/или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

155. Способ по любому из вариантов осуществления 150-154, где:

спейсер представляет собой полипептидный спейсер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1;

костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12;

первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15;

антигенсвязывающий домен содержит scFv, который содержит переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63.

156. Способ по любому из вариантов осуществления 1-155, где композицию клеток вводят парентерально, необязательно, внутривенно.

157. Способ по любому из вариантов осуществления 1-156, где субъектом является человек.

158. Способ по любому из вариантов осуществления 1-157, отличающийся тем, что композицию, содержащую сконструированные T-клетки, получают с помощью производственного процесса, включающего воздействие на вводимую композицию,

содержащую первичные Т-клетки, стимулирующим реагентом, включающим реагент олигомерных частиц, содержащий множество молекул авидина, стрептавидина, мутеина авидина или мутеина стрептавидина в условиях, стимулирующих Т-клетки, тем самым создавая стимулированную популяцию, где стимулирующий реагент способен активировать один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одного или нескольких компонентов комплекса TCR и один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов одной или нескольких костимулирующих молекул.

159. Способ по варианту осуществления 158, где производственный процесс дополнительно включает введение в Т-клетки стимулируемой популяции гетерологичного полинуклеотида, кодирующего CAR, который таргетирует CD19, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток.

160. Способ по варианту осуществления 159, где производственный процесс дополнительно включает инкубацию популяции трансформированных клеток в течение до 96 часов.

161. Способ по варианту осуществления 160, где инкубацию проводят в минимальных средах, не содержащих один или несколько рекомбинантных цитокинов.

162. Способ по варианту осуществления 159 или 161, где производственный процесс дополнительно включает сбор Т-клеток трансформированной популяции с получением, таким образом, композиции конструированных клеток.

163. Способ по варианту осуществления 162, где сбор проводят в период между 24 и 120 часами, включительно, после начала воздействия стимулирующим реагентом.

164. Способ по варианту осуществления 162 или 163, где сбор проводят в период между 48 и 120 часами, включительно, после начала воздействия стимулирующим реагентом.

165. Способ по любому из вариантов осуществления 162-164, где сбор проводят в момент обнаружения интегрированного вектора в геноме, но до достижения стабильного интегрированного числа копий вектора (iVCN) на диплоидный геном.

166. Способ по любому из вариантов осуществления 162-165, где сбор проводят до того, как общее количество жизнеспособных клеток при сборе будет больше или больше примерно в три раза, чем общее количество жизнеспособных клеток стимулированной популяции.

167. Способ по варианту осуществления 166, где сбор проводят в то время, когда общее количество жизнеспособных клеток при сборе больше точно или примерно в три раза, точно или примерно в такое же, как количество всего жизнеспособных клеток стимулируемой популяции.

168. Способ по любому из вариантов осуществления 162-167, где сбор проводят в то время, когда доля CD27⁺CCR7⁺ клеток больше или больше примерно 50% от всего Т-клеток в популяции, всего CD3⁺ Т-клеток в популяции, всего CD4⁺ Т-клеток в популяции или всего CD8⁺ Т-клеток в популяции, или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции.

169. Способ по любому из вариантов осуществления 162-168, где сбор проводят в

то время, когда доля $CD45RA^+CCR7^+$ и $CD45RA^-CCR7^+$ клеток больше или больше примерно 60% от всего Т-клеток в популяции, всего $CD3^+$ Т-клеток в популяции, всего $CD4^+$ Т-клеток в популяции или всего $CD8^+$ Т-клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции.

170. Способ по любому из вариантов осуществления 1-169, где клетки вводимой композиции получают с помощью производственного процесса для получения выходной композиции, демонстрирующей заданную характеристику, где повторы производственного процесса дают множество выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, при проведении среди множества различных индивидуальных субъектов, где заданная характеристика выходной композиции среди множества выходных композиций выбрана из:

средняя доля клеток фенотипа памяти во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля клеток фенотипа центральной памяти во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля клеток, которые представляют собой $CD27^+$, $CD28^+$, $CCR7^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD3^+$, $CD95^+$, гранзим В- и/или $CD127^+$ во множестве выходных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля клеток, которые являются $CCR7^+/CD45RA^-$ или $CCR7^+/CD45RO^+$, во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля $CD4^+$ Т-клеток центральной памяти в сконструированных $CD4^+$ Т-клетках, необязательно CAR^+T-CD4^+ клетках, во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля $CD8^+$ Т-клеток центральной памяти в сконструированных $CD8^+$ Т-клетках, необязательно $CD8^+ CAR^+T$ -клетках, во множестве полученных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; и/или

средняя доля Т-клеток центральной памяти, необязательно CD4+ Т-клеток центральной памяти и CD8+ Т-клеток центральной памяти, в сконструированных Т-клетках, необязательно CAR+ Т-клетках, во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%.

171. Способ по варианту осуществления 170, где вводимая композиция производится с помощью производственного процесса для получения выходной композиции, демонстрирующей заданную характеристику, необязательно, пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR, в выходной композиции, по меньшей мере, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 97%, примерно 99%, примерно 100% или 100% биологических образцов человека, в которых оно проводится среди множества различных отдельных субъектов.

172. Способ по любому из вариантов осуществления 158-171, где композиция, содержащая генетически модифицированные клетки, не содержит остаточные микроносители после производственного процесса.

173. Способ по любому из вариантов осуществления 1-172, где В-клеточная NHL представляет собой рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-клеточную NHL).

174. Готовое изделие, содержащее композицию, содержащую генетически сконструированные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, и инструкции по введению композиции клеток в соответствии со способом по любому из вариантов осуществления 1-173.

VI. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Т-клеточные композиции, содержащие CAR+ Т-клетки, полученные с использованием процессов без размножения.

Сконструированные композиции первичных Т-клеток, содержащих Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), получают с помощью процессов, в которых используют стимулирующий реагент, состоящий из олигомерного реагента, конъюгированного с анти-CD3/анти-CD28 Fab, для активации Т-клеток перед трансдукцией с вирусным вектором, но они не включают последующую стадию размножения трансдуцированных клеток. Два аналогичных процесса без размножения, обозначенных как процесс А без размножения и процесс В без размножения, используют для создания CAR+ Т-клеточных композиций. Процессы без размножения не включают стадию культивирования после трансдукции с целью увеличения (например, размножения) общего количества жизнеспособных клеток в конце стадии культивирования по сравнению с началом стадии культивирования. Хотя условия инкубации не были созданы для размножения клеточной популяции, композиция при

сборе может быть размноженной или продемонстрировать увеличение числа клеток по сравнению с началом инкубации. Для сравнения, Т-клетки от одного и того же донора конструируют с помощью процесса, в котором клетки культивируют для размножения после трансдукции. Созданные CD19-таргетные CAR терапевтические Т-клеточные композиции оценивают на фенотип и активность.

Все процессы, включая конструирование Т-клеток с одним и тем же CD19-таргетным CAR. CAR содержит анти-CD19 scFv, спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вирусный вектор дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит суррогатным маркером экспрессии CAR; отделенный от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A.

А. Создание CD19-таргетных CAR Т-клеточных композиций.

В процессе А без размножения, образцы для лейкофереза собирают у доноров-людей, промывают и подвергают иммуноаффинной селекции на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные композиции. После селекции, отдельные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные композиции криоамораживают и затем размораживают и смешивают в приблизительном соотношении 1:1 жизнеспособных CD4⁺ Т-клеток к жизнеспособным CD8⁺ Т-клеткам (примерно 300×10^6 CD4⁺ и 300×10^6 CD8⁺ клеток) перед стимуляцией путем инкубации в течение 18-30 часов с анти-CD3/анти-CD28 Fab-конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина в бессывороточной полной среде, содержащей рекомбинантный IL-2 (100 МЕ/мл), рекомбинантный IL-7 (600 МЕ /мл) и рекомбинантный IL-15 (100 МЕ/мл). После стимуляции, клетки трансдуцируют центрифужной инокуляцией лентивирусным вектором, кодирующим анти-CD19 CAR. После центрифужной инокуляции, клетки промывают и ресуспендируют в минимальной бессывороточной среде без добавления рекомбинантных цитокинов, и инкубируют при температуре примерно 37,0°C в инкубаторе. Примерно через 48 часов после начала стимуляции, добавляют D-биотин и смешивают с клетками для диссоциации анти-CD3 и анти-CD28 Fab реагентов от реагента олигомерного стрептавидина. Клетки дополнительно инкубируют в течение еще 48 часов (примерно до 4 дней после начала стимуляции), и затем добавляют криопротектор.

В процессе В без размножения, образцы для лейкофереза собирают у доноров-людей, промывают и криоконсервируют. Криоконсервированные образцы размораживают перед отбором отдельных композиций CD4⁺ и CD8⁺ клеток из каждого образца путем селекции на основе иммуноаффинности. Селектированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные композиции смешивают до 900×10^6 всего жизнеспособных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и, как правило, в соотношении приблизительно 1:1, перед инкубацией со стимуляцией в течение 16-24 часов с анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными олигомерными реагентами мутеина стрептавидина в бессывороточной полной среде, содержащей рекомбинантный IL-2 (100 МЕ/мл), рекомбинантный IL-7 (600 МЕ/мл) и рекомбинантный IL-15 (100

МЕ/мл). После стимуляции клетки трансдуцируют центрифужной инокуляцией с лентивирусным вектором, кодирующим анти-CD19 CAR. После центрифужной инокуляции, клетки промывают и ресуспендируют в минимальной бессывороточной среде без добавления рекомбинантных цитокинов и инкубируют при температуре примерно 37,0°C в инкубаторе. Примерно через 48 часов после начала стимуляции, добавляют D-биотин и смешивают с клетками для диссоциации анти-CD3 и анти-CD28 Fab реагентов от реагента олигомерного стрептавидина. Клетки дополнительно инкубируют в течение еще 48 часов (примерно до 4 дней после начала стимуляции), и затем добавляют криопротектор.

В процессе с размножением, сконструированные CD4⁺ Т-клетки и сконструированные CD8⁺ Т-клетки, каждая из которых экспрессирует один и тот же анти-CD19 CAR, получают в процессе, включающем подвергание популяций обогащенных CD4⁺ и обогащенных CD8⁺ клеток, по отдельности, стадиям процесса, включая отдельную селекцию, криоконсервацию, стимуляцию, трансдукцию, размножение и сбор. Образцы для лейкофереза собирают у доноров-людей, промывают и подвергают иммуноаффинной селекции на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные композиции. После селекции, отдельные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные композиции активируют анти-CD3/анти-CD28 парамагнитными микроносителями в бессывороточной полной среде, содержащей рекомбинантный ИЛ-2 и рекомбинантный ИЛ-15 (и дополнительно, рекомбинантный ИЛ-7 для CD4⁺ Т-клеточной композиции), и затем отдельно подвергают лентивирусной трансдукции вектором, кодирующим анти-CD19 CAR. Парамагнитные микроносители удаляют, и затем трансдуцированные популяции отдельно инкубируют в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 и рекомбинантного ИЛ-14 (и дополнительно, рекомбинантного ИЛ-7 для CD4⁺ Т-клеточной композиции) и культивируют в биореакторе с качающимся движением для размножения клеток до достижения порога размножения, например, между 9 и 13 днями от начала размножения. Затем клетки отдельно собирают, составляют и криозамораживают.

В. Чистота сконструированных Т-клеточных композиций.

Т-клеточные композиции, полученные в результате процессов конструирования без размножения, окрашивают антителами, распознающими поверхностные маркеры, включая CD3, маркер НК-клеток и CD19, и количественно определяют с помощью проточной цитометрии, как показано на **ФИГ. 1**. Создают ложно трансдуцированные Т-клеточные композиции и используют их в качестве контролей. Клеточные композиции, полученные с использованием процессов без размножения, обычно характеризуются высокой долей CD3⁺ Т-клеток (>96%) с низкой долей НК-клеток и CD19⁺ клеток.

С. Частоты CD4/CD8 и соотношение CD4/CD8.

Композиции Т-клеток, полученные с помощью процессов конструирования с размножением и без размножения, окрашивают антителами, распознающими поверхностные маркеры, включая CD3, CD4 и CD8, и количественно определяют с помощью проточной цитометрии, как показано на **ФИГ. 2** и **ФИГ. 3**. Создают ложно

трансдуцированные Т-клеточные композиции и используют их в качестве контролей. Поскольку процесс с размножением дает отдельные композиции CD4 и CD8, каждая из CD4+ или CD8+ Т-клеток присутствует при ~100% в соответствующих композициях, созданных этим процессом.

D. Жизнеспособность клеток.

Т-клеточные композиции, полученные в результате процессов конструирования без размножения, окрашивают на предмет экспрессии фактора, указывающего на апоптоз, такого как окрашивание поверхности аннексином V или активированной каспазой 3 (aCas3) в качестве меры здоровья клеток и с антителами, распознающими поверхностные маркеры, включая CD3. На **ФИГ. 4** показана доля aCas3+ клеток в CD3+ клетках клеточных композиций, полученных с помощью процессов конструирования без размножения, по сравнению с ложно трансдуцированными Т-клеточными композициями.

E. Количество копий вектора и экспрессия CAR на поверхности.

Композиции Т-клеток, полученные с помощью процессов конструирования без размножения и с размножением, по существу, как описано в этом примере, анализируют с использованием анализа числа копий стандартного вектора (VCN) и анализа интегрированного числа копий вектора (iVCN), который включает разделение высоко- и низкомолекулярные виды ДНК с помощью гель-электрофореза в импульсном поле (PFGE). Число копий вектора CAR, определенное с помощью анализов VCN и iVCN, также коррелирует с поверхностной экспрессией CAR. Примеры способов и композиций для анализов VCN и iVCN описаны в документе PCT/US 2019/046048, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В частности, геномную ДНК получают из клеток и подвергают оценке числа копий последовательности трансгена либо (1) способом iVCN с использованием порогового значения для отделения >15 т.н. («iVCN») высокомолекулярных видов ДНК от низкомолекулярных, нехромосомных видов ниже порога 15 т.н., где разделение проводят с помощью автоматизированного PFGE (например, устройство PippinHT (Sage Science, Beverly, MA)) или (2) стандартным способом VCN, в котором геномная ДНК не была предварительно разделена PFGE («VCN»). В обоих анализах, количество копий трансгена определяют с помощью дцПЦР с использованием праймеров, специфичных для последовательности, уникальной для трансгена (например, праймеров, специфичных для регуляторного элемента рекомбинантного белка), и нормализуют до диплоидного генома, как определено с использованием праймеров, специфичных для эталонного гена (например, гена альбумина (ALB)).

Результаты показали, что число копий трансгена, оцененное с помощью анализа VCN, в целом коррелирует с числом копий трансгена, оцененным с помощью iVCN (**ФИГ. 5A**). Однако для клеток, полученных с использованием процесса без размножения, значения, полученные с помощью VCN, выше, чем значения, полученные с помощью iVCN, что согласуется с анализом VCN, обнаруживающим не интегрированные последовательности трансгенов, которые могут присутствовать в образцах, содержащих

клетки, полученные с использованием процесса без размножения. Напротив, для клеток, полученных с использованием процесса с размножением, значение, полученное VCN и iVCN, является почти идентичным (рядом с линиями $VCN=iVCN$). Эти различия, вероятно, связаны с наличием большего количества свободных не интегрированных копий трансгенных последовательностей в образцах в более коротком процессе без размножения, по сравнению с процессом с размножением. Эти результаты согласуются с наблюдением, что стандартный анализ VCN, способный обнаруживать как высоко- так и низкомолекулярные ДНК, имеет ограничения по сравнению с анализом iVCN, особенно при использовании для оценки клеток на ранних стадиях после введения трансгена, например, в укороченном процессе конструирования Т-клеток, где в образце все еще могут присутствовать свободные не интегрированные копии трансгенных последовательностей.

Чтобы оценить степень корреляции анализа iVCN или VCN с поверхностной экспрессией CAR, образцы клеток из процесса без размножения и с размножением оценивают с помощью проточной цитометрии на экспрессию CD3, CD45 и CAR для определения доли CD3+CAR+ клеток среди жизнеспособных CD45+ клеток. Как показано на **ФИГ. 5В**, анализ VCN продемонстрировал лучшую корреляцию с долей CAR+ клеток для образцов, созданных с помощью процесса с размножением, чем с помощью процесса без размножения, вероятно, из-за присутствия не интегрированных последовательностей CAR ДНК, которые не способствуют поверхностной экспрессии CAR. Как показано на **ФИГ. 5С**, iVCN показал аналогичную корреляцию с экспрессией CAR среди клеток, которые были сконструированы с помощью процесса либо без размножения, либо с размножением. Для всех образцов, корреляция экспрессии CAR с количеством копий на клетку была выше при анализе iVCN ($R^2=0,8952$) по сравнению с количеством копий на клетку, определенным при анализе VCN ($R^2=0,5903$).

Е. Профили памяти Т-клеточных композиций.

Т-клеточные композиции, полученные в результате процессов конструирования без размножения, окрашивают на активированную каспазу 3 (aCas3) и антитела, распознающие поверхностные маркеры, включая CD4, CD8, CCR7, CD27 и CD45RA. Определяют долю Т-клеток, которые указывают на наивные/подобные наивным Т-клетки (CD45RA+CCR7+), клетки центральной памяти (CD45RA-CCR7+), эффекторной памяти (CD45RA-CCR7-; T_{E+EM}) и эффекторной памяти CD45RA+ (CCR7-CD45RA+; T_{EMRA}). Как показано на **ФИГ. 6А**, сконструированные композиции обогащены Т-клетками центральной памяти/наивными.

Доля CD4+CAR+ и CD8+CAR+ Т-клеток среди aCas-Т-клеток, положительных по окрашиванию и CCR7, и CD27, показана на **ФИГ. 6В**. Как показано, сконструированные композиции обогащены CCR7+CD27+ клетками.

Эти результаты подтверждают, что сконструированные клеточные композиции, полученные в результате процессов без размножения, имеют большую часть клеток с подобным наивному, меньше дифференцированным фенотипом, чем клеточные

композиции, полученные в результате процессов с размножением.

Пример 2: Активность in vitro Т-клеточных композиций, полученных с использованием процессов без размножения.

Композиции сконструированных Т-клеток из первичных Т-клеток, содержащих Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), получают от подходящих доноров с использованием процессов без размножения и с размножением для производства сконструированных Т-клеток, и сравнивают характеристики клеточных композиций.

Собирают образцы лейкофереза от 1 здорового донора и трех пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL) (два пациента с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, DLBCL; и один пациент с мантийноклеточной лимфомой, MCL), и проводят производственные циклы для конструирования Т-клеток с анти-CD19 CAR с использованием процесса без размножения, по существу, такого же, как процесс А в примере 1. Сконструированные Т-клеточные композиции сравнивают с Т-клеточными композициями, полученными в ходе прогонов совместимого с донором процесса с использованием процесса с размножением, как описано в примере 1. Анти-CD19 CAR содержит анти-CD19 scFv, спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вирусный вектор дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит суррогатным маркером экспрессии CAR; отделенный от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A.

1) Профиль памяти.

Клетки из сконструированных Т-клеточных композиций, полученных от подходящих доноров с помощью процессов без размножения и с размножением, анализируют в анализе долгосрочной стимуляции, включающем непрерывную инкубацию в течение 9-14 дней в присутствии микроносителей, конъюгированных с агонистическим анти-идиотипическим антителом против анти-CD19 CAR для обеспечения CAR-зависимого стимула. Этот анализ имитирует приспособленность и способность клеток выживать при длительном воздействии антигена, что может происходить in vivo при введении. В частности, клетки оценивают с помощью проточной цитометрии на поверхностные маркеры, включая CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA, и на CAR (суррогатный маркер+ или анти-идиотип+) перед длительной CAR-зависимой стимуляцией (первичные) и после длительной CAR-зависимой стимуляцией (вторичные). Клетки гейтируют на живых CD3+ клетках, которые являются дважды положительными по экспрессии CAR. CAR+ клетки затем гейтируют либо как CD4+ клетки (**ФИГ. 7А** и **ФИГ. 7С**), либо как CD8+ клетки (**ФИГ. 7В** и **ФИГ. 7D**) перед субтипированием памяти.

Перед CAR-специфической стимуляцией (первичной), клеточные композиции, полученные с использованием процесса без размножения, демонстрируют более высокие доли подобных наивным Т-клеток и Т-клеток центральной памяти и более низкие доли

подтипов эффекторной памяти по сравнению с клеточными композициями, полученными с использованием процесса с размножением (**ФИГ. 7А** и **ФИГ.7В**). Композиции, полученные с использованием процесса без размножения, имеют более высокую долю ранних, менее дифференцированных Т-CD4⁺ и CD8⁺ CAR клеток, более низкую долю средне-дифференцированных Т-CD4⁺ и CD8⁺ CAR клеток и более низкую долю поздних, более дифференцированных CD4⁺ CAR Т-клеток, по сравнению с композициями, полученными с использованием процесса с размножением (**ФИГ. 7С** и **ФИГ. 7D**).

После постоянной CAR-специфической стимуляции (вторичной), обе композиции, полученные в процессах без размножения и с размножением, являются более дифференцированными в том смысле, что имеется меньше менее дифференцированных клеток, подобных наивным (например, CD45RA+CCR7⁺), центральной памяти (например, CD45RA-CCR7⁺) или ранних (CD27+CCR7⁺) после размножения (**ФИГ.7А-7D**). Композиции, полученные в процессе без размножения, показывают сохранение менее дифференцированных подтипов памяти после стимуляции, по сравнению с композициями, полученными в процессе с размножением, включая лучшее сохранение хемокинового рецептора, CCR7, который участвует в доставке во вторичные лимфоидные ткани *in vivo*, и могут предполагать возможность длительного функционирования.

2) Пролиферативная способность.

Пролиферативную способность оценивают после длительной CAR-зависимой стимуляции анти-ID антителом, специфичным к анти-CD19 CAR, как описано выше, в течение 10 дней. После длительной стимуляции, анализируют живые клетки в композициях. Как показано на **ФИГ. 8А-8F**, клетки из анти-CD19 не размноженных клеточных продуктов демонстрируют существенно повышенную пролиферативную способность (в 2-7,4 раза) по сравнению со сконструированными клетками в продукте размноженных клеток, соответствующих донору. Эти результаты согласуются с наблюдением, что не размноженные клеточные продукты содержат более высокую относительную долю менее дифференцированных Т-клеток, включая клетки, которые сохраняют характеристики, сходные с Т-клетками центральной памяти и стволовыми клетками памяти, и, таким образом, обладают способностью проходить дополнительные циклы деления в ответ на подачу сигналов через CAR.

3) Цитолитическая активность.

Для оценки цитолитического потенциала, анти-CD19 CAR Т-клетки, сконструированные, как описано выше, в процессе без размножения или с размножением, стимулируют в течение 10-14 дней анти-ID-антителом, специфичным для CAR, и данные размножения суммируют на основе пролиферации, наблюдаемой в течение 10 дней. Клетки K562, трансдуцированные для экспрессии CD19 (K562-CD19), метят красителем NucLight Red (NLR), чтобы их можно было отслеживать под микроскопом. Сконструированные CAR-Т-клеточные композиции из процесса без размножения или с размножением до или после длительной стимуляции совместно культивируют с K562-CD19 при низком отношении эффектора к клетке-мишени (Е:Т) 0,5:1. Цитолитическую

активность оценивают путем измерения потери жизнеспособных клеток-мишеней в течение 96 часов по данным красного флуоресцентного сигнала (с использованием системы анализа живых клеток IncuCyte®, Essen Bioscience). Данные преобразуют в площадь под кривой (AUC) для сравнения либо для отдельных доноров/процесса, либо для производственного процесса.

Сразу после изготовления и до постоянной стимуляции (ФИГ. 9А), сконструированные CAR-T-клеточные композиции, полученные с использованием процесса без размножения, проявляют лучшую или подобную цитолитическую активность по сравнению с Т-клеточными композициями, полученными с использованием процесса с размножением. Однако после размножения в анализе постоянной стимуляции (ФИГ. 9В), композиции, полученные с использованием процесса без размножения, показали лучшую способность сохранять функциональную цитолитическую активность при низком отношении эффектора к мишени (0,5:1) по сравнению с композициями, полученными с использованием процесса с размножением (критерий Манна-Уитни; * $p < 0,05$).

4) Продуцирование цитокина.

Для оценки продуцирования цитокина, анти-CD19 CAR Т-клетки, сконструированные, как описано выше, в процессе без размножения или с размножением, стимулируют в течение 9-14 дней с помощью анти-ID-антитела, специфичного к CAR. Сконструированные CAR-T-клеточные композиции из процесса без размножения или с размножением до или после длительной стимуляции инкубируют на связанных с планшетом анти-ID в течение 5 часов, и продуцирование цитокинов измеряют с помощью проточной цитометрии. Полифункциональную оценку, основанную на одновременном продуцировании трех цитокинов (IL-2, IFN γ и TNF α) в CD4+CAR+ и CD8+CAR+ клетках, определяют с помощью булевого гейтирования трижды положительных клеток в расчете на каждую клетку. Статистическую значимость оценивают по Манну-Уитни, * $p < 0,05$. Клетки, полученные в процессах без размножения, показали большую полифункциональность, чем клетки, полученные в процессах с размножением, после вторичного антигенного стимула (ФИГ. 10).

Пример 3: Противоопухолевая активность in vivo Т-клеточных композиций, полученных с использованием процессов без размножения.

1) Модель лейкоза CD19+ Nalm-6.

Анти-CD19 CAR-T-клеточные композиции, полученные в результате подходящих для донора процессов конструирования с размножением и без размножения, оценивают на модели опухоли острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) Nalm-6. Мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL-2rg^{tm1Wjl}/SzJ внутривенно вводят $5,0 \times 10^5$ Nalm-6 клеток лимфоцитарного лейкоза с люциферазой светлячка - зеленым флуоресцентным белком (FfLuc-GFP), и через 3 дня мышам случайным образом распределяют по группам, чтобы сбалансировать опухолевую массу. Эта модель представляет собой модель медленно растущей опухоли с мышами, достигающими терминальной стадии заболевания примерно от 24 до 26 дня у

мышей, которым не вводят CAR-T-клетки. На 4 день после приживления, мышам внутривенно вводят CAR-T-клетки. Рост диссеминированной опухоли оценивают с помощью визуализации Nalm-6 FfLuc-положительной биолюминесценции (BLI).

На **ФИГ. 11А** показано, что у мышей, леченных сконструированными CAR-T-клетками, полученными в процессе конструирования с размножением, опухолевая масса заметно увеличилась примерно на 10 день после инъекции CAR-T-клеток. Напротив, снижение опухолевой массы сохраняется примерно до 15 дня у мышей, получавших CAR-T-клетки, полученные в процессе конструирования без размножения. Это происходит, несмотря на наблюдение, что в период между 5 днем и примерно 20 днем CD19 CAR-T-клетки, полученные в процессе без размножения, демонстрируют снижение циркулирующих CAR-T-клеток у мышей по сравнению с клетками, полученными в процессе с размножением (**ФИГ. 11В**).

2) Модель CD19+ Raji лимфомы Беркитта.

Анти-CD19 CAR-T-клеточные композиции, полученные в совместимых с донором процессах конструирования с размножением и без размножения, оценивают на модели лимфомы Беркитта Raji. Мышам NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL-2rg^{tm1Wjl}/SzJ внутривенно вводят $5,0 \times 10^5$ Raji клеток лимфомы Беркитта с люциферазой светлячка - зеленым флуоресцентным белком (FfLuc-GFP), и через 6 дней мышей произвольно распределяют на группы для точно, чтобы сбалансировать опухолевую массу (n=8 в группе). На следующий день (7 день после приживления опухоли), мышам внутривенно вводят носитель или CD4+ и CD8+ Т-клетки человека, экспрессирующие анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR) в высокой дозе $1,0 \times 10^6$ клеток (**ФИГ. 12**, левая панель) или в низкой дозе $2,5 \times 10^5$ клеток (**ФИГ. 12**, правая панель) на мышь. Анти-CD19 CAR Т-клетки продуцируют с использованием Т-клеток одного здорового донора (HD1), двух пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DP1, DP2) или одного пациента с мантийноклеточной лимфомой (MP1) с использованием процесса без размножения и процесса с размножением. Контрольные мыши не получают лечение (только опухоль). Рост диссеминированной опухоли оценивают с помощью визуализации Raji FfLuc-положительной биолюминесценции (BLI).

Модель Raji лимфомы Беркитта представляет собой быстрорастущую опухоль с конечной стадией заболевания, характеризующейся параличом задних конечностей, возникающей на 18-20 день после приживления опухоли у мышей, которым не вводят CAR-T-клетки. На 7 день после приживления опухоли, у мышей наблюдается умеренная опухолевая масса при лечении CAR-T. У мышей, обработанных композициями, полученными с использованием процесса без размножения, наблюдается отсроченный ответ, при котором пик ингибирования опухоли наблюдается примерно через 40 дней после введения CAR-T-клеток (**ФИГ. 12А**, фаза 1). Напротив, лечение композициями, полученными с использованием процесса с размножением, в дозах, которые обычно являются суб-терапевтическими в этой модели, приводит к раннему противоопухолевому эффекту, который начинает уменьшаться через 50 дней (**ФИГ. 12А**, фаза 2). Количество

циркулирующих CAR-T-клеток выше у мышей, леченных композициями, полученными с использованием процесса с размножением, на 5 день после обработки. Однако после 5 дня у мышей, леченных композициями, полученными с использованием процесса без размножения, наблюдается большее размножение CAR-T-клеток, в среднем в 10-15 раз более высокое размножение по сравнению с композициями из процесса с размножением, где кратное увеличение достигает 30-кратного увеличения в некоторые моменты времени (ФИГ. 12В).

CAR-T-клетки с фенотипом эффекторной памяти могут опосредовать быстрое исчезновение опухоли, тогда как менее дифференцированные подобные наивным и Т-клетки центральной памяти, вероятно, опосредуют долгосрочную противоопухолевую активность и формирование памяти (Gattinoni et al., Nat Med. 2017, 23(1):18-27; Klebanoff et al., Trends Immunol. 2005, 26(2):111-117). Более медленная начальная скорость размножения CAR-T-клеточных композиций из процесса без размножения может быть связана с менее дифференцированным фенотипом и, возможно, отсроченной кинетикой размножения, при этом способствуя долгосрочной жизнестойкости. Более высокая опухолевая масса при лечении и агрессивная скорость роста модели опухоли Raji могут первоначально опережать дифференциацию *in vivo* CAR-T-клеточных композиций из процесса без размножения в эффекторные клетки, что приводит к отставанию противоопухолевой функции. Напротив, в более медленно растущей модели опухоли Nalm-6 с более низкой опухолевой массой при лечении, CAR-T-клетки композиций из процесса без размножения имеют тенденцию к большей противоопухолевой эффективности, чем CAR-T-клетки композиций из процесса с размножением. Взятые вместе, эти данные *in vivo* согласуются с большей пролиферативной способностью и эффективностью CAR-T-клеточных композиций из процесса без размножения, что может быть показателем усиленной противоопухолевой активности у людей.

Пример 4: Введение анти-CD19 CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей или не поддающейся лечению В-клеточной неходжкинской лимфомой.

Терапевтическую Т-клеточную композицию, экспрессирующую анти-CD19 CAR, содержащую Т-клеточные композиции, экспрессирующие CD4+ CAR и Т-клеточные композиции, экспрессирующие CD8+ CAR, вводят субъектам с рецидивирующей или не поддающейся лечению В-клеточной неходжкинской лимфомой (r/g В-клеточной NHL).

В исследование включены субъекты с r/g В-клеточной NHL, в том числе субъекты с гистологически подтвержденной DLBCL, не уточненной, В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (HGBCL), DLBCL, трансформированной из фолликулярной (tFL) или лимфомой маргинальной зоны (tMZL), первичной медиастинальной В-клеточной лимфомой (PMBCL) или FL степени 3b (FL3b). Субъекты имеют рецидивирующее и/или не поддающееся лечению заболевание после, по меньшей мере, 2 линий системной терапии, которая включала, по меньшей мере, один антрациклин и ритуксимаб (или другое анти-

CD20 моноклональное антитело), и/или субъекты имеют рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению DLBCL, которая не ответила на лечение трансплантацией аутологичных стволовых клеток (ASCT).

Вводимые терапевтические Т-клеточные композиции, экспрессирующие анти-CD19 CAR, продуцируют в процессе, в котором клетки не подвергают стадиям культивирования с целью размножения (пролиферации) клеток, что приводит к получению CAR Т-клеточного продукта с фенотипическим профилем, содержащим высокую долю типов клеток, которые менее дифференцированы. Процесс включает основанное на иммуноаффинности (например, иммуномагнитную селекцию) обогащение CD4⁺ и CD8⁺ клеток из предварительно криоконсервированных образцов лейкофереза от отдельных субъектов, подлежащих лечению.

Выбранные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные композиции смешивают до 900×10^6 всего жизнеспособных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и, как правило, в соотношении приблизительно 1:1, перед инкубацией со стимуляцией в течение 16-24 часов с анти-CD3/анти-CD28 Fab конъюгированными реагентами олигомера мутеина стрептавидина в бессывороточной полной среде, содержащей рекомбинантный IL-2 (100 МЕ/мл), рекомбинантный IL-7 (600 МЕ/мл) и рекомбинантный IL-15 (100 МЕ/мл). После стимуляции, клетки трансдуцируют центрифужной инокуляцией лентивирусным вектором, кодирующим анти-CD19 CAR. CAR содержит анти-CD19 scFv, спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вирусный вектор дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит суррогатным маркером экспрессии CAR; отделены от последовательности CAR последовательностью прерывателя рибосомы T2A.

После центрифужной инокуляции, клетки промывают и ресуспендируют в минимальной бессывороточной среде без добавления рекомбинантных цитокинов, и инкубируют при температуре примерно 37,0°C в инкубаторе. Примерно через 48 часов после начала стимуляции добавляют D-биотин и смешивают с клетками для диссоциации анти-CD3 и анти-CD28 Fab реагентов от реагента олигомерного стрептавидина. Клетки дополнительно инкубируют в течение еще 48 часов (примерно до 4 дней после начала стимуляции), и затем смешивают с криопротектором. Этот процесс не включает последующую стадию размножения трансдуцированных клеток и, как правило, короче, чем процесс, который включает размножение трансдуцированных клеток. В результате процесса получают клеточную композицию, в которой больше 80% клеток являются Т-клетками, содержащими и CD4⁺CAR⁺, и CD8⁺CAR⁺ Т-клетки, обогащенные фенотипом центральной памяти, по сравнению с исходными образцами и по сравнению с клеточными композициями, созданными с использованием производственного процесса, который включает стадию культивирования, направленную на размножение трансдуцированных клеток.

Криоконсервированные клеточные композиции, содержащие и CD4⁺CAR⁺, и

CD8+CAR+ Т-клетки, размораживают перед внутривенным введением. Перед инфузией CAR+ Т-клеток, субъекты получают противолимфомную химиотерапию флударабином (flu, 30 мг/м²/день) в/в и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м²/день) в/в в течение трех (3) дней со сниженной дозой для субъектов со сниженной функцией почек.

Субъекты получают CAR-экспрессирующие Т-клетки через 2-7 дней после завершения противолимфомной терапии. Каждому субъекту вводят разовую дозу 10x10⁶ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток. Предполагается, что субъектам в этом исследовании следует вводить дозу из следующих уровней доз: 5x10⁶ всего CAR+ Т-клеток, 10x10⁶ всего CAR+ Т-клеток, 25x10⁶ всего CAR+ Т-клеток, 50x10⁶ всего CAR+ Т-клеток и 100x10⁶ всего CAR+ Т-клеток. Каждая доза содержит CD3+CAR+ Т-клетки (≥80% CD3+ клеток; ≥10% CD3+CAR+ клеток).

Ответ на лечение оценивают на основе рентгенографической оценки опухоли с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и/или компьютерной томографии (КТ) и/или магнитно-резонансной томографии (МРТ) на исходном уровне до лечения и в разное время после лечения (например, на основе классификацию Лугано, см., например, Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067).

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными описанными вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из приведенного в настоящем документе описания и идей. Такие варианты могут применяться на практике без отклонения от истинного объема и сути описания, и предполагается, что они входят в объем настоящего описания.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

| SEQ ID NO. | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ | ОПИСАНИЕ |
|------------|---|--|
| 1 | ESKYGPPCPPCP | спейсер (IgG4 шарнир) (aa) Homo sapiens |
| 2 | GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT | спейсер (IgG4шарнир) (нт) homo sapiens |
| 3 | ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK | Шарнир-CH3 спейсер Homo sapiens |
| 4 | ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK | Шарнир-CH2- CH3 спейсер Homo sapiens |
| 5 | RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTA PATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPCEPSHTQPLGVYLLTPAVQD | IgD-шарнир-Fc Homo sapiens |

| | | |
|----|---|---|
| | LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHP SLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSP PNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRV PAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDH | |
| 6 | LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR | T2A искусственная |
| 7 | MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKCVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLP QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENN TLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIP SIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM | tEGFR искусственная |
| 8 | FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV | CD28 (аминокислоты 153-179 из № доступа P10747) Homo sapiens |
| 9 | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWV LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV | CD28 (аминокислоты 114-179 из № доступа P10747) Homo sapiens |
| 10 | RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S | CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747) Homo sapiens |
| 11 | RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S | CD28 (LL на GG) Homo sapiens |
| 12 | KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCE L | 4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1) Homo sapiens |
| 13 | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | CD3 дзета Homo sapiens |
| 14 | RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | CD3 дзета Homo sapiens |
| 15 | RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR | CD3 дзета Homo sapiens |
| 16 | RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLH | tEGFR искусственная |

| | | |
|----|---|---|
| | AFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATG QVCHALCSPEGCWGPEDRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLE GEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHY IDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC TYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGL FM | |
| 17 | EGRGSLLTCDVEENPGP | T2A искусственная |
| 18 | GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP | P2A |
| 19 | ATNFSLLKQAGDVEENPGP | P2A |
| 20 | QCTNYALLKLAGDVESNPGP | E2A |
| 21 | VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP | F2A |
| 22 | PGGG-(SGGGG)5-P- где P является пролином, G является глицином и S является серином | линкер |
| 23 | GSADDAKKDAKKDGKS | Линкер |
| 24 | GSTSGSGKPGSGEGSTKG | Линкер |
| 25 | gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcggcagcctgggagaccgggtgacca tcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacactgactggtatcagcagaagcccagc ggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccgggt tagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagata tcgccacctactttgccagcagggcaacacactgcctacaccttggcggcggaaacaagc tggaatcaccggcagcactccggcagcggcaagcctggcagcggcggagggcagcacc aagggcaggtgaagctgcaggaagcggcctggcctggtggccccagccagagcctg agegtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggc agccccaggaagggcctggaatggctggcgtgatctggggcagcagaccacctacta caacagcgcctgaagagcggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttc ctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgcatctactactgcgccaagcactactac tacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc | Последователь ность, кодирующая scFv |
| 26 | X ₁ PPX ₂ P X ₁ является глицином, цистеином или аргинином X ₂ является цистеином или треонином | Шарнир |
| 27 | Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro | Шарнир |
| 28 | Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro | Шарнир |
| 29 | ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP RCPEPKSCDTPPPCPRCP | Шарнир |
| 30 | Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro | Шарнир |
| 31 | Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro | Шарнир |
| 32 | Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro | Шарнир |
| 33 | Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro | Шарнир |
| 34 | Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro | Шарнир |
| 35 | RASQDISKYLN | CDR L1 |
| 36 | SRLHSGV | CDR L2 |
| 37 | GNTLPYTFG | CDR L3 |
| 38 | DYGVS | CDR H1 |
| 39 | VIWGSETTYNSALKS | CDR H2 |
| 40 | YAMDYWG | CDR H3 |
| 41 | EVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSKVFLKMN SLQTDITAIYYCAKHYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS | VH |
| 42 | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPD | VL |

| | | |
|----|--|--|
| | GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT | |
| 43 | DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPR KGLEWLGVIWGSETTYYNALKSRLTIKDNSKSKVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS | scFv |
| 44 | KASQNVGTNVA | CDR L1 |
| 45 | SATYRNS | CDR L2 |
| 46 | QQYNRYPYT | CDR L3 |
| 47 | SYWMN | CDR H1 |
| 48 | QIYPGDGDTNYNGKFKG | CDR H2 |
| 49 | KTISSVDFYFDY | CDR H3 |
| 50 | EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAY MQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTSS | VH |
| 51 | DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGKLEIKR | VL |
| 52 | GGGGSGGGGSGGGGS | Линкер |
| 53 | EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAY MQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTSS SGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKA SQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGS GSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGKLEI KR | scFv |
| 54 | HYYYGGSYAMDY | CDR H3 |
| 55 | HTSRLHS | CDR L2 |
| 56 | QQGNTLPYT | CDR L3 |
| 57 | ACACGGCCTCGTGTATTACTGT | IGH праймер |
| 58 | ACCTGAGGAGACGGTGACC | IGH Праймер |
| 59 | MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNAESR YVLTGRYDSAPATDGSALTGWTVAWKNNYRNAHSATT WSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFT KVKPSAAS | Мутеин стрептавидина Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ -Ala- 46-Arg ⁴⁷ Виды: Streptomyces avidinii |
| 60 | Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser | Переменная тяжелая цепь анти-CD3 антитела ОКТ3 |
| 61 | Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr | Переменная легкая цепь анти-CD3 |

| | | |
|----|---|--|
| | Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn | антитела ОКТ3 |
| 62 | Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val | Переменная тяжелая цепь анти-CD28 антитела CD28.3 |
| 63 | Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg | Переменная легкая цепь анти-CD28 антитела CD28.3 |
| 64 | SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK | Twin-Strep-tag |
| 65 | MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP | GMCSFR альфа цепь сигнальной последовательности |
| 66 | atgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattctctctgatcca | GMCSFR альфа цепь сигнальной последовательности |
| 67 | MALPVTALLLPLALLHA | CD8 альфа сигнальный пептид |
| 68 | DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEAN AWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAV QQ | Стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii № UniProt P22629 |
| 69 | EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRY VLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWS GQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKV KPSAAS | Минимальный стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii |
| 70 | His-Pro-Gln-Phe | Стрептавидин-связывающий пептид |
| 71 | His-Pro-Xaa | Стрептавидин-связывающий пептид Xaa выбран из Gln, Asp и Met |

| | | |
|----|--|--|
| 72 | Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa | Стрептавидин-связывающий пептид Oaa является Trp, Lys или Arg; Xaa является любой аминокислотой ; Yaa является Gly или Glu Zaa является Gly, Lys или Arg |
| 73 | -Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa- | Стрептавидин-связывающий пептид Xaa является любой аминокислотой ; Yaa является Gly или Glu Zaa является Gly, Lys или Arg |
| 74 | Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly | Стрептавидин-связывающий пептид, Strep-tag® |
| 75 | WSHPQFEK | Strep-tag® II |
| 76 | Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys- | Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида Xaa является любой аминокислотой ; n равно либо 8, либо 12 |
| 77 | Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys | Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида n равно 2 или 3 |
| 78 | WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK | Twin-Strep-tag |
| 79 | WSHPQFEKGGGSGGGSWHPQFEK | Twin-Strep-tag |
| 80 | WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWHPQFEK | Twin-Strep-tag |

| | | |
|----|---|---|
| 81 | SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQPFEK | Twin-Strep-tag |
| 82 | SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK | Twin-Strep-tag |
| 83 | DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEAN AWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAV QQ | Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii |
| 84 | EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESR YVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATT WSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFT KVKPSAAS | Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii |
| 85 | MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAES RYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATT WSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFT KVKPSAAS | Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii |
| 86 | DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYIGARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEAN AWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAV QQ | Мутеин стрептавидина Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii |
| 87 | EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNAESRY VLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWS GQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKV KPSAAS | Мутеин стрептавидина Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii |
| 88 | EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESR YVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATT WSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFT KVKPSAAS | Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Виды: Streptomyces avidinii |
| 89 | DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENA GYSTLVGHDTFTKVKPSAAS | Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 и Glu117, Gly120, |

| | | |
|----|---|--|
| | | Try121 (мутеин m1-9) Виды: Streptomyces avidinii |
| 90 | MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAES RYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATT WSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFT KVKPSAAS | Минимальный стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (т/г В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип подобный наивному или центральной памяти.

2. Способ лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы (т/г В-клеточной NHL), где способ включает введение субъекту, имеющему или с подозрением на наличие В-клеточной NHL, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, где:

композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 100×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой CD3⁺ клетки; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD4⁺CAR⁺ Т-клеток в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺ и/или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% CD8⁺CAR⁺ Т-клетки в композиции представляют собой CD27⁺CCR7⁺.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 2,5:1.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2 до примерно 2:1, от примерно 1:1,5 до примерно 1,5:1, или точно или примерно 1:1.

5. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что композиция содержит CD4⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:1 до примерно 2,5:1, от примерно 1,5:1 до примерно 2:1, точно или примерно 1,5:1, или точно или примерно 2:1.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что композиция содержит от

точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 50×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

9. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно.

10. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что композиция содержит точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

11. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что композиция содержит точно или примерно 10×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

12. Способ по любому из пп.1-7 и 9, отличающийся тем, что композиция содержит точно или примерно 25×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 91%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 92%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 93%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 94%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95%, или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 96% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что от точно или примерно 5% до точно или примерно 30% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно, аннексин V или активную каспазу 3.

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что от точно или примерно 10% до точно или примерно 15% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

17. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что от точно или примерно 15% до точно или примерно 20% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

18. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что от точно или примерно 20% до точно или примерно 25% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

19. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что от точно или примерно 25% до точно или примерно 30% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

20. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что точно или примерно 5%, точно или примерно 10%, точно или примерно 15%, точно или примерно 20%, точно или примерно 25%, или точно или примерно 30% CAR⁺ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

21. Способ по любому из пп.2-20, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

22. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что от точно или примерно 80% до точно или примерно 85% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

23. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что от точно или примерно 85% до точно или примерно 90% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

24. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что от точно или примерно 90% до точно или примерно 95% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

25. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

26. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что точно или примерно 85% 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти.

27. Способ по любому из пп. 1 и 3-26, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции, которые имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что маркер, экспрессируемый на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти, выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD27, CD28 и CCR7.

29. Способ по любому из пп. 1 и 3-28, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR⁺ Т-клеток в композиции, которые имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, имеют фенотип, выбранный из CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ или CD62L⁻CCR7⁺.

30. Способ по любому из пп.1-29, отличающийся тем, что от точно или примерно 80% до точно или примерно 85%, от точно или примерно 85% до точно или примерно 90%, от точно или примерно 90% до точно или примерно 95%, от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR⁺ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, выбранный из CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺ или CD62L⁻CCR7⁺.

31. Способ по любому из пп.1-29, отличающийся тем, что точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, выбранный из $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ или $CD62L^-CCR7^+$.

32. Способ по любому из пп.1-31, отличающийся тем, что точно или примерно 80%, точно или примерно 85%, точно или примерно 90%, точно или примерно 95% или точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции имеет фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

33. Способ по любому из пп.1-32, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

34. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

35. Способ по любому из пп.1-34, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

36. Способ по любому из пп.1-35, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

37. Способ по любому из пп.1-36, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

38. Способ по любому из пп.1-37, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

39. Способ по любому из пп.1-38, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

40. Способ по любому из пп.1-39, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

41. Способ по любому из пп.1-40, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип,

числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, меньше или меньше примерно 0,9.

54. Способ по любому из пп.1-53, отличающийся тем, что часть интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, составляет от точно или примерно 0,9 до точно или примерно 0,8.

55. Способ по любому из пп.1-53, отличающийся тем, что часть интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, меньше или меньше примерно 0,8.

56. Способ по любому из пп.1-53 и 55, отличающийся тем, что часть интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, составляет от точно или примерно 0,8 до точно или примерно 0,7.

57. Способ по любому из пп.1-53 и 55, отличающийся тем, что часть интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, составляет от точно или примерно 0,7 до точно или примерно 0,6.

58. Способ по любому из пп.1-53 и 55, отличающийся тем, что часть интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, составляет от точно или примерно 0,6 до точно или примерно 0,5.

59. Способ по любому из пп.1-53 и 55, отличающийся тем, что часть интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем количестве VCN в CAR⁺ Т-клетках в композиции, в среднем, составляет от точно или примерно 0,5 до точно или примерно 0,4.

60. Способ по любому из пп.1-59, отличающийся тем, что интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции, в среднем, составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 3,0 копий на диплоидный геном, включительно.

61. Способ по любому из пп.1-60, отличающийся тем, что интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции, в среднем, составляет от или от примерно 0,8 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

62. Способ по любому из пп.1-61, отличающийся тем, что интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции, в среднем, составляет от или от примерно 0,8 копии на диплоидный геном до 1,0 копии на диплоидный геном, включительно.

63. Способ по любому из пп.1-61, отличающийся тем, что интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции, в среднем, составляет от или от примерно 1,0 копии на диплоидный геном до 1,5 копии на диплоидный геном, включительно.

64. Способ по любому из пп.1-61, отличающийся тем, что интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR⁺ Т-клеток в композиции, в среднем, составляет от или от примерно 1,5 копий на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

65. Способ по любому из пп.1-64, отличающийся тем, что В-клеточная NHL выбрана из группы, состоящей из: диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), необязательно, неутонченной DLBCL; трансформированной DLBCL, необязательно, DLBCL, трансформированной из фолликулярной лимфомы или лимфомы маргинальной зоны; В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности (HGBCL), необязательно, HGBCL с реаранжировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL; первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (PMBCL); и фолликулярной лимфомы (FL), необязательно фолликулярной лимфомы степени 3b (FL3B).

66. Способ по любому из пп. 1-65, отличающийся тем, что во время или непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения или он стал невосприимчивым к: (i) двум или нескольким предшествующим терапиям В-клеточной NHL, и/или (ii) терапии трансплантацией аутологичных стволовых клеток (ASCT).

67. Способ по п.66, отличающийся тем, что две или несколько предшествующих терапий В-клеточной NHL включают антрациклин и агент, таргетирующий CD20, где агент, таргетирующий CD20, необязательно включает ритуксимаб.

68. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что субъект ранее не получал CAR Т-клеточную терапию или терапию генетически модифицированными Т-клетками.

69. Способ по любому из пп.1-68, дополнительно включающий получение образца лейкофереза от субъекта для изготовления композиции, содержащей сконструированные Т-клетки.

70. Способ по любому из пп.1-69, отличающийся тем, что перед введением субъект был предварительно кондиционирован противолимфомной терапией.

71. Способ по любому из пп.1-69, где способ дополнительно включает, непосредственно перед введением композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, введение субъекту противолимфомной терапии, где противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или или циклофосфамида.

72. Способ по любому из пп.1-71, отличающийся тем, что введение композиции, содержащей сконструированные Т-клетки и/или противолимфомную терапию, осуществляют амбулаторно.

73. Способ по любому из пп.70-72, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение флударабина в дозе 30 мг/м² площади поверхности тела субъекта, ежедневно, и циклофосфамида в дозе 300 мг/м² площади поверхности тела субъекта, ежедневно, каждый в течение 3 дней.

74. Способ по любому из пп.70-73, отличающийся тем, что композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, вводят в период от точно или примерно 48 часов до точно или примерно 9 дней, включительно, после завершения противопролиферативной терапии.

75. Способ по любому из пп.1-74, дополнительно включающий введение субъекту агента или лечения для лечения, профилактики, снижения или ослабления нейротоксичности и/или синдрома высвобождения цитокинов или его риска.

76. Способ по п.75, отличающийся тем, что агент представляет собой или содержит анти-IL-6 антитело, антитело против рецептора IL-6 или стероид.

77. Способ по п. 75 или п. 76, отличающийся тем, что агент представляет собой или содержит тоцилизумаб или метилпреднизолон.

78. Способ по любому из пп.1-77, отличающийся тем, что Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

79. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR);

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR, демонстрируют CR, который является устойчивым в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших CR к одному месяцу и/или к 3 месяцам, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования, в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев и/или точно или больше 9 месяцев после достижения CR; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR);

по меньшей мере, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% субъектов, достигших OR, демонстрируют OR, который является устойчивым в течение точно или больше 3 месяцев или точно или больше 6 месяцев; и/или

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, достигших OR, остаются в ответе или выживают в течение точно или больше 3 месяцев и/или точно или больше 6 месяцев после достижения OR.

80. Способ по любому из пп. 1-79, где клетки являются аутологичными по отношению к субъекту, и

минимальное абсолютное число лимфоцитов (ALC) для афереза не требуется и/или не указывается для продуцирования терапии; и/или

клетки продуцируют процессом, который, по меньшей мере, у 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% субъектов, имеющих В-клеточную NHL, способен генерировать клеточный продукт для введения по способу.

81. Способ по любому из пп. 1-80, отличающийся тем, что:

больше или больше примерно 50%, примерно 60%, примерно 70% или примерно

80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют степень нейротоксичности 3 степени или выше, и/или больше 40%, или 50%, или 55% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какую-либо нейротоксичность или CRS.

82. Способ по любому из пп.1-81, отличающийся тем, что больше или больше примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

83. Способ по любому из пп.1-82, отличающийся тем, что больше 95% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют CRS 3 степени или выше.

84. Способ по любому из пп.1-83, отличающийся тем, что больше 85% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

85. Способ по любому из пп. 1-84, отличающийся тем, что: больше или больше примерно 30%, 35%, 40% или 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какую-либо степень синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и/или

по меньшей мере, 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют начало CRS ранее, чем через 3 дня после начала введения и/или не демонстрируют нейротоксичность ранее, чем через 5 дней после начала введения; и/или

медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, находится точно или после медианного пика или среднего времени до разрешения CRS у субъектов, получавших лечение по способу, и/или медиана начала нейротоксичности среди субъектов, получавших лечение по способу, составляет больше, чем точно или примерно 8, 9, 10 или 11 дней.

86. Способ по любому из пп. 1-85, отличающийся тем, что: по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение по способу, достигают полного ответа (CR);

по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение по способу, достигают объективного ответа (OR); и

больше или больше примерно 50% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют какую-либо степень синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности; и

больше или больше примерно 80% субъектов, получавших лечение по способу, не демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше и/или не демонстрируют нейротоксичность 3 степени или выше.

87. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что:

CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для

CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая необязательно представляет собой 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, который необязательно представляет собой CD3дзета;

CAR содержит, по порядку, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM; или

CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с CD19, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий цепь CD3-дзета (CD3 ζ) и костимулирующую сигнальную область, которая представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

88. Способ по любому из пп.1-87, отличающийся тем, что CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к CD19, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая представляет собой 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, которая представляет собой CD3дзета.

89. Способ по п.87 или 88, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

90. Способ по п.89, отличающийся тем, что scFv содержит аминокислотную последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), аминокислотную последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36), аминокислотную последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), аминокислотную последовательность DYGVV (SEQ ID NO: 38), аминокислотную последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39), аминокислотную последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40).

91. Способ по п.89 или п.90, отличающийся тем, что scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63.

92. Способ по любому из пп. 89-91, отличающийся тем, что scFv представлен в SEQ ID NO: 43.

93. Способ по любому из пп.87-92, отличающийся тем, что цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, представляет собой сигнальный домен 4-1BB, необязательно где цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

94. Способ по любому из пп. 87-93, отличающийся тем, что цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, представляет собой сигнальный домен CD3дзета, где цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной молекулы, содержащей ITAM, содержит

SEQ ID NO: 13, 14 или 15, имеющие, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности.

95. Способ по любому из пп.87-94, отличающийся тем, что CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

96. Способ по п.95, отличающийся тем, что спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, необязательно, шарнира IgG4 или его модифицированной версии.

97. Способ по п.95 или 96, отличающийся тем, что спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот.

98. Способ по любому из пп. 96-97, отличающийся тем, что: спейсер содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 или последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 2.

99. Способ по любому из пп. 95-98, отличающийся тем, что: спейсер представляет собой полипептидный спейсер, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1;

цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, содержит SEQ ID NO: 12;

цитоплазматический сигнальный домен, полученный из молекулы, содержащей первичный сигнальный ITAM, содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15; и

внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv, который содержит переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63.

100. Способ по любому из пп. 87-99, отличающийся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из CD28, необязательно, трансмембранный домен, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности с SEQ ID NO:8.

101. Способ по любому из пп. 96-100, отличающийся тем, что CAR содержит, по порядку от N-конца к C-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO:1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO:8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO:12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), представленный в SEQ ID NO:13.

102. Способ по любому из пп. 1-101, отличающийся тем, что композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, получают с помощью производственного процесса, включающего:

(i) воздействие на входную композицию, содержащую первичные Т-клетки, необязательно, на входную композицию, содержащую аутологичные Т-клетки, выбранные у субъекта, стимулирующего реагента, содержащего реагент на основе олигомерных частиц, содержащий множество молекул мутеина стрептавидина, в условиях для стимуляции Т-клеток, тем самым создавая стимулированную популяцию, в которой:

реагент на основе олигомерных частиц содержит первый агент, содержащий анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и второй агент, содержащий анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

(ii) введение в Т-клетки стимулированной популяции гетерологичного полинуклеотида, кодирующего CAR, который таргетирует CD19, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток;

(iii) инкубацию популяции трансформированных клеток до 96 часов; и

(iv) сбор Т-клеток из популяции трансформированных клеток с получением, таким образом, композиции сконструированных клеток, где сбор осуществляют во время от 24 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента.

103. Способ по п.102, отличающийся тем, что анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, и анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

104. Способ по п. 102 или п. 103, где первый агент и второй агент, каждый, содержат стрептавидин-связывающий пептид, который обратимо связывает первый агент и второй агент с реагентом на основе олигомерных частиц, необязательно, где стрептавидин-связывающий пептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:78-82.

105. Способ по любому из пп. 102-104, отличающийся тем, что молекула мутеина стрептавидина представляет собой тетрамер мутеина стрептавидина, содержащего аминокислотные остатки Val44-Thr45-Ala46-Arg47 или Ile44-Gly45-Ala46-Arg47, необязательно, где мутеин стрептавидина содержит последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 69, 84, 87, 88, 90, 85 или 59.

106. Способ по любому из пп.102-105, отличающийся тем, что реагент на основе олигомерных частиц содержит от 1000 до 5000 тетрамеров мутеина стрептавидина, включительно.

107. Способ по любому из пп.102-106, отличающийся тем, что способ дополнительно включает, перед сбором клеток, добавление биотина или аналога биотина после или во время инкубации.

108. Способ по любому из пп.102-107, отличающийся тем, что сбор урожая проводят в период времени от 48 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента.

109. Способ по любому из пп.102-108, отличающийся тем, что сбор проводят во время обнаружения интегрированного вектора в геноме, но до достижения стабильного интегрированного числа копий вектора (iVCN) на диплоидный геном.

110. Способ по любому из пп. 102-109, отличающийся тем, что сбор проводят во время до того, как общее количество жизнеспособных клеток при сборе будет больше или больше в три раза, чем общее количество жизнеспособных клеток стимулированной популяции.

111. Способ по любому из пп.102-110, отличающийся тем, что сбор проводят в то время, когда общее количество жизнеспособных клеток при сборе будет точно или примерно трехкратное, точно или примерно двукратное, или такое же или примерно такое же, сколько общее количество жизнеспособных клеток стимулируемой популяции.

112. Способ по любому из пп.102-111, отличающийся тем, что сбор осуществляют в то время, когда доля клеток $CD27^+CCR7^+$ больше или больше примерно 50% среди всего Т-клеток в популяции трансформированных клеток, всего $CD3^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток, всего $CD4^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток или всего $CD8^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции трансформированных клеток.

113. Способ по любому из пп.102-112, отличающийся тем, что сбор проводят в то время, когда доля клеток $CD45RA^+CCR7^+$ и $CD45RA^-CCR7^+$ больше или больше примерно 60% среди всего Т-клеток в популяция трансформированных клеток, всего $CD3^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток, всего $CD4^+$ Т-клеток в популяции трансформированных клеток или всего $CD8^+$ Т-клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции трансформированных клеток.

114. Способ по любому из пп.1-113, отличающийся тем, что клетки вводимой композиции получают с помощью производственного процесса для получения выходной композиции, (i) содержащей сконструированные $CD4^+$ Т-клетки и сконструированные $CD8^+$ Т-клетки и (ii) демонстрирующей заранее заданную характеристику, где итерации производственного процесса продуцируют множество выходных композиций, необязательно из биологических образцов человека, при выполнении среди множества различных отдельных субъектов, где заданная характеристика выходной композиции среди множества выходных характеристик выбрана из:

средняя доля клеток фенотипа памяти во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля клеток центрального фенотипа памяти во множестве выходных композиций составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля клеток, которые представляют собой $CD27^+$, $CD28^+$, $CCR7^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD3^+$, $CD95^+$, гранзим В- и/или $CD127^+$ во множестве выходных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно

55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля клеток, которые являются CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+, во множестве выходных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля CD4+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD4+ Т-клетках, необязательно, CAR+CD4+ Т-клеток, во множестве выходных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%;

средняя доля CD8+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD8+ Т-клетках, необязательно CAR+CD8+ Т-клетках, во множестве полученных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%; и/или

средняя доля Т-клеток центральной памяти, необязательно CD4+ Т-клеток центральной памяти и CD8+ Т-клеток центральной памяти, в сконструированных Т-клетках, необязательно, CAR+ Т-клетках множества выходных композиций, составляет от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 45% до примерно 50%, от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60% или от примерно 60% до примерно 65%.

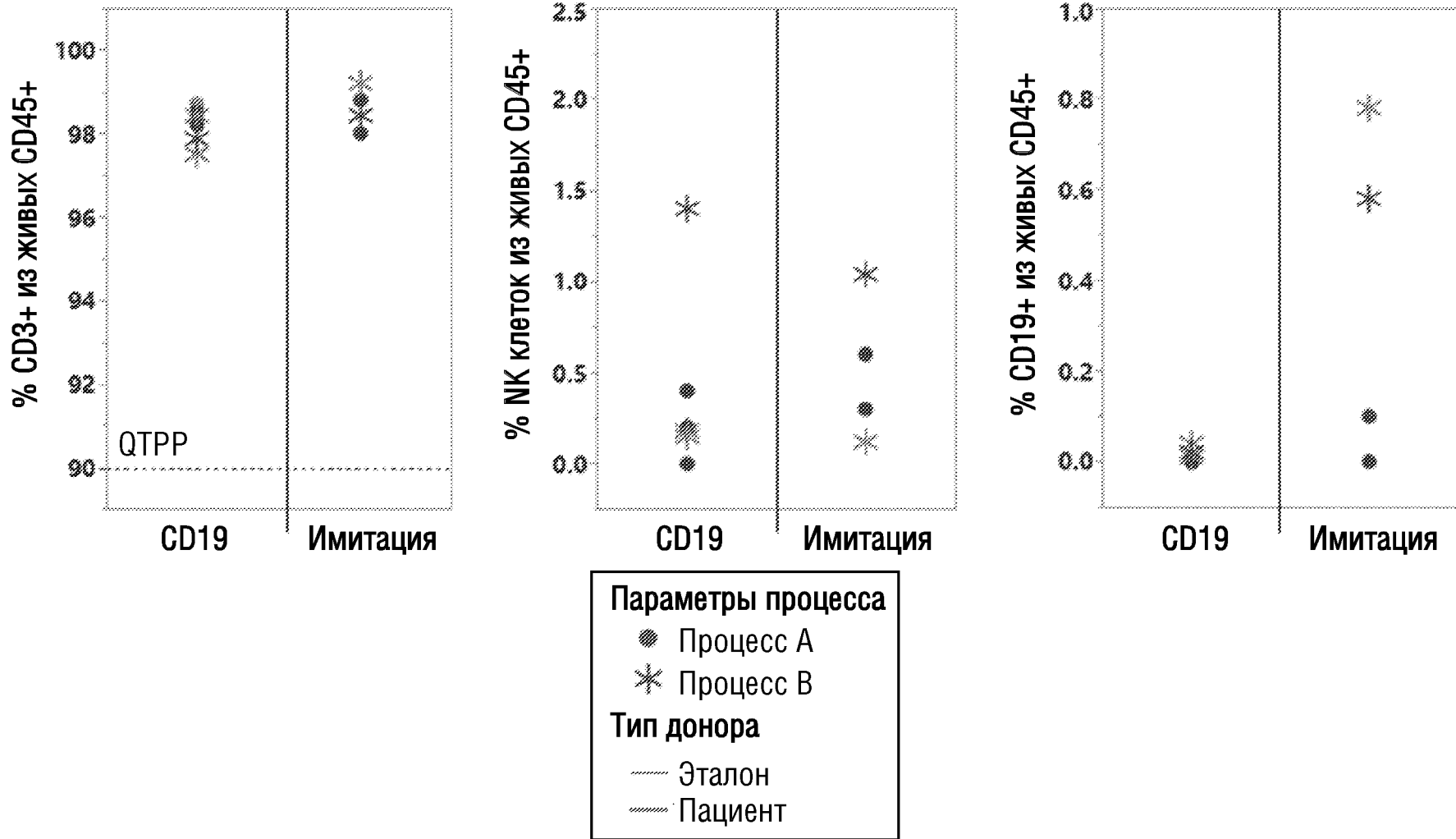
115. Способ по любому из пп. 1-114, отличающийся тем, что вводимую композицию получают с помощью производственного процесса для получения выходной композиции, демонстрирующей заданную характеристику, необязательно, пороговое количество клеток, экспрессирующих CAR, в выходной композиции, по меньшей мере, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 97%, примерно 99%, примерно 100% или в 100% биологических образцов человека, в которых он проводится среди множества различных отдельных субъектов.

116. Способ по любому из пп.102-115, отличающийся тем, что композиция, содержащая генетически модифицированные клетки, не содержит остаточные микроносители после производственного процесса.

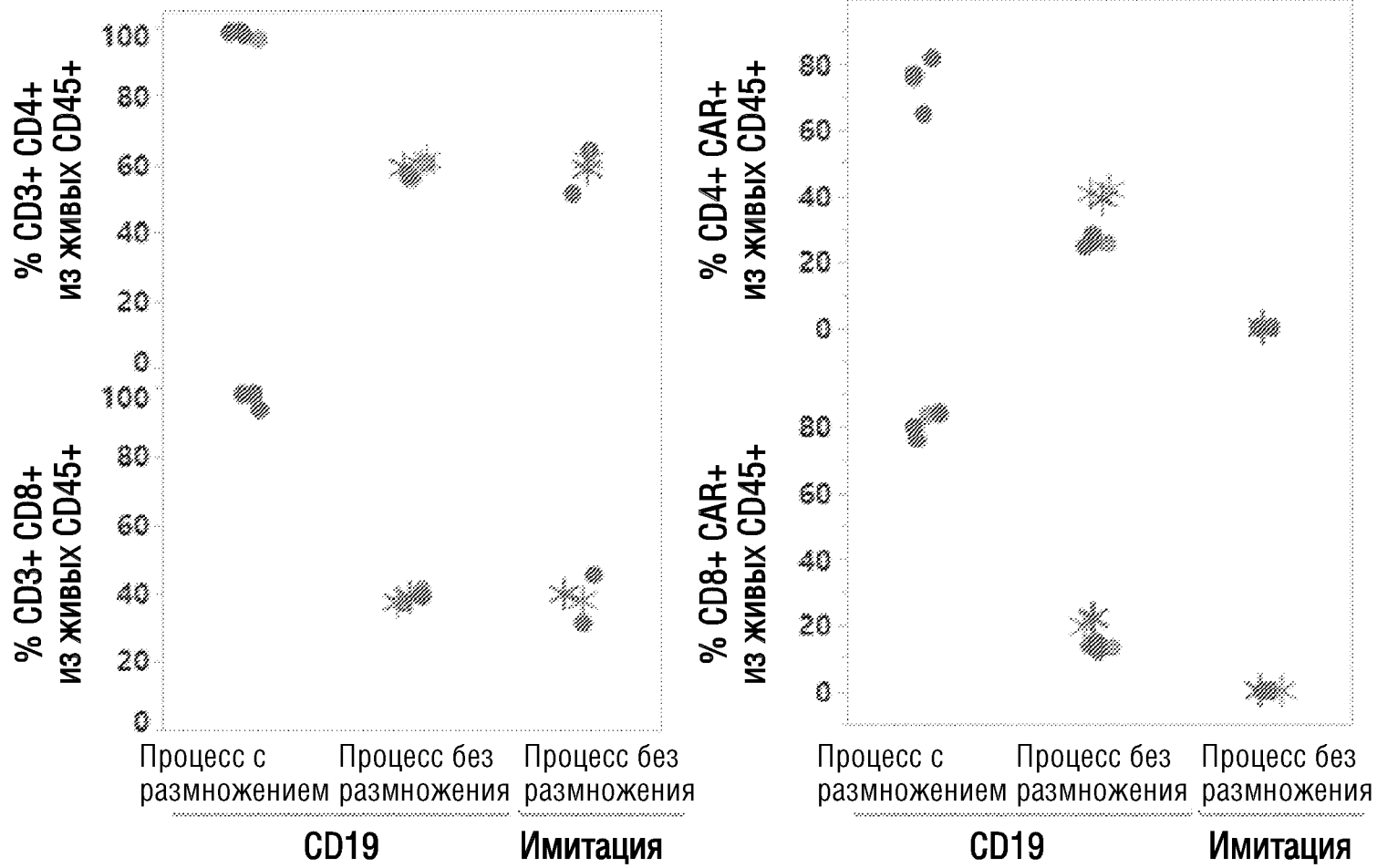
117. Способ по любому из пп.1-116, отличающийся тем, что В-клеточная NHL представляет собой рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-клеточную NHL).

118. Готовое изделие, содержащее композицию, содержащую генетически сконструированные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который таргетирует CD19, и инструкции по введению композиции клеток в соответствии со способом по любому из пп. 1-117.

ФИГ.1



ФИГ.2



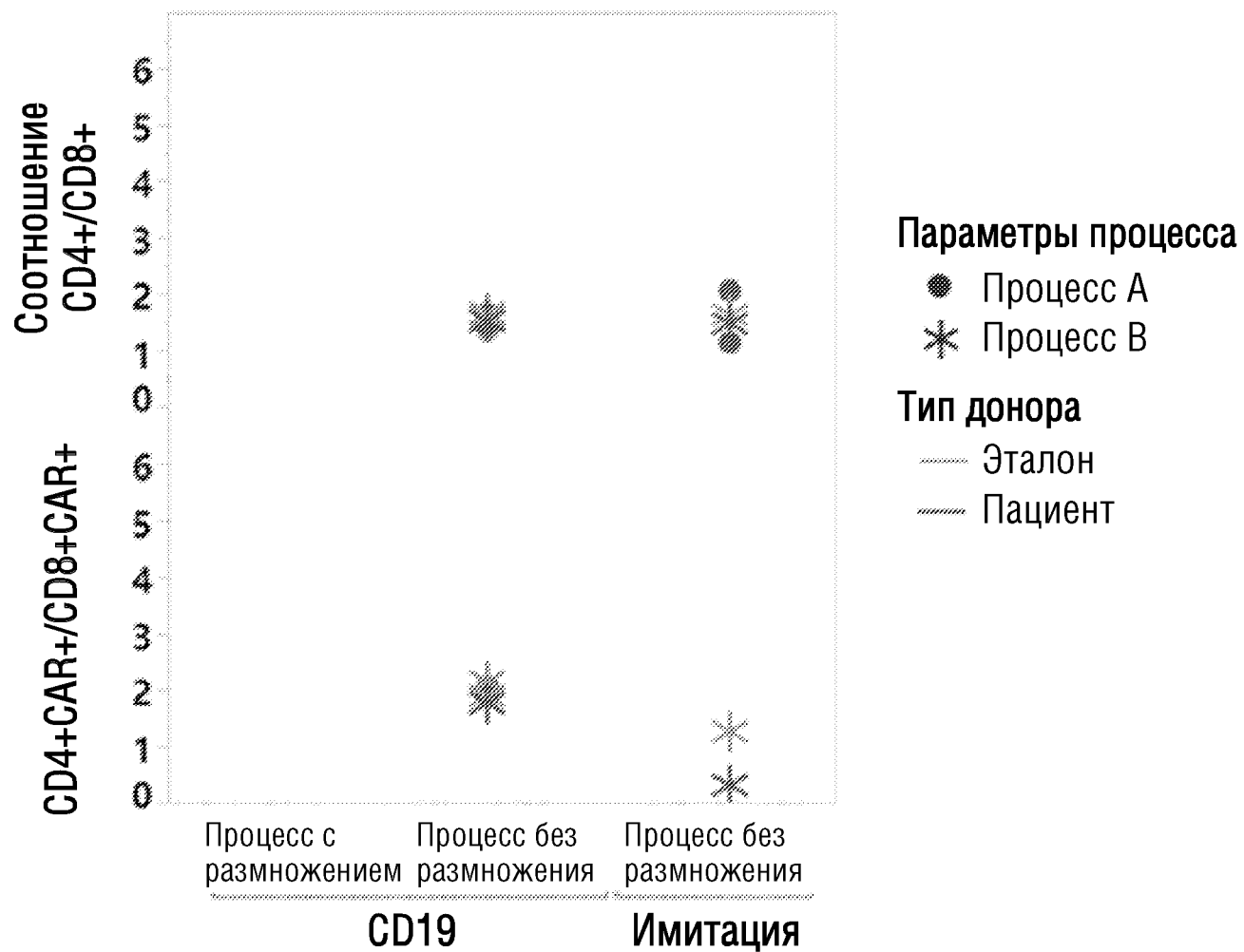
Параметры процесса

- Процесс А
- * Процесс В

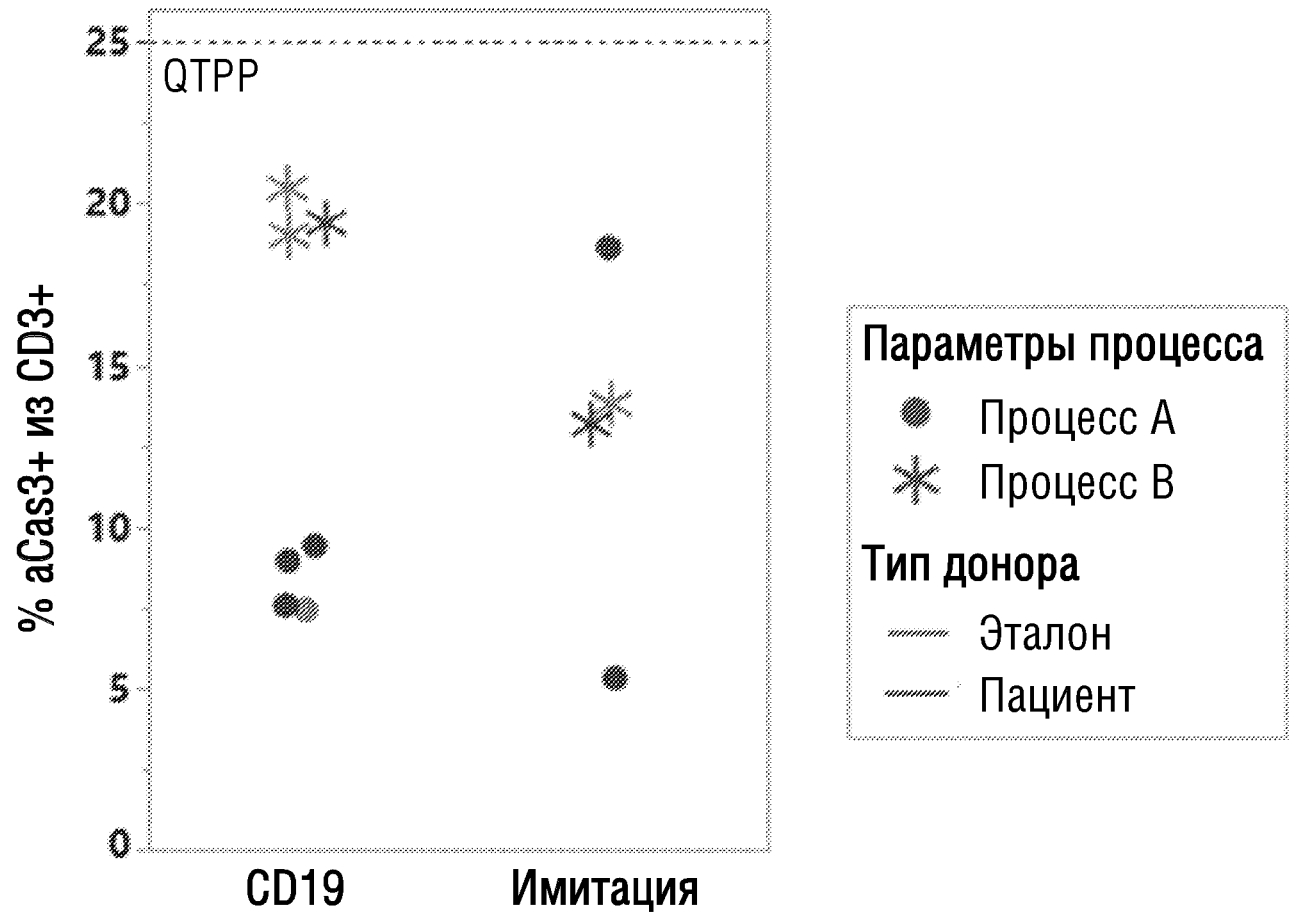
Тип донора

- Эталон
- //// Пациент

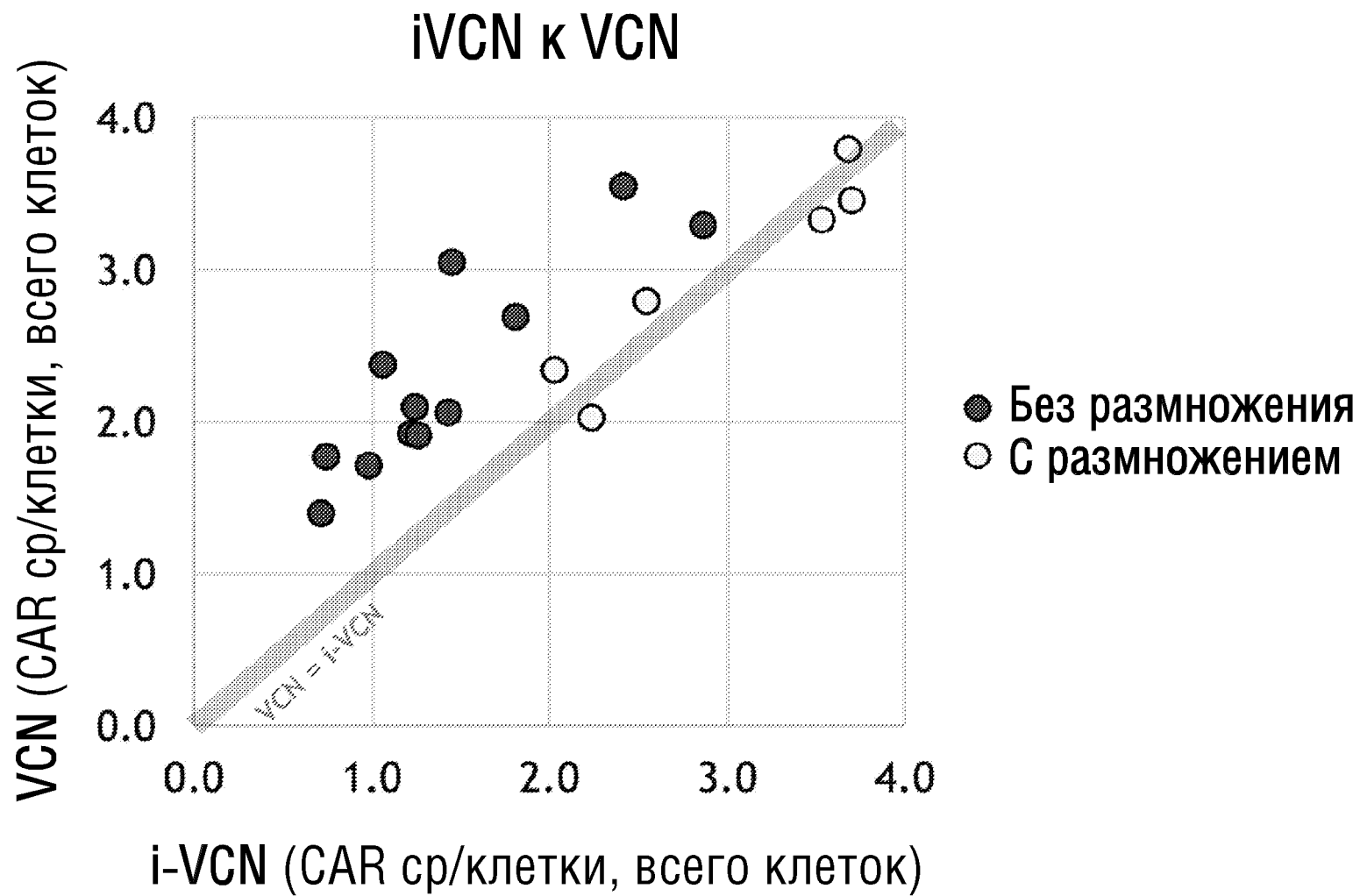
ФИГ.3



ФИГ.4



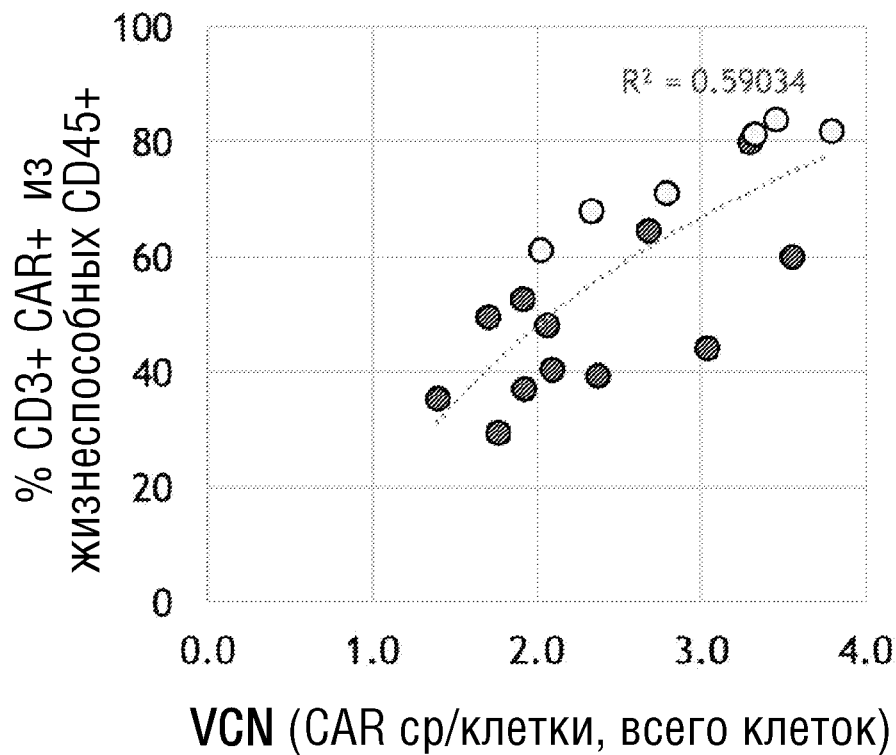
ФИГ.5А



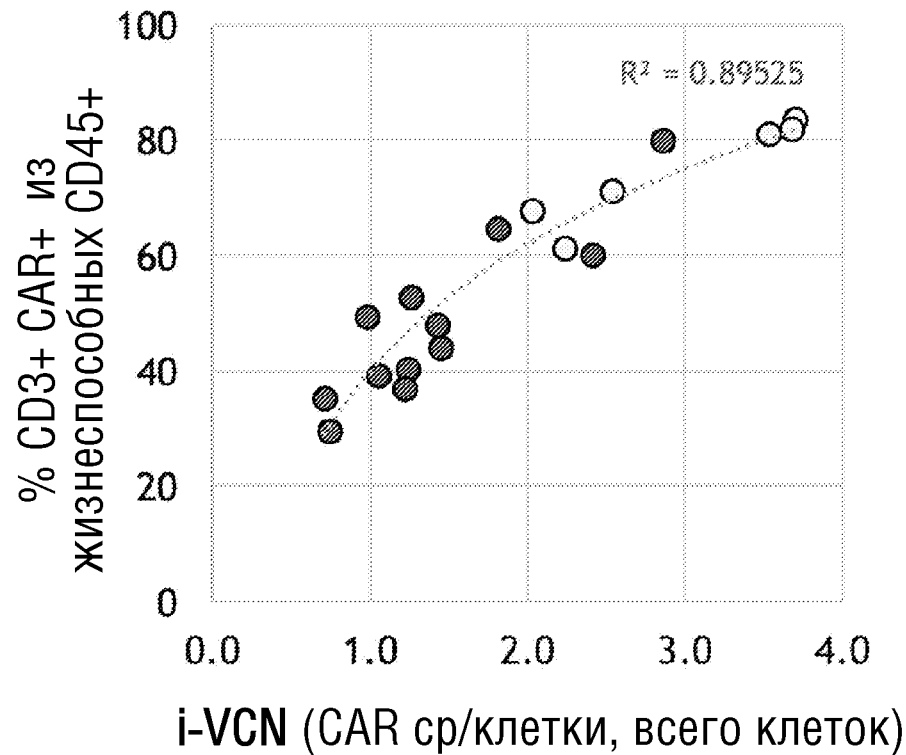
ФИГ.5В

ФИГ.5С

VCN к CD3+ CAR+%

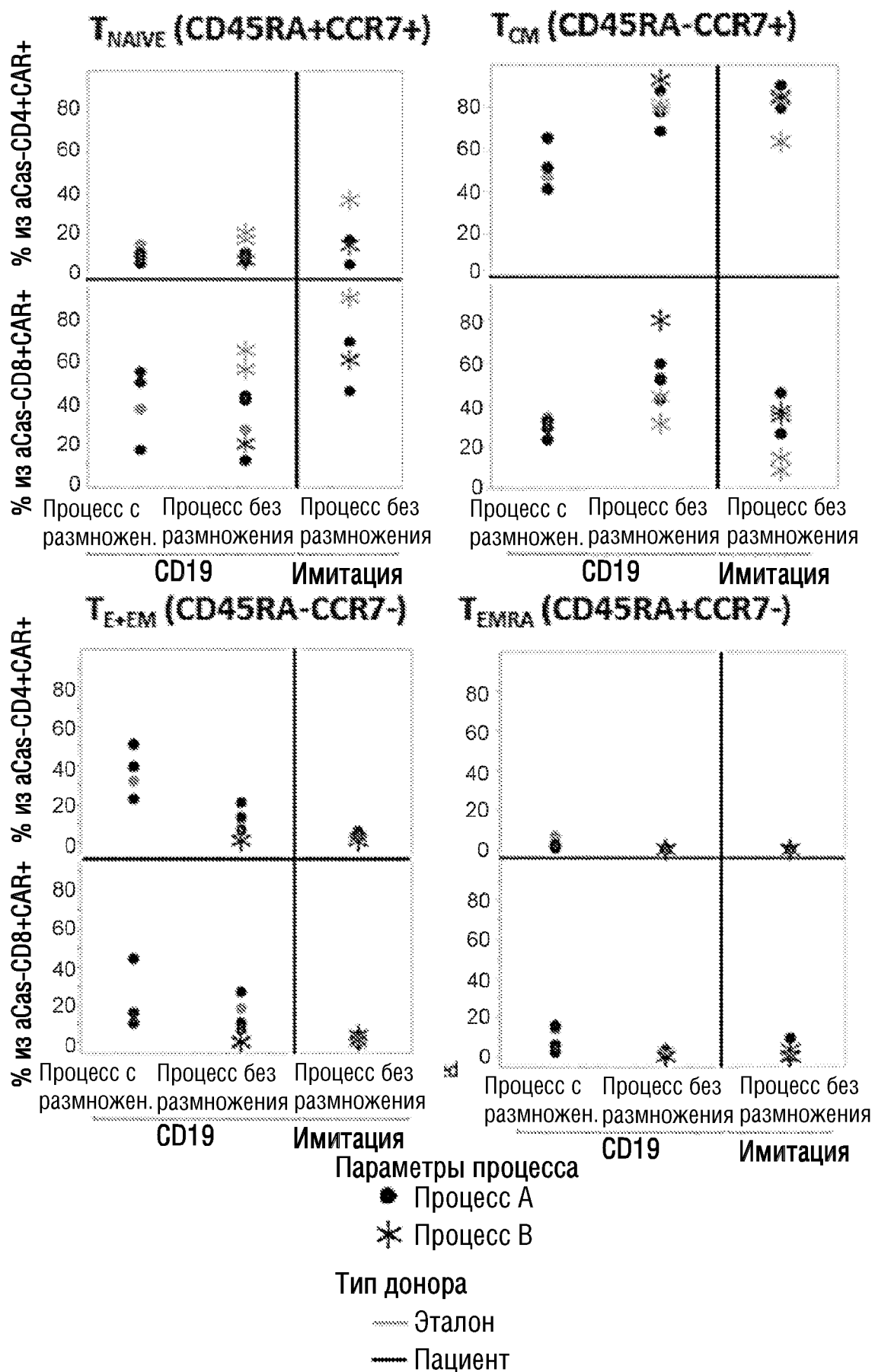


iVCN к CD3+ CAR+%

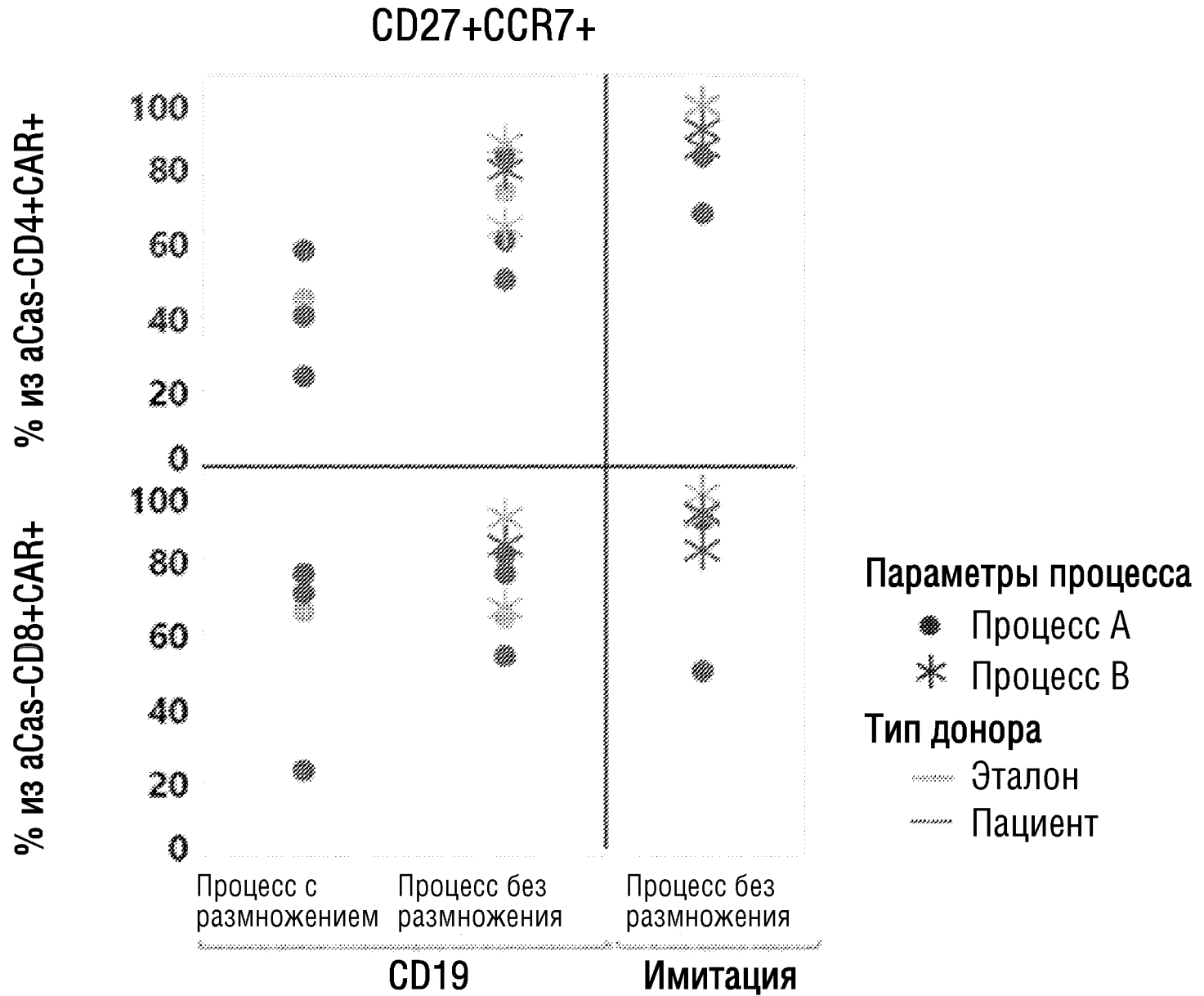


- Без размножения
- С размножением

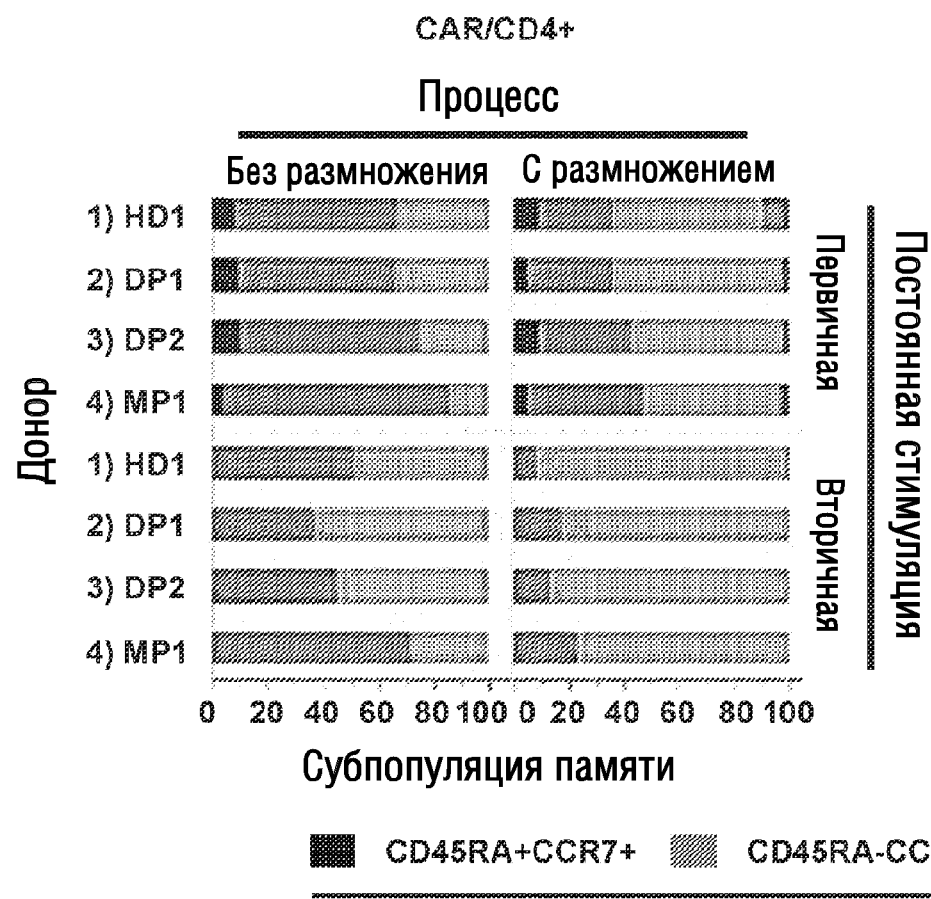
ФИГ.6А



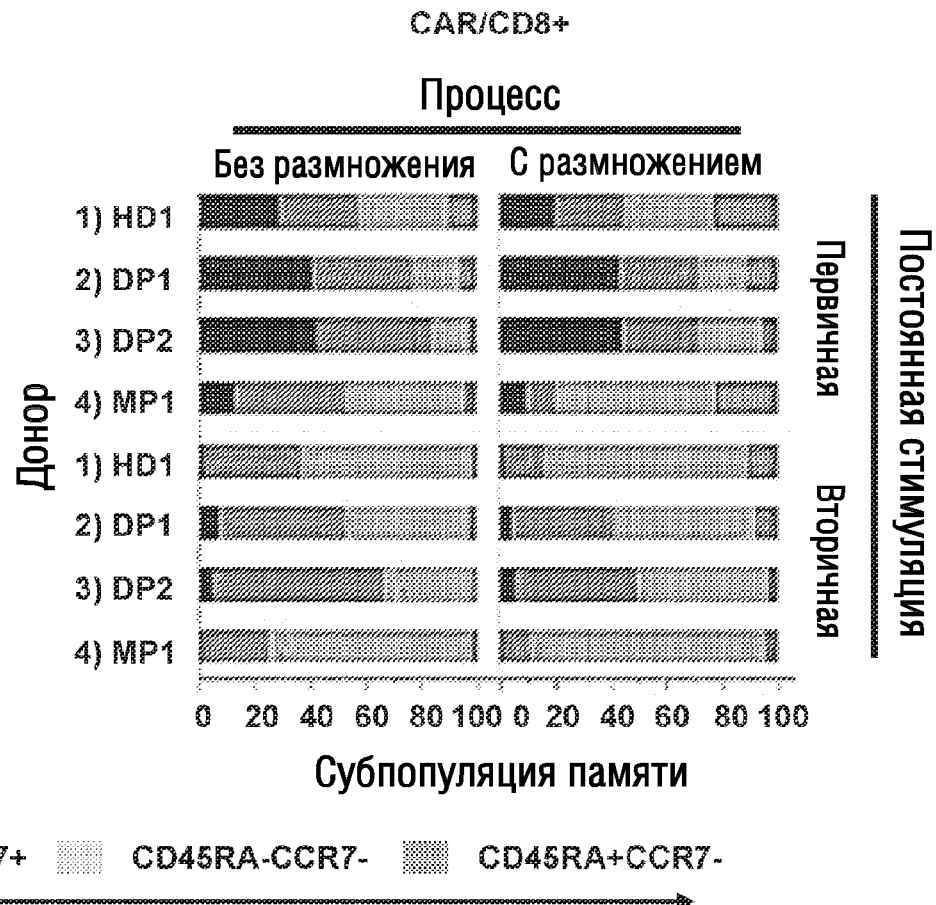
ФИГ.6В



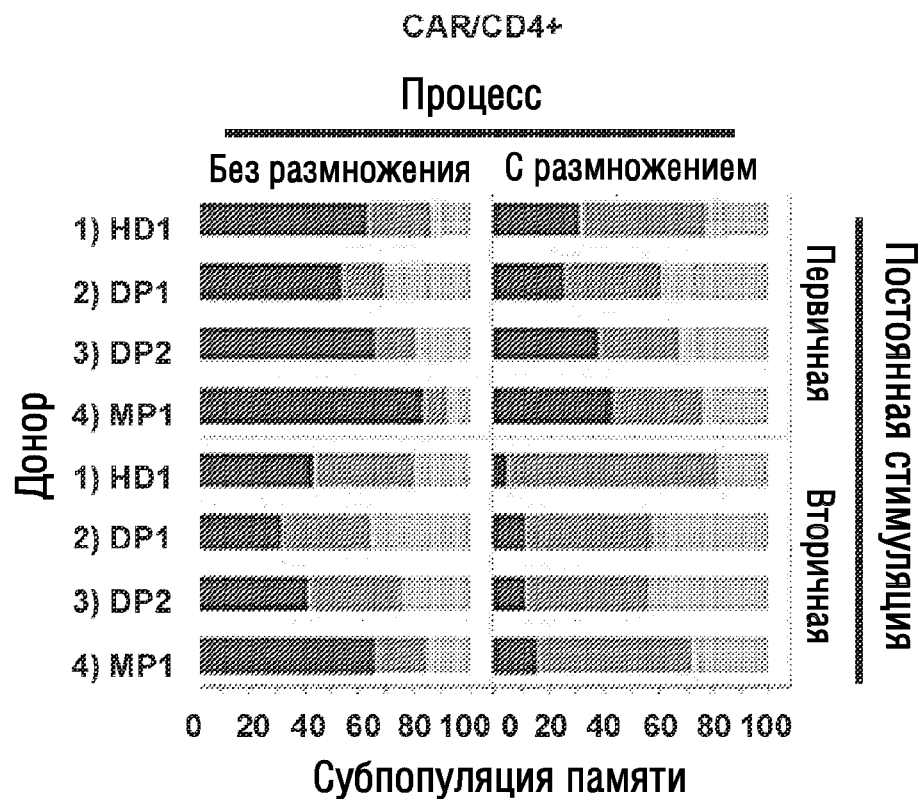
ФИГ.7А



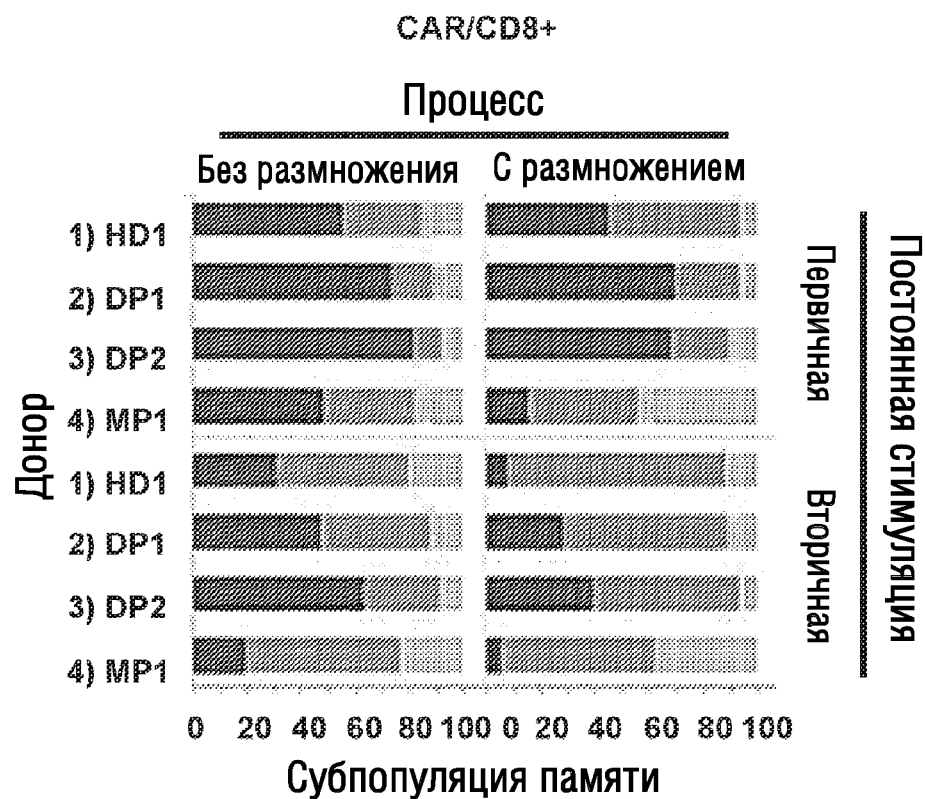
ФИГ.7В



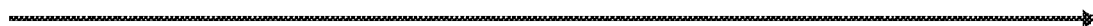
ФИГ.7С



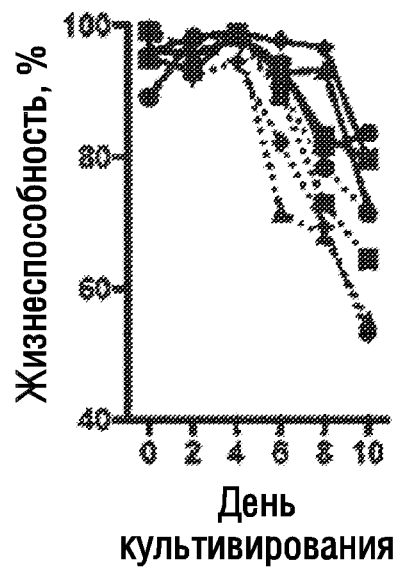
ФИГ.7D



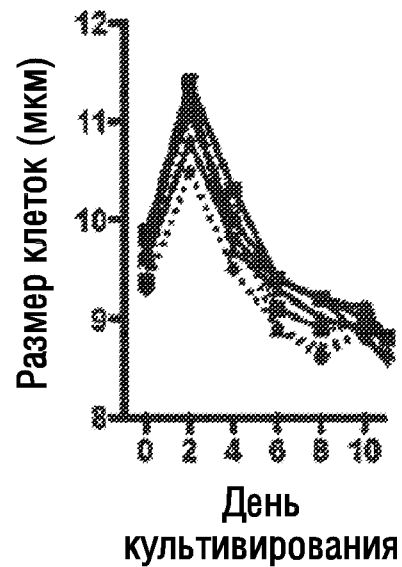
CD27+CCR7+
 CD27+CCR7-
 CD27-CCR7+
 CD27-CCR7-



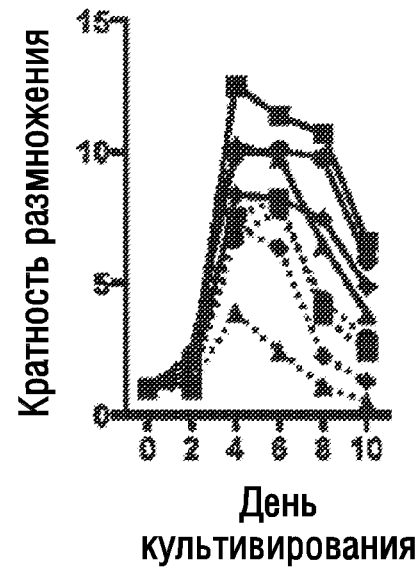
ФИГ.8А



ФИГ.8В

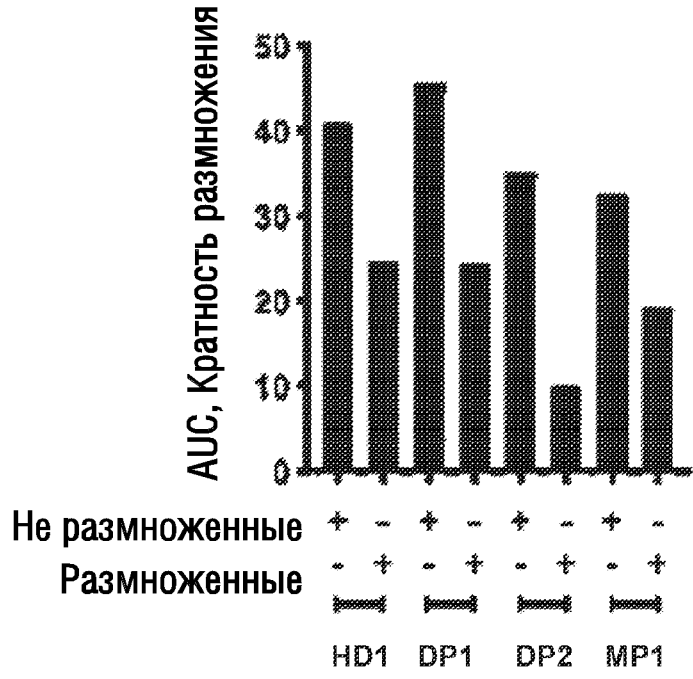


ФИГ.8С

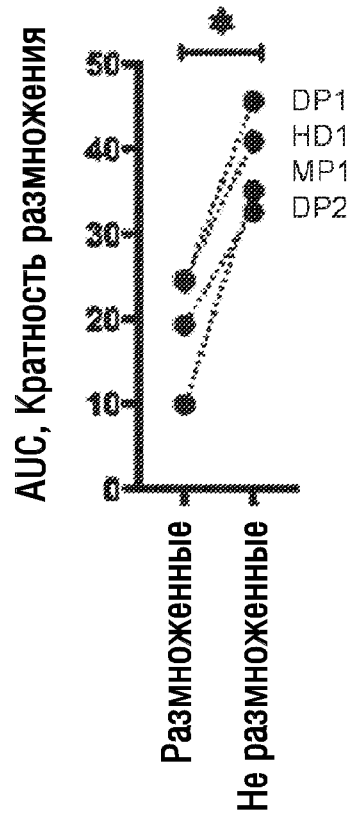


- Не размноженные HD1
- Не размноженные DP1
- Не размноженные DP2
- Не размноженные MP1
- Размноженные HD1
- Размноженные DP1
- Размноженные DP2
- Размноженные MP1

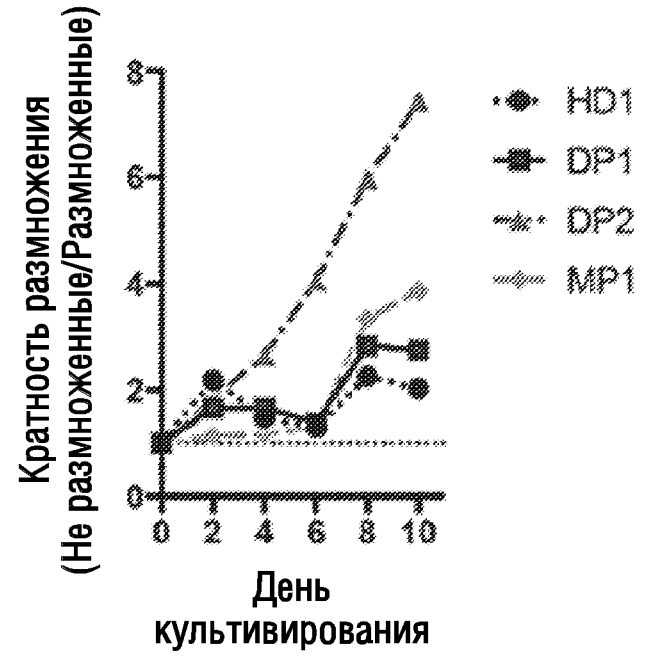
ФИГ.8D



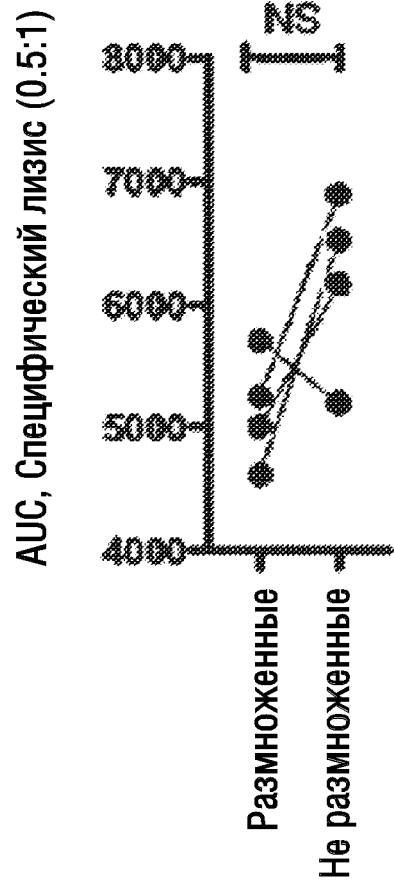
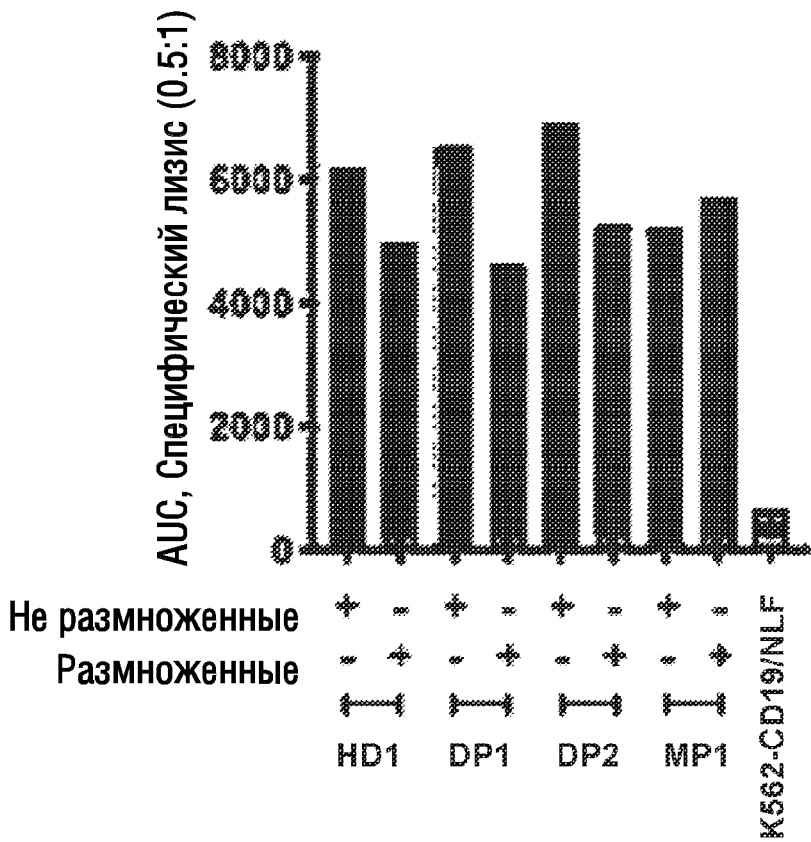
ФИГ.8E



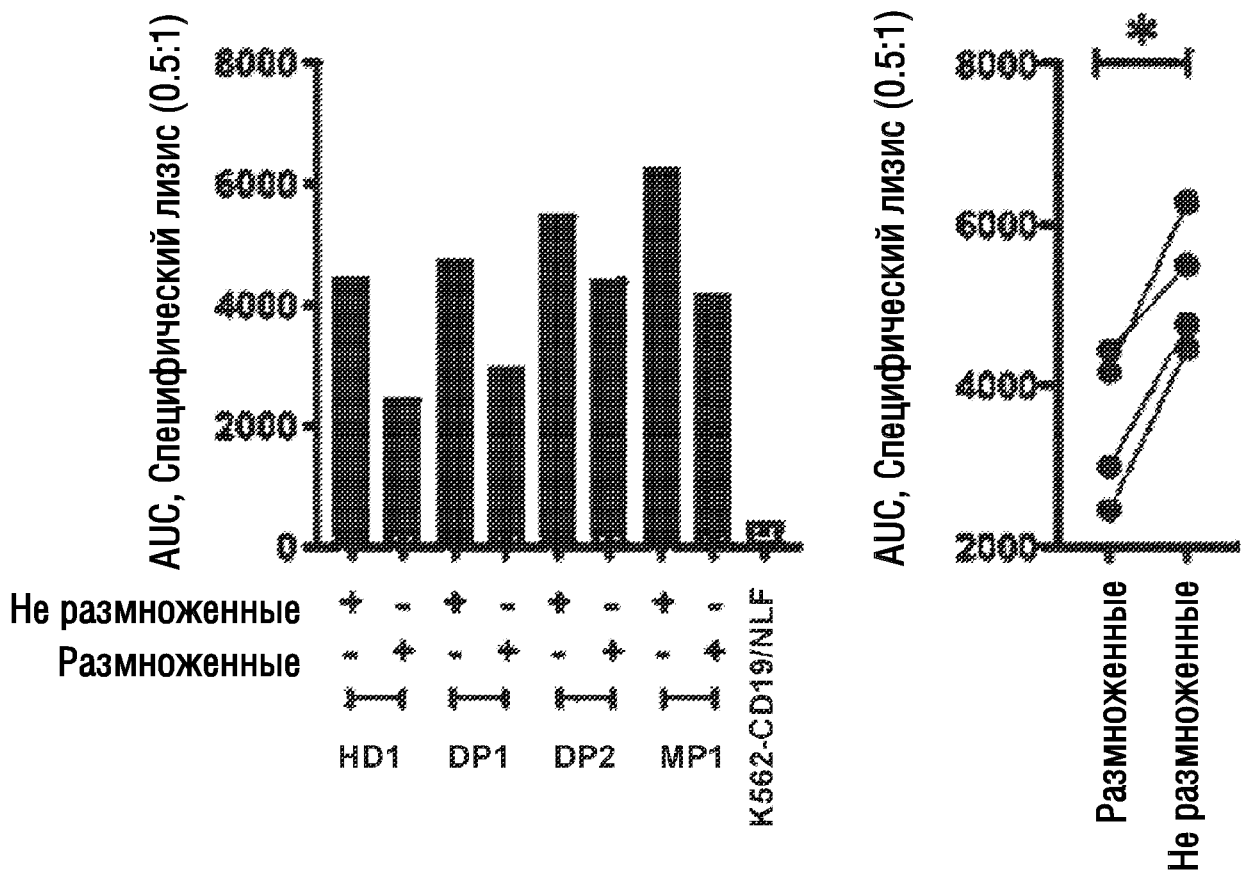
ФИГ.8F



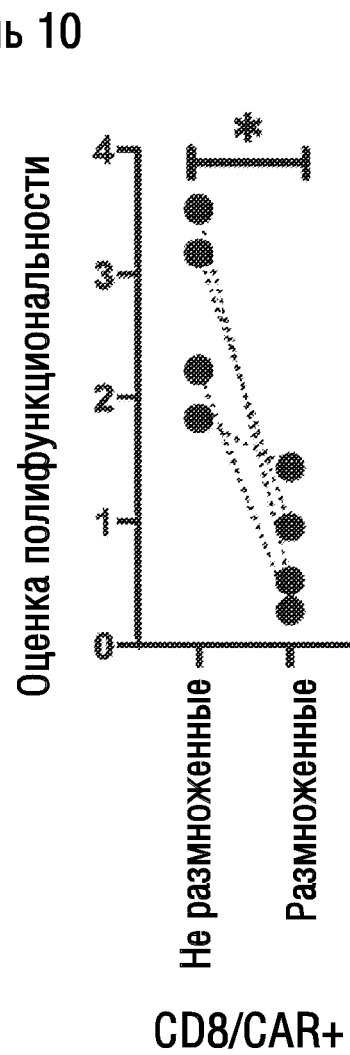
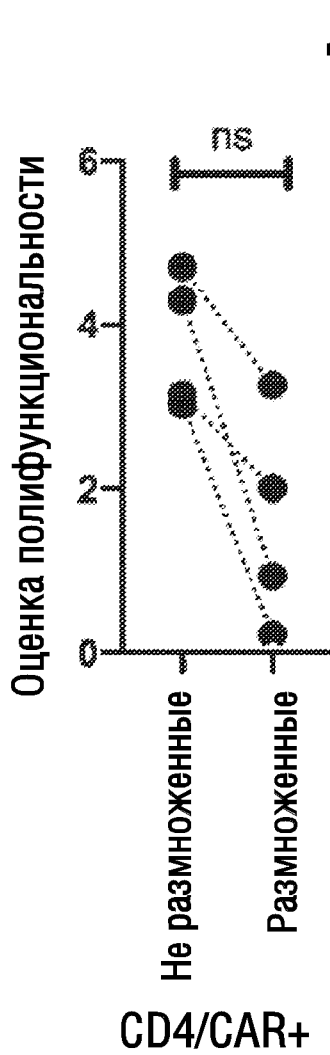
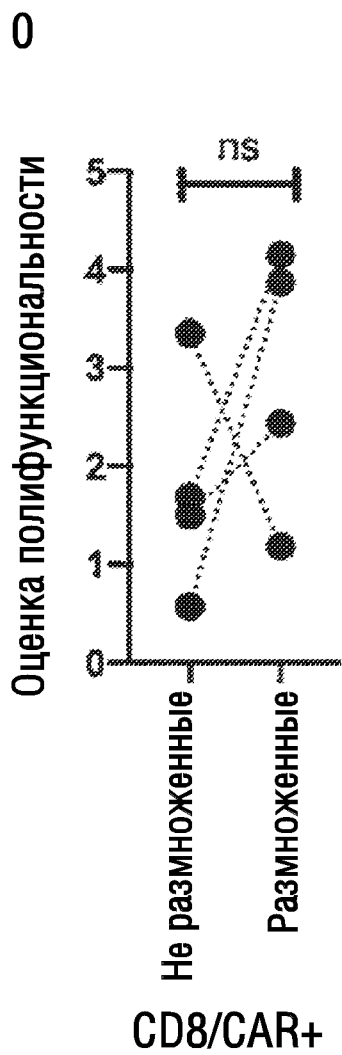
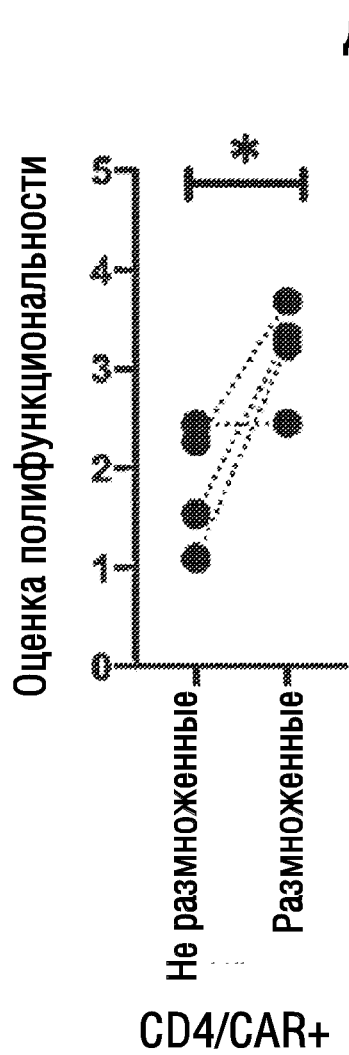
ФИГ.9А



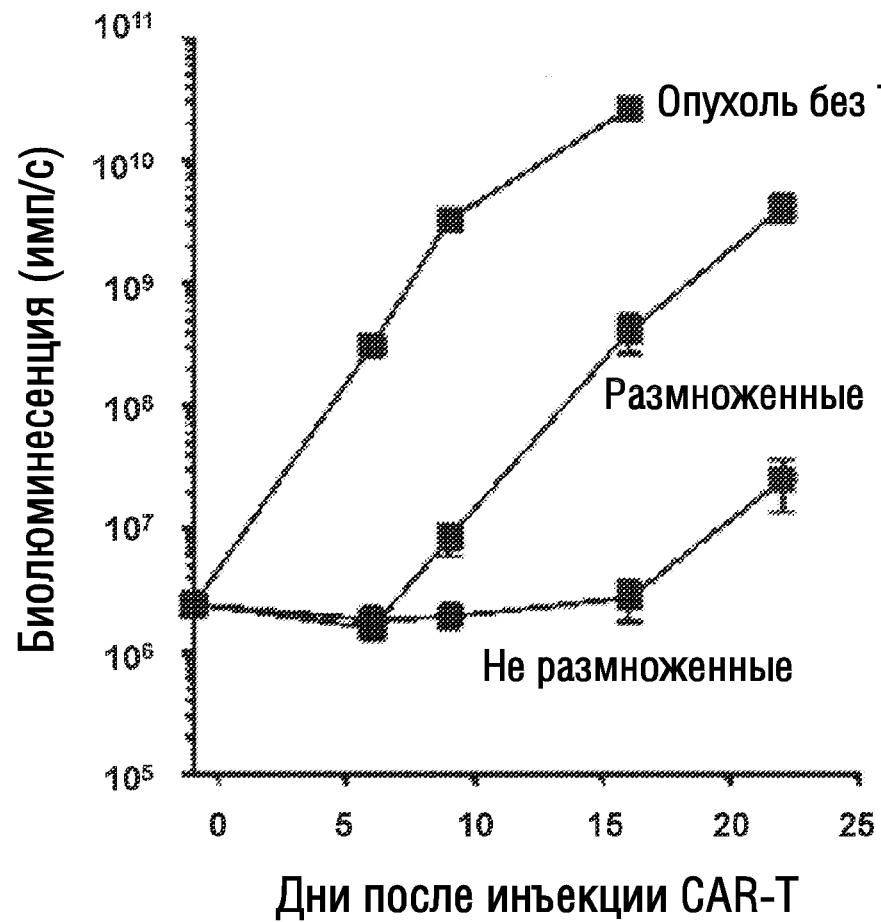
ФИГ.9В



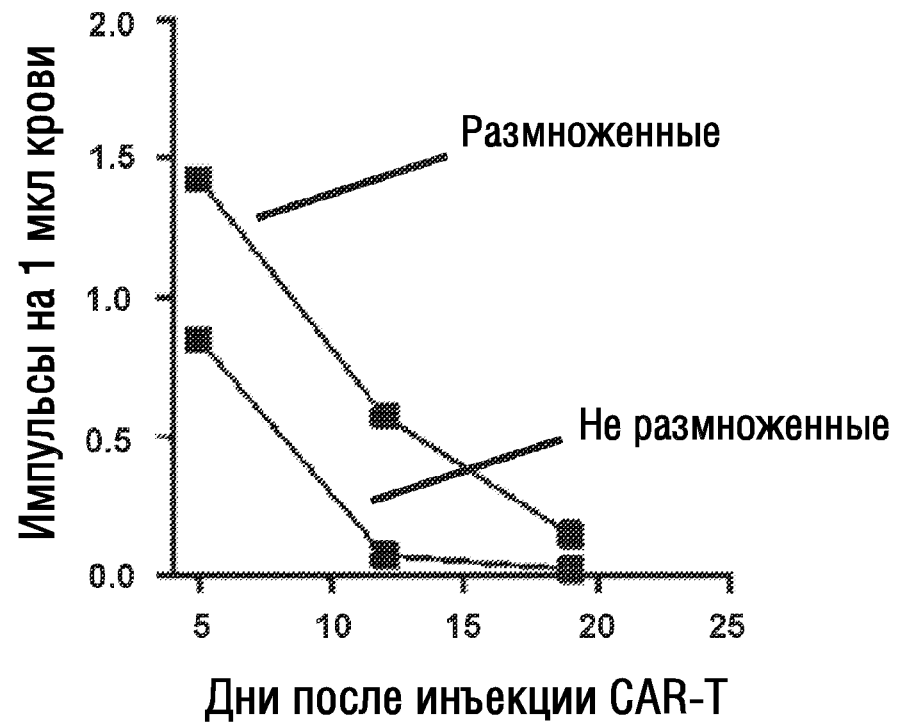
ФИГ.10



ФИГ.11А

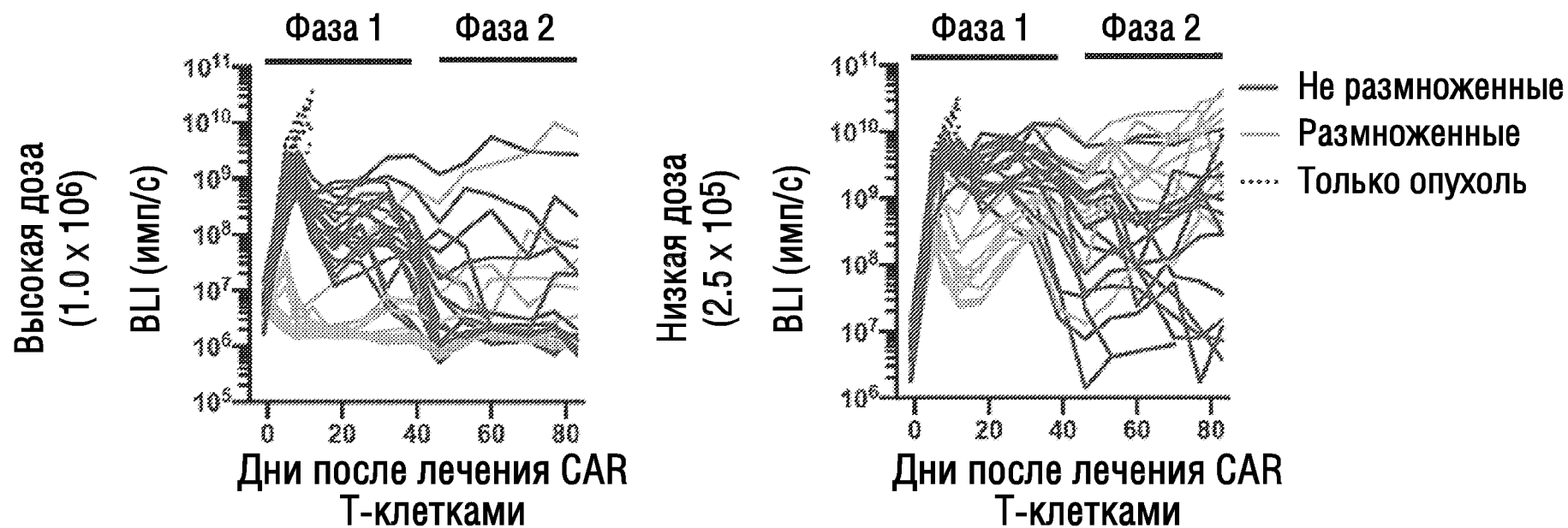


ФИГ.11В



ФИГ.12А

Опухолевая масса для всех групп



ФИГ.12В

Абсолютное количество CAR T

