(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292312 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.19

(22) Дата подачи заявки
2021.02.11

(51) Int. Cl. ***A61K 35/17*** (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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

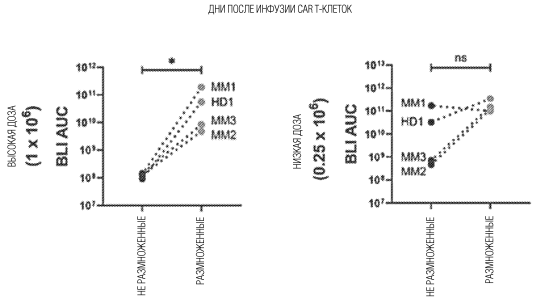
(31) **62/975,731**
(32) **2020.02.12**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/017737**
(87) **WO 2021/163389 2021.08.19**

(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, Полторак Матеуш Павел (DE), Башур Кинан, Батуревич Олександр, Килавуз Нургул, Хидж Кристен, Берджесс Майкл, У Кайда, Салмон Рут Аманда, Кегель Эшли (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В некоторых аспектах предложены композиции клеток для лечения субъектов с заболеваниями и состояниями, такими как множественная миелома (ММ), и родственные способы, композиции, применения и готовые изделия. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рецидивирующую или не поддающуюся лечению множественную миелому (r/r ММ). Клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), для таргетирования антигена, такого как BCMA, на клетки миеломы.



202292312 A1

202292312 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575278EA/032

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

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/975,731, поданной 12 февраля 2020 и озаглавленной «BCMA-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 735042023540SEQLIST.txt, созданного 10 февраля 2021 и имеющего размер 184 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 множественная миелома (ММ), 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 множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленно воздействующий на антиген

созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; и композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленно воздействующий на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 5:1; и композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленно воздействующий на антиген созревания В-клеток (BCMA), где: композиция содержит CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD4+ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR и до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

В одном аспекте в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где: композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 $CD27^+CCR7^+$.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где: композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно; 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 составляет в среднем меньше или меньше примерно 0,9.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где: композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно; по меньшей мере, или по меньшей мере примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки; и интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR^+ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от точно или примерно $50x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от точно или примерно $70x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $160x10^6$ Т-

клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 5:1; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно; 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 множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или

примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

В одном аспекте в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $100x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 $CD27^+CCR7^+$.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток,

экспрессирующих CAR, включительно; 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 составляет меньше или меньше примерно 0,9.

В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR; композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR включительно; 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 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 5:1. В некоторых из любых вариантов осуществления, композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

В некоторых из любых вариантов осуществления, композиция может содержать $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2 до примерно 4:1, от примерно 1:1,5 до примерно 2:1, или точно или примерно 1:1. В некоторых из любых вариантов осуществления, композиция может включать $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 5:1 до примерно 2:1, от примерно 4:1 до примерно 2:1, от примерно 3:1 до примерно 2:1, точно или примерно 5:1, точно или примерно 4:1, точно или примерно 3:1, или точно или примерно 2:1. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток,

экспрессирующих CAR, до точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать от точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать точно или примерно $30x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых из любых вариантов осуществления, композиция может содержать точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых из любых вариантов осуществления, композиция может содержать точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать точно или примерно $60x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, композиция может содержать точно или примерно $160x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

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

В некоторых из вариантов осуществления, 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, от точно или примерно 2% 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, от точно или 5% до точно или примерно 10% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3. В любом из вариантов осуществления, 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, 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, от точно или примерно 20% и 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, 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 некоторых из любых вариантов осуществления, маркер апоптоза представляет собой аннексин V. В некоторых из любых вариантов осуществления, маркер апоптоза представляет собой активную каспазу 3.

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

В любом из вариантов осуществления, 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, 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, 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, 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, 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 любом из вариантов осуществления, 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. 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, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ 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, примерно 70% $CD4^+CAR^+$ 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, примерно 80% $CD4^+CAR^+$ 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, примерно 85% $CD4^+CAR^+$ 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, примерно 50% $CD8^+CAR^+$ 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 60% $CD8^+CAR^+$ 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% $CD8^+CAR^+$ 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% $CD8^+CAR^+$ 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 85% $CD8^+CAR^+$ 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% $CD8^+CAR^+$ 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 60% $CD8^+CAR^+$ 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 70% $CD8^+CAR^+$ 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 80% $CD8^+CAR^+$ 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 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивному или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

В любом из вариантов осуществления, 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. В любом из вариантов осуществления, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов

осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$. В любом из вариантов осуществления, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

В любом из вариантов осуществления, доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) от общего числа VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,9.

В любом из вариантов осуществления, отношение числа копий интегрированного вектора (iVCN) к общему количеству VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,9 до точно или примерно 0,8. В любом из вариантов осуществления, доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) от общего числа VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,8. В любом из вариантов осуществления, отношение интегрированного числа копий вектора (iVCN) к 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, отношение интегрированного числа копий 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, отношение интегрированного числа копий 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, интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR^+ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

В любом из вариантов осуществления, 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, 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. В любом из вариантов осуществления, 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, 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 некоторых из любых вариантов осуществления на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект ранее получил, по меньшей мере, 3 схемы лечения против миеломы. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект получил три или несколько видов терапии, необязательно, четыре или несколько предшествующих терапий, выбранных из трансплантации аутологичных стволовых клеток (ASCT); иммуномодулирующего агента; ингибитора протеасомы; и анти-CD38 агента, за исключением случаев, когда субъект не был кандидатом или не имел противопоказаний для одной или нескольких терапий. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток, субъект получил три или несколько видов терапии, необязательно четыре или несколько предшествующих терапий, необязательно выбранных из трансплантации аутологичных стволовых клеток

(ASCT); иммуномодулирующего агента и ингибитора протеасом, по отдельности или в комбинации; и анти-CD38 агента. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект получил все три из следующих видов терапии, включая трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT); схему, включающую иммуномодулирующиц агент и ингибитор протеасомы; и анти-CD38 агент.

В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект получил все три из следующих схем лечения против миеломы: трансплантация аутологичных стволовых клеток (ASCT); иммуномодулирующий агент и/или ингибитор протеасом, отдельно или в комбинации; и анти-CD38 агент. В некоторых из любых вариантов осуществления, индукция с или без трансплантации костного мозга и с или без поддерживающей терапии считается одной схемой с целью определения количества предшествующих схем лечения против миеломы.

В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект невосприимчив к последней схеме лечения против миеломы. В некоторых из любых вариантов осуществления, не поддающаяся лечению миелома определяется как документально подтвержденное прогрессирующее заболевание во время или в течение 12 месяцев, измеренных от последней дозы, до завершения лечения по последней схеме лечения против миеломы. В некоторых из любых вариантов осуществления, не поддающаяся лечению миелома определяется как документально подтвержденное прогрессирующее заболевание во время или в течение 60 дней, измеренных от последней дозы, до завершения лечения по последней схеме лечения против миеломы.

В некоторых из любых вариантов осуществления иммуномодулирующий агент выбран из талидомида, леналидомида и помалидомида либо по отдельности, либо в комбинации. В некоторых из любых вариантов осуществления, ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба, либо по отдельности, либо в комбинации.

В некоторых из любых вариантов осуществления субъект прошел, по меньшей мере, один полный цикл лечения по схеме лечения против миеломы, включающей иммуномодулирующий агент и/или ингибитор протеасом, за исключением случаев, когда прогрессирование заболевания было лучшим ответом на схему лечения против миеломы. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект прошел, по меньшей мере, два последовательных цикла лечения по схеме лечения против миеломы, включающей

иммуномодулирующий агент и/или ингибитор протеасом, за исключением случаев, когда прогрессирование заболевания было лучшим ответом на схему лечения против миеломы.

В некоторых из любых вариантов осуществления, анти-CD38 агент представляет собой анти-CD38 антитело. В некоторых из любых вариантов осуществления, анти-CD38 агент представляет собой или содержит даратумумаб. В некоторых из любых вариантов осуществления, анти-CD38 агент применяют как часть комбинированной схемы или в качестве монотерапии.

В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъекта не имеет активный или анамнез плазмаклеточного лейкоза (PCL). В некоторых из любых вариантов осуществления, во время введения у субъекта возник рецидив или была невосприимчивость к лечению после, по меньшей мере, 3 или, по меньшей мере, 4 предшествующих схем лечения против миеломы. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения, у субъекта время от момента постановки диагноза множественной миеломы составляет приблизительно 4 года, или от 2 до 15 лет, или от 2 до 12 лет. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения, субъект получил примерно 10, или от 3 до 15, или от 4 до 15 предшествующих схем лечения против миеломы. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения, субъект был невосприимчив к бортезомибу, карфилзомибу, леналидомиду, помалидомиду и/или анти-CD38 моноклональному антителу или не отвечал на них. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения субъекту уже была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения субъекту ранее не была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток (ASCT) из-за неприемлемости для ASCT, необязательно, непригодности из-за возраста или других документально подтвержденных причин. В некоторых из любых вариантов осуществления, на момент введения субъект имеет цитогенетику IMWG высокого риска. В некоторых из любых вариантов осуществления, у субъекта нет поражения центральной нервной системы ММ, плазмаклеточного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема, синдрома POEMS (полинейропатия, органомегалия, эндокринопатия, моноклональный белок, изменения кожи) и/или клинически значимого амилоидоза. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект ранее не получал терапию CAR Т-клетками или генетически модифицированными Т-клетками. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект ранее не получал терапию, направленно воздействующую на BCMA, такую как анти-BCMA моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

В некоторых из любых вариантов осуществления, способ дополнительно включает

получение образца лейкафереза от субъекта для изготовления композиции, содержащей сконструированные Т-клетки.

В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект не получал терапевтическую дозу кортикостероида, необязательно, в течение точно или примерно 14 дней до момента проведения лейкафереза. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект не получал иммунодепрессивную терапию в течение 4 недель после лейкафереза, необязательно, где иммунодепрессивная терапия включает ингибитор кальциневрина, метотрексат или другие химиотерапевтические агенты, микофенолат, рапамицин, иммунодепрессивные антитела, такие как анти-TNF, анти-IL6 или анти-IL6R. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъекту не была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток в течение точно или примерно 6 месяцев до момента проведения лейкафереза.

В любом из вариантов осуществления, субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию. В любом из вариантов осуществления, субъект не достиг объективного ответа (частичного ответа (PR) или лучше) в ответ на предшествующую терапию. В любом из вариантов осуществления, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий общее состояние по оценке Восточной объединенной онкологической группы (ECOG PS) 0 или 1.

В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, включая вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включая определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), содержащуюся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включая определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR-L1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2), и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:119; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L,

включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно; или V_H, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, и V_L, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119; и спейсер, включающий химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную область C_H2 IgG2/4; и область C_H3 IgG4, которая необязательно имеет длину примерно 228 аминокислот; необязательно, где спейсер указан в SEQ ID NO:174; и трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен CD28 человека; и внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ) и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клетки или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой спейсер, представленный в SEQ ID NO:174.

В некоторых вариантах осуществления, V_H представляет собой или может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119. В некоторых из любых вариантов осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен может включать scFv. В некоторых из любых вариантов осуществления, V_H и V_L соединены гибким линкером. В некоторых из любых вариантов осуществления, scFv может включать линкер, включающий аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1). В некоторых из любых вариантов осуществления, V_H является карбокси-концевой по отношению к V_L. В некоторых из любых вариантов осуществления, scFv содержит линкер, содержащий аминокислотную последовательность SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA (SEQ ID NO:255).

В некоторых из любых вариантов осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:114. В некоторых из любых вариантов осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен может включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114.

В некоторых из любых вариантов осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, может включать нуклеотидную

последовательность SEQ ID NO:113; нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с ней; или вырожденную последовательность любой из предыдущих последовательностей. В некоторых из любых вариантов осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, может включать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:115. В некоторых из любых вариантов осуществления, V_H является амино-концевой по отношению к V_L.

В некоторых из любых вариантов осуществления, цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или может включать последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143. В некоторых из любых вариантов осуществления, костимулирующая сигнальная область может включать внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область может включать внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB, необязательно 4-1BB человека. В некоторых из любых вариантов осуществления, костимулирующая сигнальная область представляет собой или может включать последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4. В некоторых из любых вариантов осуществления, костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом цепи CD3-дзета (CD3ζ).

В некоторых из любых вариантов осуществления, трансмембранный домен представляет собой или может включать трансмембранный домен CD28 человека. В некоторых из любых вариантов осуществления, трансмембранный домен представляет собой или может включать последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138.

В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать, от своего N-конца к С-концу, по порядку: внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, включая вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включая определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включая определяющую комплементарность

область 1 легкой цепи (CDR-L1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2), и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:119; спейсер, включающий модифицированный шарнир IgG4; химерную область C_H2 IgG2/4; и область C_H3 IgG4 длиной примерно 228 аминокислот; трансмембранный домен CD28 человека; и внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ) и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:114, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:114; спейсер, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:174, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:174; трансмембранный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138; и внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматическую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4.

В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:114; спейсер, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:174; трансмембранный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138; и внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматическую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать внеклеточный антигенсвязывающий домен, представленный в SEQ ID NO:114; спейсер, представленный

в SEQ ID NO:174; трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO:138; и внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматическую сигнальную область, представленную в SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, представленную в SEQ ID NO:4. В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR может включать последовательность, представленную в SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах осуществления, последовательность CAR представлена в SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах осуществления, после экспрессии полинуклеотида, кодирующего CAR, в клетке человека, необязательно в Т-клетке человека, транскрибируемая РНК, необязательно матричная РНК (мРНК) из полинуклеотида демонстрирует, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% гомогенность РНК. В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности. В некоторых из любых вариантов осуществления, CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO:13.

В некоторых из любых вариантов осуществления, связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена и/или CAR, или мера, указывающая на функцию или активность CAR после воздействия на клетки, экспрессирующие поверхностный BCMA, не снижается, не блокируется или не по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или шеддинговой формы BCMA. В некоторых из любых вариантов осуществления, концентрация или количество растворимой или шеддинговой формы BCMA соответствует концентрации или количеству, присутствующему в сыворотке, крови или плазме субъекта или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов с множественной миеломой, или при концентрации или количестве растворимого или шеддингового BCMA, при которых связывание или мера снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный анти-BCMA рекомбинантный рецептор, необязательно, эталонный анти-BCMA CAR, в том же анализе.

В некоторых из любых вариантов осуществления, перед введением субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 30 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней, и/или циклофосфамида в дозе точно или примерно 200-400 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 из любых вариантов

осуществления, перед введением субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 30 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней. В некоторых из любых вариантов осуществления, перед введением субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение циклофосфамида в дозе точно или примерно 200-400 мг/м^2 площадь поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 300 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 30 мг/м^2 поверхности тела субъекта, ежедневно, и циклофосфамида в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 поверхности тела субъекта, ежедневно, каждый в течение 3 дней.

В некоторых из любых вариантов осуществления, способ позволяет достичь определенного ответа или результата, необязательно, в указанный момент времени после начала введения, по меньшей мере, у одного из одного из или, по меньшей мере, у 10%, по меньшей мере, у 20%, по меньшей мере, у 30%, по меньшей мере, у 40%, по меньшей мере, у 50%, по меньшей мере, у 60%, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ, где: ответ выбран из группы, состоящей из объективного ответа (OR), полного ответа (CR), строгого полного ответа (sCR), очень хорошего частичного ответа (VGPR), частичного ответа (PR) и минимального ответа (MR); ответ или исход представляет собой или включает OR; и/или ответ или исход представляет собой или включает CR.

В некоторых из любых вариантов осуществления, когорта субъектов имеет, по меньшей мере, такое же количество предшествующих терапий, прогноз или прогностический фактор, подтип, вторичное поражение или другую конкретную характеристику или характеристики пациента, что и субъект, которого лечили данным способом. В некоторых из любых вариантов осуществления, ответ или исход является устойчивым в течение более чем точно или примерно 3, 6, 9 или 12 месяцев. В некоторых из любых вариантов осуществления, ответ или исход, определенный точно или примерно через 3, 6, 9 или 12 месяцев после указанного момента времени, равен или лучше по сравнению с ответом или исходом, определенным в указанный момент времени.

В некоторых из любых вариантов осуществления, ответ или исход представляет собой или включает или дополнительно включает отсутствие нейротоксичности, отсутствие синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или отсутствие синдрома активации макрофагов/гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (MAS/HLH). В некоторых

из любых вариантов осуществления, способ не приводит к определенному исходу токсичности, необязательно, в указанный момент времени, после начала введения, по меньшей мере, у одного из или, по меньшей мере, у 10%, по меньшей мере, у 20%, по меньшей мере, у 30%, по меньшей мере, у 40%, по меньшей мере, у 50%, по меньшей мере, у 60%, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдром активации макрофагов/гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (MAS/HLH). В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность, и нейротоксичность не возникает у, по меньшей мере, 60%, 70% или 80% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность 3 степени или выше или 4 степени или выше. В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность 3 степени или выше, и нейротоксичность 3 степени или выше не возникает у, по меньшей мере, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный исход токсичности представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно, синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше, или 4 степени или выше. В некоторых из любых вариантов осуществления, CRS не возникает у, по меньшей мере, 15%, 20%, 25% или 30% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно или в пределах 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или 15 дней после начала введения. В некоторых из любых вариантов осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев или 12 месяцев после начала введения.

В некоторых вариантах осуществления, способ не приводит к развитию синдрома высвобождения цитокинов (CRS), по меньшей мере, у 50%, по меньшей мере, у 60%, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых вариантах осуществления, способ не приводит к тяжелому синдрому высвобождения цитокинов (CRS), по меньшей мере, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых из любых вариантов осуществления, способ не приводит к какой-либо нейротоксичности, по

меньшей мере, у 60%, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых вариантах осуществления, способ не приводит к тяжелой нейротоксичности, по меньшей мере, по меньшей мере, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых из любых вариантов осуществления, способ не приводит к тяжелому CRS и тяжелой нейротоксичности, по меньшей мере, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В некоторых из любых вариантов осуществления, способ не приводит к тяжелому CRS и тяжелой нейротоксичности, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или по меньшей мере, у 95% субъектов в когорте субъектов, страдающих ММ. В любом из таких вариантов осуществления, тяжелый CRS представляет собой CRS 3 степени или выше, 4 степени или выше или CRS 5 степени. В любом из таких вариантов осуществления, тяжелая нейротоксичность имеет 3 степень или выше, 4 степень или выше или 5 степень CRS.

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 некоторых из любых вариантов осуществления, композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, вводят парентерально, необязательно, внутривенно. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъектом является человек.

В некоторых из любых вариантов осуществления, композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, получают с помощью производственного процесса, включающего: (i) воздействие на входную 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 направленно воздействует на BCMA, 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, входная 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, лейкарефеза) от субъекта.

В любом из вариантов осуществления, композиция, включающая сконструированные Т-клетки, производится с помощью производственного процесса, включающего воздействие на входную 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, производственный процесс может дополнительно включать введение в Т-клетки стимулируемой популяции гетерологичного полинуклеотида, кодирующего CAR, который направленно воздействует на BCMA, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, производственный процесс может дополнительно включать инкубацию популяции трансформированных клеток в течение вплоть до 96 часов. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в минимальной среде, не содержащей один или несколько рекомбининтных цитокинов.

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:266-270. 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:257, 272, 275, 277, 279, 273 или 276. 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, производственный процесс может дополнительно включать сбор Т-клеток из популяции трансформированных клеток с получением, таким образом, композиции сконструированных клеток. В любом из вариантов осуществления, сбор проводят в момент времени от 24 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента. В любом из вариантов осуществления, сбор проводят в момент времени от 48 до 120 часов, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента. В любом из вариантов осуществления, 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, 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, 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, сбор проводят в момент времени, когда доля $CD27^+CCR7^+$ клеток составляет 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. В любом из вариантов осуществления, сбор проводят в то время, когда доля клеток $CD45RA^{+}CCR7^{+}$ и $CD45RA^{-}CCR7^{+}$ составляет больше или больше примерно 60% 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.

В любом из вариантов осуществления, клетки входной композиции получают в процессе производства для получения выходной композиции, 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 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 B- 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, 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 любом из вариантов осуществления, входная композиция производится с помощью производственного процесса для получения выходной 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, ММ представляет собой рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению множественную миелому (r/r ММ).

В настоящем документе также представлено готовое изделие, включающее композицию, включающую генетически сконструированные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленно воздействующий на BCMA, 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-BCMA CAR (BCMA), 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 – ФИГ. 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-

BCMA CAR (BCMA), 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-BCMA CAR (BCMA), или подвергают ложной трансдукции (имитация). Определяют долю aCas3+ клеток в CD3+ клетках.

На **ФИГ. 5А** показан пример взаимосвязи между числом копий на клетку среди общего числа клеток, оцененной с помощью стандартного VCN (без 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 процесса с размножением (○) или процесса без размножения (●). На **ФИГ. 5В-5С** показана взаимосвязь между числом копий на клетку в клеточных композициях, оцененных с помощью стандартных VCN (**ФИГ. 5В**) или iVCN (**ФИГ. 5С**), 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. 6А-6В** 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-BCMA CAR (BCMA), или подвергают ложной трансдукции (имитация). На **ФИГ. 6А** 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. 7** показаны типовые пропорции фенотипов Т-клеток памяти, определяемые поверхностной экспрессией CD45RA и CCR7 на CAR Т-клетках, полученных из продуктов процесса без размножения и продуктов процесса с размножением соответствующих доноров. CAR Т-клетки получают из CD4+ и CD8+ Т-клеток одного здорового донора

(HD1) или 3 пациентов с множественной миеломой (MM1, MM2 или MM3).

На **ФИГ. 8A-8C** показана типовая in vitro пролиферативная способность клеток, полученных в процессах без размножения или с размножением после длительной анти-BCMA CAR-зависимой стимуляции агонистическим антителом. CAR T-клетки получают из CD4+ и CD8+ T-клеток от одного здорового донора (HD1) или от 3 пациентов с множественной миеломой (MM1, MM2, MM3), и общее количество живых клеток определяют каждые 2 дня после стимуляции с помощью микроносителей, покрытых агонистическим антителом в течение 10 дней. На **ФИГ. 8A** показано кратное изменение размножения, рассчитанное путем деления ежедневных подсчетов на начальное количество клеток. На **ФИГ. 8B** показано количество CAR T-клеток, преобразованное в AUC, для сравнения между продуктами (продукты процесса без размножения; продукты процесса с размножением; имитация) или донорами. Статистическую значимость определяют с помощью критерия Манна-Уитни; *p <0,05. На **ФИГ. 8C** показано кратное увеличение для каждого донора, рассчитанное путем деления ежедневного кратного размножения в группе продукта процесса без размножения на значения продуктов процесса с размножением соответствующего донора.

На **ФИГ. 9A-9E** показаны типовые количественные оценки внутриклеточного продуцирования цитокинов IL-2, IFNγ или TNF, измеренные с помощью проточной цитометрии (**ФИГ. 9A-9D**) и секретируемых цитокинов (**ФИГ. 9E**) из анти-BCMA CAR T-клеток, полученных из продуктов процесса без размножения и продуктов процесса с размножением соответствующего донора. CAR T-клетки получены от одного пациента с множественной миеломой или от 2 здоровых доноров после культивирования клеток с агонистическим антителом в течение 5 часов. Показана частота CAR-положительных клеток, экспрессирующих одиночные цитокины (**ФИГ. 9A-9C**), или трижды положительных клеток с гейтированием по булевой логике (**ФИГ. 9D**) в популяциях CD4+CAR+ или CD8+CAR+. Секрецию белка цитокинов измеряют с помощью множественного иммуноанализа количественного определения концентраций секретируемых цитокинов (**ФИГ. 9E**, показывающая общую секрецию белка, измеренную в супернатантах культур) после культивирования клеток в течение 24 часов с MM.1S BCMA-положительными клетками-мишенями. Статистическую значимость оценивают по Манну-Уитни; *p <0,05.

На **ФИГ. 10A** показан типовой цитолитический потенциал анти-BCMA CAR T-клеток, сконструированных с помощью процессов без размножения или с размножением при различных соотношениях эффектора к мишени. Значения площади под кривой (AUC) сравнивают либо для отдельных групп (левая панель на **ФИГ. 10B**), либо в зависимости от

производственного процесса (правые панели на **ФИГ. 10В**, статистическая значимость с критерием Манна-Уитни; *p <0,05).

На **ФИГ. 11А-11В** показана типовая опухолевая масса и циркулирующие CAR-T-клетки в модели миеломы OPM-2 с течением времени после лечения композициями анти-BCMA CAR-T-клеток, полученных в результате процессов конструирования без размножения и с размножением соответствующего донора. Рост опухоли с -1 дня (до лечения) до примерно 53 дня после лечения показан в BLI (фотоны/секунду; ось у) (**ФИГ. 11А**) или рассчитан из площади под кривой (AUC) BLI для каждой группы. (**ФИГ. 11В**). Различия сравнивают с помощью U-критерия Манна-Уитни; *p <0,05.

На **ФИГ. 12А-12В** показана типовая кинетика CAR T и количество циркулирующих CAR-T клеток в модели миеломы OPM-2 в зависимости от времени после обработки композициями анти-BCMA CAR-T клеток, полученными в процессах конструирования без размножения и с размножением соответствующего донора. На **ФИГ. 12А** показано количество циркулирующих анти-BCMA CAR-T-клеток на 1 мкл крови после лечения для каждой группы. На **ФИГ. 12В** показано количество циркулирующих анти-BCMA CAR-T-клеток на 1 мкл крови в указанные моменты времени после лечения для каждой группы (без размножения, NE; с размножением, E). Различия сравнивают с помощью U-критерия Манна-Уитни; *p <0,05.

Подробное описание

В настоящем документе предложены способы и применение сконструированных клеток, экспрессирующих анти-BCMA рекомбинантные рецепторы (например, CAR) и их фармацевтических композиций и составов, например, для лечения заболеваний, состояний и нарушений, при которых экспрессируется BCMA, в частности, гематологических злокачественных образований, таких как множественная миелома (ММ). В вариантах осуществления предложенных способов, терапевтические композиции Т-клеток, содержащие сконструированные клетки, вводят субъекту, страдающему ММ, например, с помощью адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В конкретных вариантах осуществления любого из предложенных способов, Т-клетки конструируют с CAR, который направлен против BCMA. В некоторых аспектах, способы и применения предложены для или позволяют достичь улучшенного ответа, и/или более 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 клеточных композиций с

определенными характеристиками (например, соотношениями 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 BCMA, экспрессируемый, ассоциированный с и/или специфичный для ММ, 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, BCMA-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 BCMA-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 предложенных 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 BCMA-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 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 BCMA-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 BCMA-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 BCMA-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 BCMA-направленных CAR Т-клеточных композиций (например, сконструированных с таким же или подобным CAR, например, с тем же антигенсвязывающим доменом), но в которых эталонная BCMA-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 BCMA-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, BCMA-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 BCMA-направленные CAR Т-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 BCMA-направленные CAR сконструированные Т-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 BCMA-направленной CAR Т-клеточной композиции, процессы включают одну или несколько стадий стимуляции и генной инженерии (например, трансформацию, трансдукцию или трансфекцию) Т-клеток для получения популяции сконструированных Т-клеток, которые можно собирать или составлять для использования в качестве композиции для клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, процессы включают стадию трансдукции клеток вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую BCMA-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 BCMA-направленные CAR Т-клетки с повышенной активностью по сравнению со сконструированными Т-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, Т-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 Т-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 B1 и европейский патент EP 0 700 430 B1). 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 BCMA-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 ММ, включая ММ высокого риска, агрессивную и/или R/R, могут делиться или размножаться с разной скоростью. В некоторых аспектах, устранение потенциально вариабельных 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 гематологическое злокачественно образование или ММ с высоким риском. В некоторых аспектах, способы лечат субъектов, имеющих форму ММ с плохим прогнозом, такой как ММ, которая рецидивирует или не поддается лечению (R/R) стандартной терапией и/или имеет плохой прогноз. В некоторых

аспектах, способы лечат субъектов с ММ, 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).

Множественная миелома (ММ) представляет собой гематологическое злокачественное образование, характеризующееся клональной пролиферацией и накоплением злокачественных плазматических клеток в костном мозге и развитием остеолитических поражений (Palumbo et al., N Engl J Med. 2011; 364(11):1046-60). На его долю приходится примерно 10% всех гематологических злокачественных образований. По оценкам, в 2019 г. в Соединенных Штатах (США) будет диагностировано примерно 32 110 новых случаев и 12 960 случаев смерти от ММ (Siegel et al., CA Cancer J Clin. 2019; 69(1):7-34).

Средний возраст при постановке диагноза составляет 69 лет, и менее 15% вновь диагностированных лиц моложе 55 лет (SEER Cancer Stat Facts: веб-сайт Myeloma, https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html., по состоянию на 8 марта 2019). Клинические признаки симптоматического заболевания обобщаются с помощью так называемых «критериев CRAB», которые включают повышение уровня кальция, почечную недостаточность, анемию и литические поражения костей или остеопороз (Palumbo et al., N Engl J Med. 2011; 364(11):1046-60). Множественная миелома представляет собой молекулярно, биологически и клинически гетерогенное заболевание, при котором у одних пациентов оно быстро прогрессирует, несмотря на лечение, а у других лечение не требуется

в течение нескольких лет. Общая выживаемость (OS) (медиана) составляет от 5 до 6 лет (Nandakumar et al., JCO 2019; 37:15_suppl: 8039).

Новые агенты (например, иммуномодулирующие лекарственные средства, ингибиторы протеасом, анти-CD38 или SLAMF7-направленные моноклональные антитела) сами по себе или в комбинации с традиционной терапией привели к значительному улучшению клинических исходов у пациентов с ММ. Однако, несмотря на эти недавние достижения, ММ остается неизлечимым заболеванием с множественными рецидивами и высокой смертностью по мере появления резистентных к лекарственным средствам клонов (Cho et al., Front Immunol. 2018; 9:1821; Cornell et al., Bone Marrow Transplant 2016; 51). (4):479-91). Медиана общей выживаемости (OS) пациентов с ММ с рецидивом и/или невосприимчивостью к лечению (R/R) доступными терапиями является плохой. Поэтому необходимы новые терапевтические подходы для преодоления рецидивов и улучшения исходов выживаемости у пациентов с ММ.

Антиген созревания В-клеток (BCMA), член надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), представляет собой белок клеточной поверхности, экспрессируемый на плазматических клетках, который участвует в регуляции созревания В-клеток и дифференциации в плазматические клетки. Он индуцируется при дифференциации плазматических клеток параллельно с потерей экспрессии родственного рецептора фактора активации В-клеток (BAFF-R). Связывание BCMA с его лигандами, фактором активации В-клеток (BAFF) и лигандом, индуцирующим пролиферацию (APRIL), приводит к выживанию плазматических клеток, что приводит к усилению гуморального иммунитета.

BCMA является привлекательной терапевтической мишенью, поскольку BCMA в высокой степени экспрессируется на клеточных линиях ММ и на клетках пациентов с ММ, и его экспрессия, по-видимому, увеличивается по мере прогрессирования заболевания (Tai et al., Immunotherapy 2015; 7(11):1187-99). Важно отметить, что белок BCMA не экспрессируется в гемопоэтических стволовых клетках, наивных В-клетках или нормальных не гемопоэтических тканях (Carpenter et al., Clin Cancer Res. 2013; 19(8):2048-60; Tai et al., Immunotherapy 2015; 7(11):1187-99). Таким образом, токсичность, связанная с взаимодействием «на мишень/вне опухоли», снижается при использовании агентов, направленно воздействующих на BCMA.

Задача разработки CAR Т-клеток состоит в том, чтобы создать продукт, который постоянно размножается, сохраняется и обеспечивает устойчивый противоопухолевый ответ после инфузии. BCMA-таргетные CAR Т-клетки оценивают для лечения ММ. В доклинических исследованиях, Т-клетки, трансдуцированные конструкцией BCMA-

таргетного химерного антигенного рецептора (CAR), продуцировали высокий уровень цитокинов (например, интерферона-гамма [IFN-γ], TNFα, интерлейкина-2 [IL-2]) и пролиферировали при стимуляции с BCMA-экспрессирующими клетками-мишенями. Кроме того, BCMA-таргетные CAR Т-клетки убивали BCMA-экспрессирующие клетки ММ и уничтожали BCMA-экспрессирующие опухоли в моделях ксенотрансплантатов у мышей (Carpenter et al., Clin Cancer Res. 2013; 19(8):2048-60). Жизнестойкость CAR-сконструированных Т-клеток и продолжительность ответа у пациентов с множественной миеломой после введения BCMA-направленных CAR Т-клеток представляет собой проблему.

В конкретных вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, основаны на применении BCMA-направленной терапии Т-клетками CAR, в которой CAR содержит BCMA-направленный антигенсвязывающий домен scFv. CAR дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен из CD3zeta, и также включает костимулирующий домен 4-1BB.

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 BCMA-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 меньше, 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 BCMA-направленной CAR Т-клеточной терапии в соответствии с предложенными способами. Например, пациентов с ММ, включая пациентов с ММ высокого риска, таких как пациенты с рецидивирующей/не поддающейся лечению (R/R) ММ, 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 BCMA-ТАРГЕТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

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 BCMA-направленных CAR сконструированных клеток (например, Т-клеток) и/или их композиций, включая способы лечения субъектов, страдающих множественной миеломой (ММ), ММ высокого риска, такую как R/R ММ, которые включают введение сконструированных клеток и/или их композиций. В некоторых вариантах осуществления, способы и применение предложенных BCMA-направленных CAR сконструированных клеток (например, Т-клеток) и/или их композиций, включая способы лечения субъектов с R/R ММ, 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 BCMA.

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 BCMA, экспрессируемые, ассоциированные с и/или специфичные для ММ 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 BCMA-направленным рекомбинантным рецептором (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, клетки собирают с помощью лейкафереза. 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, подлежащее лечению, представляет собой множественную миелому (ММ) высокого риска. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет поддающееся измерению заболевание, о чем свидетельствует уровень М-белка в сыворотке, более или равный 0,5 г/дл, по данным электрофореза белков сыворотки (SPEP); уровень М-белка в моче, более или равный 200 мг/24 часа, по данным электрофореза белков мочи (UPEP); вовлеченный уровень свободных легких цепей в сыворотке (SFLC), более или равный 10 мг/дл, сопровождающийся аномальным соотношением каппа/лямбда; или любую комбинацию любах из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта до проведения лейкафереза имеется поддающееся измерению заболевание, о чем свидетельствует уровень М-белка в сыворотке менее 0,5 г/дл; уровень М-белка в моче менее 200 мг/сут; и уровень SFLC, более или равный 10 мг/дл, сопровождающийся аномальным соотношением каппа/лямбда.

В некоторых вариантах осуществления, субъект перед лейкаферезом 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 BCMA-направленных композиций CAR Т-клеток, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к одной или несколькими линиями предшествующей терапии ММ. В любых вариантах осуществления, во время до лейкафереза в связи с конструированием композиции BCMA-направленных CAR Т-клеток у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к одной или нескольким линиям предшествующей терапии для лечения

ММ. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления, до начала лечения, например, перед лейкаферезом, у субъекта имеется R/R ММ. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее лечился терапией или терапевтическим агентом, направленно воздействующим на заболевание или состояние, например ММ 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 ММ, таких как ММ высокого риска. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил лечение или ранее получал терапию, которая включает агент, направленно воздействующий на CD38 (например, анти-CD38 антитело). 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 одной или нескольким линиям предшествующей системной терапии заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, субъект считается невосприимчивым к линии терапии, если, среди прочего, имеется документально подтвержденное прогрессирующее заболевание во время или в течение 60 дней после завершения приема последней дозы указанной линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта задокументировано прогрессирующее заболевание во время или в течение 60 дней после завершения приема последней дозы указанной линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта задокументировано прогрессирующее заболевание во время или в течение 12 месяцев после завершения приема последней дозы указанной линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта задокументировано прогрессирующее заболевание во время или в течение шести месяцев до введения композиции сконструированных Т-клеток, и субъект невосприимчив или не отвечает на их самую последнюю линию терапии для лечения ММ.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии

после лечения или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум линиям предшествующей терапии заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после лечения или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, трем линиям предшествующей терапии заболевания или состояния.

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, субъект не получал ASCT до лейкафереза из-за возраста или других факторов.

В некоторых вариантах осуществления, изобретения у субъекта возник рецидив после ремиссии после, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, одному циклу лечения иммуномодулирующим агентом. Примеры иммуномодулирующих агентов включают, но не ограничены ими, талидомид, леналидомид и помалидомид. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум последовательным циклам лечения иммуномодулирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, изобретения у субъекта возник рецидив после ремиссии после, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, одному полному циклу лечения иммуномодулирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий агент представляет собой иммуномодулирующее антитело. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают тремелимумаб (антитело, блокирующее CTLA-4, также известное как тицилимумаб, CP-675,206), анти-OX40, PD-L1 моноклональное антитело (анти-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (блокатор PD-1), ниволумаб (анти-PD-1 антитело), CT-011 (анти-PD-1 антитело), BY55 моноклональное антитело, AMP224 (анти-PD-L1 антитело), BMS-936559 (анти-PD-L1 антитело), MPLDL3280A (анти-PD-L1 антитело), MSB0010718C (анти-PD-L1 антитело) и ипилимумаб (анти-CTLA-4 антитело, также известное как Yervoy®, MDX-010 и MDX-101). Примеры иммуномодулирующих антител включают, но не ограничены ими, даклизумаб (Зенапакс), бевацизумаб (Avastin®), базиликсимаб, ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, MPDL3280A, пидилизумаб (CT-011), MK-3475, BMS-936559, MPDL3280A (атезолизумаб), тремелимумаб, IMP321, BMS-986016, LAG525, урелумаб, PF-05082566, TRX518, MK-4166, дацетузумаб (SGN-40), лукатумумаб (HCD122), SEA-CD40, CP-870, CP-893, MEDI6469, MEDI6383, MOXR0916, AMP-224, MSB0010718C (авелумаб), MEDI4736, PDR001, rHIgM12B7, улокуплумаб, BKT140, варлилумаб (CDX-1127), ARGX-110, MGA271,

лирилумаб (BMS-986015, IPH2101), IPH2201, ARGX-115, эмактузумаб, CC-90002 и MNRP1685A или их антителосвязывающий фрагмент. Другие типовые иммуномодуляторы включают, например, афутузумаб (доступный от Roche®); пегфилграстим (Neulasta®); леналидомид (CC-5013, Revlimid®); талидомид (Thalomid®), актимид (CC4047); и IRX-2 (смесь цитокинов человека, включая интерлейкин 1, интерлейкин 2 и гамма-интерферон, CAS 951209-71-5, доступна от IRX Therapeutics).

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, одному циклу лечения ингибитором протеасом. Примеры ингибиторов протеасом включают, но не ограничены ими, бортезомиб, карфилзомиб и иксазомиб. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум последовательным циклам лечения ингибитором протеасомы.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум последовательным циклам лечения одним иммуномодулирующим агентом и, по меньшей мере, двум последовательным циклам лечения одним ингибитором протеасом. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии, или он стал невосприимчивым к, по меньшей мере, двум последовательным циклам лечения иммуномодулирующим агентом и ингибитором протеасом в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии после, или он стал невосприимчивым к лечению анти-CD38 антителом. Примеры анти-CD38-антител включают, но не ограничены ими, даратумумаб. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-CD38 антителом представляет собой монотерапию. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-CD38 антителом является частью комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым к каждому из (1) ASCT, если он подходит для получения ASCT; (2) по меньшей мере, двух последовательных циклов лечения одним иммуномодулирующим агентом и, по меньшей мере, двух последовательных циклов лечения одним ингибитором протеасом; и (3) лечения анти-CD38 антителом. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта возник рецидив после ремиссии или он стал невосприимчивым к каждому из (1) ASCT, если он подходит для получения ASCT; (2) по меньшей мере, двух последовательных циклов лечения иммуномодулирующим агентом и ингибитором протеасом в комбинации; и (3) лечения анти-CD38 антителом.

В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к последней линии

предшествующей терапии, назначаемой перед лейкаферезом.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта до лейкафереза не было активного поражения центральной нервной системы (ЦНС) ММ. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта до лейкафереза в анамнезе не было поражения ЦНС ММ.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта до лейкафереза не было активного плазмаклеточного лейкоза; макроглобулинемии Вальденстрема; синдрома полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклонального белка, синдрома кожных изменений (POEMS); любого клинически значимого амилоидоза; или любой комбинации любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, субъект до проведения лейкафереза не имел в анамнезе плазмаклеточный лейкоз; макроглобулинемию Вальденстрема; синдром POEMS; любой клинически значимый амилоидоз; или любую комбинацию любых из вышеперечисленных. В некоторых вариантах осуществления, субъект до или после введения сконструированных клеток не имеет активный алпзмаклеточный лейкоз; макроглобулинемию Вальденстрема; синдром POEMS; любой клинически значимый амилоидоз; или любую комбинацию любых из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее не получал CAR-T-клеточную терапию до введения BCMA-направленных сконструированных CAR-T-клеток в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, перед лейкаферезом, субъект не получал терапию генетически модифицированными Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, перед лейкаферезом, субъект не получал BCMA-таргетную терапию. Примеры BCMA-таргетной терапии включают, но не ограничены ими, биспецифические антитела или молекулы, рекрутирующие Т-клетки, конъюгаты антитело-лекарственное средство (BCMA-ADC) и BCMA-направленную Т-клеточную терапию (например, Т-клетки с химерным антигенным рецептором BCMA). 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 менее чем за 14 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая доза кортикостероидов определяется как более 20 мг/день преднизолона или его эквивалента. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал анти-ММ антитело менее чем за 14 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал никакой другой одобренной системной терапии против ММ менее чем за 14 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект

не получал никакой экспериментальной терапии менее чем за 14 дней (для биологических препаратов) или за 5 периодов полувыведения (для малых молекул) до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъекту не проводили трансплантацию аутологичных стволовых клеток (SCT) менее чем за 6 месяцев до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал аллогенную SCT менее чем за 6 месяцев до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал инфузию донорских лимфоцитов менее чем за 6 недель до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал иммунодепрессивную терапию менее чем за 4 недели до лейкафереза. Примеры иммунодепрессивной терапии включают, но не ограничены ими, ингибиторы кальциневрина; метотрексат или другие химиотерапевтические агенты; микофенолат; рапамицин; и иммунодепрессивные антитела, такие как анти-TNF, анти-IL6 или анти-IL6R. В некоторых вариантах осуществления, субъект не подвергался плазмаферезу менее чем за 14 дней до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал лучевую терапию, направленно воздействующую на область, включающую большую область костного мозга (например, таз или грудину), менее чем за 6 недель до лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект не получал лучевую терапию одного поражения менее чем за 14 дней до лейкафереза.

В некоторых вариантах осуществления, право субъектов на лечение, включающее введение сконструированных клеток, определяется до проведения лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект до лейкафереза имеет адекватный сосудистый доступ для лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, субъект перед лейкаферезом 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, субъект до лейкафереза выздоровел после предшествующей терапии до уровня ниже или равного степени 1 любой не гематологической токсичности. В некоторых вариантах осуществления, субъект перед лейкаферезом выздоровел после предыдущей терапии до исходного уровня любой не гематологической токсичности.

В некоторых вариантах осуществления, субъект до проведения лейкафереза имеет адекватную функцию органов. В некоторых вариантах осуществления, на адекватную функцию органа указывает, среди прочих факторов, абсолютное количество нейтрофилов (ANC), превышающее или равное $1,0x10^9$ клеток/л, без поддержки фактором роста в течение 7 дней после определения приемлемости; ANC больше или равно $1,0x10^9$ клеток/л без поддержки фактора роста в течение 14 дней после определения приемлемости, если ранее вводился пегфилграстим; уровни гемоглобина выше или равные 8 г/дл без

трансфузий эритроцитов (RBC) в течение 21 дня после определения приемлемости; количество тромбоцитов более $50x10^9$ клеток/л без трансфузионной поддержки в течение 7 дней после определения приемлемости; расчетная скорость клиренса креатинина (CrCl сыворотки, формула Кокрофта-Голта) выше или равная 60 мл/мин без поддержки гидратации в течение 3 дней после определения приемлемости; уровень аспартатаминотрансферазы (AST) меньше или равный 3,0-кратному верхнему пределу нормы (ULN); уровень аланинаминотрансферазы (ALT) меньше или равный 3,0 ULN; уровень общего билирубина менее чем в 1,5 раза от ULN; уровень прямого билирубина менее чем в 1,5 раза от ULN при синдроме Жильбера; международный коэффициент (NIR) менее или равный 1,5 ULN; частичное тромбопластиновое время (PTT) менее или равное 1,5 ULN; адекватная легочная функция, например, одышка меньше или равная 1 степени по CTCAE и/или насыщение кислородом (SaO_2 более 92%) на комнатном воздухе; адекватная сердечная функция, например, фракция выброса левого желудочка (LVEF), более или равная 40% по данным эхокардиограммы (ЭХО) или сканирования с множественным захватом (MUGA), выполненного в течение 8 недель после определения приемлемости; или комбинация любых из вышеперечисленных. Адекватная функция органов также может быть подтверждена, помимо прочих факторов, расчетной скоростью клиренса креатинина (CrCl), более или равной 60 мл/мин, при измерении 24-часового сбора мочи, без поддержки гидратации в течение 3 дней после определения приемлемости; и/или протромбиновое время (PT) менее или равное 1,5 ULN.

В конкретных вариантах осуществления, перед введением дозы BCMA-направленных сконструированных CAR Т-клеток, субъекту вводили или он получал противолимфомную химиотерапию.

Противолимфомная терапия может улучшать приживление и активность CAR Т-клеток за счет гомеостатических цитокинов, снижения CD4+CD25+ регуляторных Т-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/м^2 до 500 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, например, от примерно 200 мг/м^2 до 400 мг/м^2 или от 250 мг/м^2 и 350 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 100 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 150 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 200 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 250 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м^2 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 200-400 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/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 30 мг/м^2 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/м^2) циклофосфамида и от 3 до 5 доз 25 мг/м^2 флударабина перед первой или последующей дозой. Некоторым субъектам вводят флударабин (30 мг/м^2/день в течение 3

дней) и циклофосфамид (300 мг/м^2/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. В некоторых вариантах осуществления, переходную терапию вводят в течение не более четырех недель. Примеры терапии, которую можно назначать в качестве переходной терапии перед LD терапией, включают, но не ограничены ими, дексаметазон, циклофосфамид, этопозид и цисплатин (DCEP); бортезомиб, дексаметазон, цисплатин, доксорубицин, циклофосфамид и этопозид (VD-PACE), циклофосфамид, винкристин, доксорубицин и дексаметазон (CVAD); импульсный дексаметазон; и одобренную схему, включающую даратумумаб. В некоторых вариантах осуществления, переходные терапии прерывают за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней, 45 дней или 60 дней до противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекты должны восстанавливаться до 2 степени или ниже от токсичности, связанной с переходной терапией, до LD терапии.

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.

A. 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 вариантах осуществления, лечение не индуцирует у субъекта иммунный ответ на терапию и/или не индуцирует такой ответ до такой степени, что препятствует эффективному лечению заболевания или состояния. В некоторых аспектах степень иммуногенности и/или реакции «трансплантат против хозяина» меньше, чем наблюдаемая при другом, но сопоставимом лечении. Например, в случае адоптивной клеточной терапии с использованием клеток, экспрессирующих CAR, включая предоставленные анти-BCMA антитела, степень иммуногенности в некоторых вариантах осуществления, снижается по сравнению с CAR, включающими другое антитело, которое связывается с аналогичным, *например*, перекрывающимся эпитопом и/или или которое конкурирует за связывание с BCMA с антителом, таким как антитело мыши, или обезьяны, или кролика, или гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают адоптивную клеточную терапию, где субъектам вводят генетически сконструированные клетки, экспрессирующие предложенные рекомбинантные рецепторы, содержащие молекулу, связывающую BCMA (*например*, CAR, содержащие анти-BCMA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент). Такое введение может стимулировать активацию клеток (*например*, активацию Т-клеток) BCMA-таргетным образом, так что клетки заболевания или нарушения становятся мишенями для разрушения.

Таким образом, предложенные способы и применения включают способы и применения для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение клеток или композиции, содержащей клетки, субъекту, в ткань или клетку, например, имеющему, подверженному риску или подозреваемому в наличии заболевания, состояния или нарушения. В некоторых вариантах осуществления, клетки, популяции и композиции вводят субъекту, страдающему конкретным заболеванием или состоянием, которое необходимо лечить, *например*, с помощью адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, клетки или композиции вводят субъекту, такому как субъект, страдающий или подверженный риску заболевания или патологического состояния. В некоторых аспектах, способы таким образом лечат, *например*, облегчают один или несколько симптомов заболевания или состояния, например, путем уменьшения опухолевой массы при раке, экспрессирующем BCMA.

Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в связи с предлагаемыми способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, *например*, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238, выданной Gruenberg et al; патенте США № 4,690,915, выданном Rosenberg; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85). See, *e.g.*, Themeli *et al.* (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara *et al.* (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila *et al.* (2013) PLoS ONE 8(4): e61338.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, *например*, адоптивная клеточная терапия, *например*, адоптивная Т-клеточная терапия, осуществляется путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают от субъекта, *например,* пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, *например*, адоптивная клеточная терапия, *например*, адоптивная Т-клеточная терапия, осуществляется путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или кто, в конечном итоге, получает клеточную терапию, *например*, первого субъекта. В таких вариантах осуществления, клетки затем вводят другому субъекту, *например,* второму субъекту того же вида. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически сходны. В некоторых вариантах осуществления, второй субъект экспрессирует тот же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, которому вводят клетки, клеточные популяции или композиции, представляет собой примата, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления, субъект, которому вводят клетки, клеточные популяции или композиции, представляет собой примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления, примат, отличный от человека, представляет собой обезьяну (*например,* яванского макака) 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 (*например*, мышь, крыса и т.д.). В некоторых примерах, пациент или субъект представляет собой одобренную модель животного для заболевания, адоптивной клеточной терапии

и/или для оценки токсических исходов, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS).

Молекулы, связывающие BCMA, такие как рекомбинантные рецепторы (*например*, CAR) и экспрессирующие их клетки, можно вводить любым подходящим способом, например, путем инъекции, *например,* внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транссептальной инъекции, субсклеральной инъекции, внутрихориоидальной инъекции, внутрикамерной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или задняя околосклеральной инъекции. 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, внутричерепное, внутригрудное или подкожное введение. Дозирование и введение могут частично зависеть от того, является ли введение кратковременным или постоянным. Различные схемы дозирования включают, но не ограничены ими, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза связывающей молекулы, рекомбинантного рецептора или клетки может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа связывающей молекулы или рекомбинантного рецептора, тяжести и течения заболевания, где связывающую молекулу или рекомбинантный рецептор вводят в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на рекомбинантный рецептор или клетку, а также на усмотрение лечащего врача. Композиции, молекулы и клетки в некоторых вариантах осуществления, подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение ряда курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение дозы сконструированных клеток или композиции, содержащей дозу сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки или композиции, содержащие сконструированные клетки, можно использовать в схеме лечения, где схема лечения включает введение дозы сконструированных клеток или композиции, содержащей дозу сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза может содержать, например, определенное количество или диапазон рекомбинантных Т-клеток, экспрессирующих рецептор, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток

периферической крови (PBMC), такое как любое количество таких клеток, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, можно вводить композицию, содержащую дозу клеток. В некоторых аспектах количество, количество или долю CAR-экспрессирующих (CAR+) клеток в клеточной популяции или клеточной композиции можно оценить путем обнаружения суррогатного маркера, например, с помощью проточной цитометрии или других средств, или путем обнаружения связывания меченой молекулы, такой как меченый антиген, которая может специфически связываться со связывающими молекулами или рецепторами, предложенными в настоящем документе.

В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, доза Т-клеток, таких как сконструированные Т-клетки, экспрессирующие BCMA-направленный CAR, 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 $0,1x10^5$ CD19-направленных CAR сконструированных клеток на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг) до точно или примерно $2x10^6$ клеток/кг, например от точно или примерно $0,1x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $0,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $0,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $1x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $1x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $1,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $1,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $2x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $2x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $2,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $2,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $3x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $3x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $3,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $3,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $4x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $4x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $4,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $4,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $5x10^5$ клеток до точно или примерно $5,5x10^5$ клеток/кг, от

точно или примерно $5,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $6x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $6x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $6,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $6,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $7x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $7x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $7,5x10^5$ клеток/кг, от точно или примерно $7,5x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $8x10^5$ клеток/кг или от точно или примерно $8x10^5$ клеток/кг до точно или примерно $10x10^5$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не больше $2x10^5$ клеток, BCMA-направленных CAR сконструированных клеток на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не больше чем точно или примерно $3x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $4x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $5x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $6x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $7x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $8x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $9x10^5$ клеток/кг, не больше чем точно или примерно $1x10^6$ клеток/кг или не больше чем точно или примерно $2x10^6$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно, или точно или примерно $0,1x10^5$ BCMA-направленных CAR сконструированных клеток на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,2x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,3x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,4x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,5x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,6x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,7x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,8x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,9x10^5$ клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,1x10^6$ клеток/кг, или, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно или точно или примерно $0,2x10^6$ 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 BCMA-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 входной 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 составляет от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR,

от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$

всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR,

от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$

всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR,

от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$

всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $8,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $2,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $2,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $1,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $1,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $1,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $1,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR или от точно или примерно $9,5x10^7$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-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,

количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются CD3+ клетками. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются CD4+ или CD8+ клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $5x10^5$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $6x10^7$ до

точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $7x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $8x10^7$ до точно или примерно $2,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-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, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются CD3+ клетками. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются CD4+ или CD8+ клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,0x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,8x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,6x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,4x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $0,2x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^5$ до точно или примерно $1,0x10^6$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-

направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $1x10^6$ до точно или примерно $0,2x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $0,2x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^7$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $0,9x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $0,7x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $0,5x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $10x10^6$ до точно или

примерно 0,3x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 10x10^6 до точно или примерно 0,2x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 10x10^6 до точно или примерно 15x10^6 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 1,0x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,9x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,8x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,7x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,6x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,5x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,4x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,3x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 15x10^6 до точно или примерно 0,2x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 1,0x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,9x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,8x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,7x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,6x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,5x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,4x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 0,3x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 20x10^6 до точно или примерно 25x10^6 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 25x10^6 до точно или примерно 1,0x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 25x10^6 до точно или примерно 0,9x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 25x10^6 до точно или примерно 0,8x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно 25x10^6 до точно или примерно 0,7x10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-

направленный CAR, от точно или примерно $25x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $25x10^6$ до точно или примерно $0,5x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $25x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $25x10^6$ до точно или примерно $0,3x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $0,9x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $0,7x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $0,5x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $35x10^6$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $0,9x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $0,7x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $0,5x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $0,4x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $1,0x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $0,9x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $0,8x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $0,7x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $0,6x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или

примерно $0,5x10^8$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR или от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $45x10^6$ всего Т-клеток, экспрессирующих BCMA-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 по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $1x10^5$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5x10^5$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $5x10^5$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $1x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $1x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, or по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-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 менее или менее примерно $1x10^5$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $2,5x10^5$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $5x10^5$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $1x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $2,5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $1x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $1,5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $2x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $2,5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $3x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $3,5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $4x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих

BCMA-направленный CAR, менее или менее примерно $4,5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-направленный CAR, or менее или менее примерно $5x10^7$ Т-клеток, экспрессирующих BCMA-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, содержащей количество клеток от или от примерно $1x10^5$ до или до примерно $1x10^8$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, от или от примерно $5x10^5$ до или до примерно $5x10^7$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток или от или от примерно $1x10^6$ до или до примерно $1x10^7$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или от примерно $1x10^5$ до или до примерно $1x10^8$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, от или от примерно $5x10^5$ до или до примерно $1x10^8$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, от или от примерно $1x10^6$ до или до примерно $50x10^6$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, от или от примерно $5x10^6$ до или до примерно $45x10^6$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток или от или от примерно $10x10^6$ до или до примерно $25x10^6$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, 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 $1x10^5$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, $1x10^6$, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $1x10^7$, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $1x10^8$ 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, например, где субъектом является человек, доза содержит более чем точно или примерно $5x10^6$ всего клеток, экспрессирующих CAR (CAR+), Т клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и менее чем точно или примерно $100x10^6$ всего клеток, экспрессирующих CAR, Т клеток или PBMC. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или примерно $5x10^6$ до точно или примерно $10x10^6$ всего Т-клеток, экспрессирующих CAR (CAR+), от точно или примерно $10x10^6$ до точно или примерно

$15x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $15x10^6$ до точно или примерно $20x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $20x10^6$ до точно или примерно $25x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $25x10^6$ до точно или примерно $30x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $30x10^6$ до точно или примерно $35x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $35x10^6$ до точно или примерно $40x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $40x10^6$ до точно или примерно $45x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $45x10^6$ до точно или примерно $50x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $50x10^6$ до точно или примерно $55x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $55x10^6$ до точно или примерно $60x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $60x10^6$ до точно или примерно $65x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $65x10^6$ до точно или примерно $70x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $70x10^6$ до точно или примерно $75x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $75x10^6$ до точно или примерно $80x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $80x10^6$ до точно или примерно $85x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $85x10^6$ до точно или примерно $90x10^6$ CAR+ Т-клеток, от точно или примерно $90x10^6$ до точно или примерно $95x10^6$ CAR+ Т-клеток или от точно или примерно $95x10^6$ до точно или примерно $100x10^6$ CAR+ Т-клеток, каждый включительно. В любом из предшествующих вариантов осуществления, CAR+ Т-клетки экспрессируют BCMA-таргетный CAR, такой как получен из BCMA-55.

В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, доза включает точно или примерно $5x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает точно или примерно $10x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, доза включает точно или примерно $20x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает точно или примерно $30x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, доза включает точно или примерно $40x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, если субъектом является человек, доза

включает точно или примерно $60x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза включает точно или примерно $80x10^6$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

В некоторых вариантах осуществления, количество относится к общему количеству клеток CD3+ или CD8+, в некоторых случаях, также CAR-экспрессирующих (например, CAR+) клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток составляет от точно или примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $2x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $2,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $3x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $3,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $4x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $4,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $5,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $6x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $6,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $7,5x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR или от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $8x10^7$ CD3+ или CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, каждый включительно.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток относится к общему количеству CD3+ клеток, экспрессирующих CAR или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR (CAR+). В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит от точно или

примерно $1x10^7$ до точно или примерно $1,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $1,5x10^7$ до точно или примерно $2x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $2x10^7$ до точно или примерно $2,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $2,5x10^7$ до точно или примерно $3x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $3x10^7$ до точно или примерно $3,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $3,5x10^7$ до точно или примерно $4x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $4x10^7$ до точно или примерно $4,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $4,5x10^7$ до точно или примерно $5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $5x10^7$ до точно или примерно $5,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $5,5x10^7$ до точно или примерно $6x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $6x10^7$ до точно или примерно $6,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, от точно или примерно $6,5x10^7$ до точно или примерно $7,5x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, ог от точно или примерно $7,5x10^7$ до точно или примерно $8x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR, каждый включительно.

В некоторых вариантах осуществления, доза содержит точно или примерно $1,0x10^7$, $2,0x10^7$, $3,0x10^7$, $4,0x10^7$, $6,0x10^7$ или $8,0x10^7$ CD3+ или CD4+/CD8+ всего Т-клеток или CD3+ клеток, экспрессирующих CAR или CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза содержит точно или примерно $1,0x10^7$, $2,0x10^7$, $3,0x10^7$, $4,0x10^7$, $6,0x10^7$ или $8,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза содержит точно или примерно $1,0x10^7$, $2,0x10^7$, $3,0x10^7$, $4,0x10^7$, $6,0x10^7$ или $8,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $0,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $1,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $1,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $2,5x10^7$

CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $2,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $3,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $3,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $4,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $4,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $5,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $5,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $6,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $6,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $7,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $7,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $8,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $8,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $9,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $9,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $10,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $10,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $11,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $11,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $12,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $12,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $13,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $13,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $14,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $14,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $15,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $15,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $16,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно $16,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $17,5x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от

точно или примерно 17,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно 18,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно 18,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно 19,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно 19,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно 20,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно 20,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно 21,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно 21,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно 22,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет от точно или примерно 22,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно 23,5x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно 1,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 2,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 3,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 4,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 5,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 6,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 7,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 8,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 9,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 10,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 11,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 12,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 13,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 14,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 15,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 16,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 17,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 18,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 19,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 20,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 21,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 22,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, точно или примерно 23,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR, or точно или примерно 24,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно 1,0x10^7 CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза

составляет точно или примерно $2,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $3,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $4,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $6,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $8,0x10^8$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $8,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $16,0x10^7$ CD3+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $1,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $2,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $3,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $4,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $6,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $8,0x10^8$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $8,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, доза составляет точно или примерно $16,0x10^7$ CD4+/CD8+ клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, например, рекомбинантных Т-клеток, экспрессирующих рецептор, вводится субъекту в виде разовой дозы или вводится только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или больше. 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, сконструированные клетки для введения или композиция сконструированных клеток для введения проявляют свойства, указывающие на здоровье клеток или совместимые с ними. В некоторых вариантах осуществления, точно или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 70, 75, 80, 85 или 90% CAR+ клеток такой дозы проявляют одно или несколько свойств или фенотипов, указывающих на здоровье клеток или биологически активные CAR клетки, такие как отсутствие экспрессии маркера апоптоза.

В конкретных вариантах осуществления, фенотип представляет собой или включает отсутствие апоптоза и/или указание на то, что клетка подвергается процессу апоптоза. Апоптоз представляет собой процесс запрограммированной гибели клетки, который включает в себя ряд стереотипных морфологических и биохимических событий, которые приводят к характерным изменениям и гибели клеток, включая вздутие, сморщивание клеток, ядерную фрагментацию, конденсацию хроматина, фрагментацию хромосомной ДНК и глобальный распад мРНК. В некоторых аспектах, на ранние стадии апоптоза может указывать активация определенных каспаз, например, 2, 8, 9 и 10. В некоторых аспектах, средние и поздние стадии апоптоза характеризуются дальнейшей потерей целостности мембраны, конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК, включая биохимические события, такие как активация каспаз 3, 6 и 7.

В конкретных вариантах осуществления, фенотип представляет собой отрицательную экспрессию одного или нескольких факторов, связанных с запрограммированной гибелью клеток, например, проапоптотических факторов, о которых известно, что они инициируют апоптоз, например, участников пути рецептора смерти, активированных членов митохондриального (внутреннего) пути, таких как члены семейства Bcl-2, например Bax, Bad и Bid, и каспазы. В некоторых вариантах осуществления, фенотип представляет собой отсутствие индикатора, например, молекулы аннексина V или окрашивания TUNEL, который преимущественно связывается с клетками, подвергающимися апоптозу, при инкубации или при контакте с клеточной композицией. В некоторых вариантах осуществления, фенотип представляет собой или включает экспрессию одного или нескольких маркеров, которые указывают на состояние апоптоза в клетке. В некоторых вариантах осуществления, фенотип представляет собой отсутствие экспрессии и/или активации каспазы, такой как каспаза 3. В некоторых аспектах, активация каспазы-3 свидетельствует об усилении или возрождении апоптоза. В некоторых вариантах осуществления, активацию каспазы можно обнаружить известными способами. В некоторых вариантах осуществления, для обнаружения активации каспазы можно использовать антитело, которое специфически связывается с активированной каспазой (т.е. специфически связывается с расщепленным полипептидом). В конкретных вариантах осуществления, фенотип представляет собой или включает активную каспазу 3. В некоторых вариантах осуществления, маркер апоптоза представляет собой реагент, который выявляет в клетке признак, связанный с апоптозом. В некоторых вариантах осуществления, реагент представляет собой молекулу аннексина V.

В некоторых вариантах осуществления, композиции, содержащие сконструированные клетки для введения, содержат определенное число или количество

клеток, которые проявляют фенотипы, указывающие на или соответствующие здоровью клеток. В некоторых вариантах осуществления, менее примерно 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% Т-клеток экспрессирующих CAR, в дозе сконструированных Т-клеток экспрессируют маркер апоптоза, необязательно, аннексин V или активную каспазу 3. В некоторых вариантах осуществления, менее 5%, 4%, 3%, 2% или 1% Т-клеток, экспрессирующих CAR, в дозе сконструированных Т-клеток экспрессируют аннексин V или активную каспазу 3.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, связывающие молекулы или рекомбинантные рецепторы вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как другое антитело или сконструированная клетка, или рецептор, или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент.

Клетки, связывающие молекулы и/или рекомбинантные рецепторы, в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно, в любом порядке. В некоторых контекстах, клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что клеточные популяции усиливают эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки, связывающие молекулы и/или рекомбинантные рецепторы, вводят перед введением одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, клетки, связывающие молекулы и/или рекомбинантные рецепторы, вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов.

B. Ответ, эффективность и выживание

В некоторых вариантах осуществления, дозу и/или частоту введения определяют на основе эффективности и/или ответа. В некоторых вариантах осуществления, эффективность определяют путем оценки статуса заболевания. Типовые способы оценки статуса заболевания включают: измерение белка М в биологических жидкостях, таких как кровь и/или моча, с помощью электрофореза и иммунофиксации; количественное определение sFLC (κ и λ) в крови; обследование скелета; и визуализацию с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ)/компьютерной томографии (КТ) у субъектов с экстрамедуллярным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, статус заболевания можно оценить с помощью исследования костного мозга. В некоторых примерах, доза и/или частота введения определяются размножением и жизнестойкостью рекомбинантного рецептора или клетки в крови и/или костном мозге. В некоторых

вариантах осуществления, дозу и/или частоту введения определяют на основе противоопухолевой активности рекомбинантного рецептора или сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления, противоопухолевую активность определяют по общей частоте ответа (ORR) и/или Единым критериям ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) (см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346). В некоторых вариантах осуществления, ответ оценивают с помощью оценки минимальной остаточной болезни (MRD). В некоторых вариантах осуществления, MRD можно оценить такими способами, как проточная цитометрия и высокопроизводительное секвенирование, например глубокое секвенирование. В некоторых аспектах, субъекты с MRD-отрицательным заболеванием включают субъектов с отсутствием аберрантных клональных плазматических клеток в аспирате костного мозга, что исключается анализом с минимальной чувствительностью 1 на 10^5 ядросодержащих клеток или выше (т.е. чувствительностью 10^{-5}), таким как проточная цитометрия (проточная цитометрия следующего поколения; NGF) или высокопроизводительное секвенирование, например, глубокое секвенирование или секвенирование следующего поколения (NGS).

В некоторых аспектах, устойчивый MRD-отрицательный включает субъектов, которые демонстрируют MRD-отрицательный результат в костном мозге (NGF или NGS, или и то, и другое) и с помощью визуализации, как определено ниже, подтвержденной как минимум с разницей в 1 год. Последующие оценки могут быть использованы для уточнения продолжительности отрицательного статуса (например, MRD-отрицательного статуса через 5 лет). В некоторых аспектах, текущий MRD-отрицательный включает субъектов, которые демонстрируют отсутствие фенотипически аберрантных клональных плазматических клеток с помощью NGF в аспирате костного мозга с использованием стандартной операционной процедуры EuroFlow для обнаружения MRD при множественной миеломе (или утвержденного эквивалентного способа) с минимальной чувствительностью 1 в 10^5 ядросодержащих клеток и выше. В некоторых аспектах секвенирование MRD-отрицательных включает субъектов, у которых обнаружено отсутствие клональных плазматических клеток с помощью NGS в аспирате костного мозга, в котором присутствие клона определяется как менее чем два идентичных прочтения секвенирования, полученных после секвенирования ДНК аспиратов костного мозга с использованием платформы LymphoSIGHT (или утвержденного эквивалентного способа) с минимальной чувствительностью 1 на 10^5 ядросодержащих клеток или выше. В некоторых аспектах, визуализация плюс MRD-отрицательный включает субъектов, у которых MRD-отрицательный результат оценивается с помощью NGF или NGS плюс исчезновение каждой области повышенного поглощения индикатора, обнаруженное на исходном уровне

или на предшествующей ПЭТ/КТ, или снижение до меньшего медиастинального пула крови SUV или уменьшение до меньше, чем в окружающих нормальных тканях (см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346).

В некоторых вариантах осуществления, ответ оценивают на основе продолжительности ответа после введения рекомбинантного рецептора или клеток. В некоторых примерах, доза и/или частота введения могут основываться на токсичности. В некоторых вариантах осуществления, дозу и/или частоту можно определить на основе связанного со здоровьем качества жизни (HRQoL) субъекта, которому вводят рекомбинантный рецептор и/или клетки. В некоторых вариантах осуществления, доза и/или частота введения могут быть изменены, т.е. увеличены или уменьшены, на основе любого из вышеуказанных критериев.

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 опухолевой массы. В некоторых вариантах осуществления, типовые параметры для определения включают конкретные клинические результаты, свидетельствующие об облегчении или улучшении опухоли. К таким параметрам относятся: продолжительность контроля заболевания, включая объективный ответ (OR), полный ответ (CR), строгий полный ответ (sCR), очень хороший частичный ответ (VGPR), частичный ответ (PR), минимальный ответ (MR), стабильное заболевание (SD), прогрессирующее заболевание (PD) или рецидив (см., *например,* Единые критерии ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG); см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346), частоту объективного ответа (ORR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и общую выживаемость (OS). В некоторых вариантах осуществления, ответ оценивают с помощью оценки минимальной остаточной болезни (MRD). Конкретные пороговые значения для параметров могут быть установлены для определения эффективности способов, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, поддающиеся измерению критерии множественной миеломы могут включать (1) содержание М-белка в сыворотке 1 г/дл или выше; (2) М-белок в моче 200 мг или больше/24 часа; (3) уровень свободных легких цепей (sFLC) в сыворотке крови 10 мг/дл или выше с аномальным отношением κ к λ. В некоторых случаях, болезнь легких цепей приемлема только для субъектов без измеримого заболевания в сыворотке или моче.

В некоторых аспектах, ответ на терапию, например, согласно предложенным вариантам осуществления, можно измерить в назначенный момент времени после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев после начала введения или находится в пределах диапазона, определенного любым из предыдущих. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48 или 52 недели месяцев после начала введения или находится в диапазоне, определяемом любым из предыдущих. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 1 месяц после начала введения. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 3 месяца после начала введения. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 6 месяцев после начала введения. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 9 месяцев после начала введения. В некоторых вариантах осуществления, указанный момент времени составляет точно или примерно 12 месяцев после начала введения.

В некоторых вариантах осуществления, ответ или исход, определенный точно или примерно через 3, 6, 9 или 12 месяцев после назначенного момента времени, равен или лучше по сравнению с ответом или исходом, определенным в начальный назначенный момент времени. Например, в некоторых аспектах, если ответ или результат, определенный в начальный назначенный момент времени, представляет собой стабильное заболевание (SD), прогрессирующее заболевание (PD) или рецидив, субъект, получающий лечение в соответствии с предложенными вариантами осуществления, может демонстрировать такой же или улучшенный ответ или исход (например, демонстрируя лучший результат ответа в соответствии с Едиными критериями ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG); см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346) в последующий момент времени, через точно или примерно 3, 6, 9 или 12 месяцев после первоначального назначенного момента времени, который равен ответу или исходу в начальный назначенный момент времени, или ответу или исходу, который является объективным ответом (OR), полным ответом (CR), строгим полным ответом (sCR), очень хорошим частичным ответом (VGPR) или частичным ответом (PR). В некоторых аспектах, субъекты, получающие лечение в соответствии с предложенными вариантами осуществления, могут демонстрировать улучшение ответа или исхода между двумя временными точками определения. В некоторых аспектах, субъект может демонстрировать PR или VGPR в начальный момент времени, назначенный для оценки, например, через 4 недели после

начала введения, и затем демонстрировать улучшенный ответ, такой как CR или sCR, в более поздний момент времени, например, через 12 недель после начала введения. 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 было предназначено предотвратить или отсрочить. Эти события могут включать возвращение рака или появление определенных симптомов, таких как боль в костях от рака, который распространился на кость, 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, устойчивый 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 или исход является устойчивым в течение более чем точно или примерно 3, 6, 9 или 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления, индикатор общего состояния по оценке Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) можно использовать для оценки или выбора субъектов для лечения, например, субъектов, у которых были плохие показатели после предшествующего лечения (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 ECOG, равное 0, указывает, что субъект может выполнять обычную деятельность. В некоторых аспектах субъекты с общим состоянием ECOG 1 демонстрируют некоторые ограничения в физической активности, но субъект полностью передвигается. В некоторых аспектах, пациенты с общим состоянием ECOG 2 более чем на

50% являются амбулаторными. В некоторых случаях, субъект с общим состоянием ECOG 2 также может быть способен к самообслуживанию; см., например, Sørensen et al., (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, которым назначено введение в соответствии со способами или схемой лечения, предложенными в настоящем документе, включают таковых с общим состоянием ECOG, равным 0 или 1.

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, при введении субъектам в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, доза или композиция способны обеспечить достижение объективного ответа (OR), по меньшей мере, у 50%, по меньшей мере, у 60%, по меньшей мере, у 70%, по меньшей мере, у 80%, по меньшей мере, у 90% или, по меньшей мере, у 95% субъектов, которым осуществляли введение. В некоторых вариантах осуществления, OR включает субъектов, достигших строгого полного ответа (sCR), полного ответа (CR), очень хорошего частичного ответа (VGPR), частичного ответа (PR) и минимального ответа (MR). В некоторых вариантах осуществления, при введении субъектам в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, доза или композиция способны обеспечить строгий полный ответ (sCR), полный ответ (CR), очень хороший частичный ответ (VGPR) или частичный ответ (PR), по меньшей мере, у 50%, 60%, 70%, 80% или 85% субъектов, которым осуществляли введение. В некоторых вариантах осуществления, при введении субъектам в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, доза или композиция способны обеспечить строгий полный ответ (sCR) или полный ответ (CR), по меньшей мере, у 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или 70% субъектов, которым осуществляли введение. В некоторых аспектах, конкретный ответ на лечение, например, в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, можно оценить на основе Единых критериев ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) (см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8) :e328-346).

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 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; и/или субъект демонстрирует 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.

C. 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 $50x10^6$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, например, точно или примерно $100x10^6$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, $160x10^6$ CAR-экспрессирующих Т-клеток или $200x10^6$ 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 терапиями. 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 (AE), дозолимитирующую 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, NK-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 (≥38,5°C или ≥101,3°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 6-20 дней 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 Т-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-1β, 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 (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNFα)), 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-a, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный воспалительный белок (MIP)-1, фактор некроза опухоли альфа (TNFα), IL-6, и IL-10, IL-1β, 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-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Rα, 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 (IFNγ, 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 2** ниже.

Таблица 2: Типовые критерии классификации для CRS

Оценка	**Описание симптомов**
1	Не опасен для жизни, требует только симптоматического

Незначительный	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 CTCAE v4.0)
3 Тяжелый	Требует и отвечает на агрессивное вмешательство: ● Потребность в кислороде ≥40% или ● Гипотензия, требующая высокой дозы одного вазопрессора (например, норэпинефрина ≥20 мкг/кг/мин, дофамина ≥10 мкг/кг/мин, фенилэфрина ≥200 мкг/кг/мин или адреналина ≥10 мкг/кг/мин), или ● Гипотензия, требующая применения нескольких вазопрессоров (например, вазопрессина + одного из вышеперечисленных препаратов или комбинации вазопрессоров, эквивалентной ≥20 мкг/кг/мин норэпинефрина), или ● Органотоксичность 3 степени или трансаминит 4 степени (по CTCAE v4.0)
4 Опасен для жизни	Опасен для жизни: ● Требует дыхательной поддержки аппаратом ИВЛ, или ● Органотоксичность 4 степени (исключая трансаминит)
5 Фатальный	Смерть

В некоторых вариантах осуществления, критерии, отражающие степень CRS, включают такие, которые подробно описаны в **таблице 3** ниже.

Таблица 3. 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 ≥38,5°C/101,3°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 SaO_2 >90%	Н/Д	FiO_2 <40%	FiO_2 ≥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 4** ниже.

Таблица 4. 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 норэпинефрина = [норэпинефрин (мкг/мин)] + [дофамин (мкг/кг/мин) ÷ 2] +	

[эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин) ÷ 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 (a) 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 (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5 и/или (b) 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 (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5; и (c) по меньшей мере, один клинический признак токсичности, такой как гипотензия (требующая 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 2** и **Таблице 3.**

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-1β), 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-2Rα или фактор некроза опухоли альфа (TNFα). 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 (IFNγ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNFα)), 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 аспартатаминотрансферазы, 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 (Aβ), 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 5.**

Таблица 5: 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 2** и **Таблице 3.** 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 (Aβ), 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 II.

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 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 II ниже. 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 направленно воздействующая на 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 направленно воздействующих на 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, клеточная терапия (*например,* Т-клеточная терапия), описанная в настоящем документе, включает введение сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, CAR), сконструированные для распознавания и/или специфического связывания с антигенами, ассоциированными с заболеванием или состоянием, такими как r/r MM.

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 лиганд-связывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность к желаемому антигену (например, опухолевому антигену), с внутриклеточными сигнальными доменами.

Среди представленных вариантов осуществления, представлены композиции, готовые изделия, соединения, способы и применения, в том числе направленно воздействующие или направленные на BCMA и клетки и заболевания, экспрессирующие BCMA. Наблюдается, что BCMA экспрессируется, например, гетерогенно экспрессируется при определенных заболеваниях и состояниях, таких как злокачественные новообразования или их ткани или клетки, например, на злокачественных плазматических клетках, например, у всех пациентов с рецидивирующей или недавно диагностированной миеломой, например, с небольшой экспрессией на нормальных тканях. Среди представленных вариантов осуществления, представлены подходы, полезные для лечения таких заболеваний и состояний и/или для таргетирования таких типов клеток, включая молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют BCMA-связывающие рецепторы, включая химерные антигенные рецепторы (CAR), и кодированные рецепторы, такие как

кодированные CAR, а также композиции и готовые изделия, содержащие их. Рецепторы, как правило, могут содержать антигенсвязывающие домены, которые включают антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как вариабельные области тяжелой цепи (V_H), однодоменные фрагменты антител и одноцепочечные фрагменты, включая scFv), специфичные для BCMA. Также предложены клетки, такие как сконструированные или рекомбинантные клетки, экспрессирующие такие BCMA-связывающие рецепторы, *например,* анти-BCMA CAR и/или содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие такие рецепторы, а также композиции и изделия и терапевтические дозы, содержащие такие клетки. Также предложены способы оценки, оптимизации, создания и использования последовательности(ей) нуклеиновой кислоты, например, последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные рецепторы, связывающие BCMA. Также предложены способы получения и использования (например, для лечения или улучшения состояния при заболеваниях и состояниях, экспрессирующих BCMA) клеток (*например,* сконструированных клеток), экспрессирующих или содержащих рекомбинантные BCMA-связывающие рецепторы и полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный BCMA-связывающий рецептор, или композиции, содержащие такие клетки.

Адоптивные клеточные терапии (включая те, которые включают 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 адоптивные Т-клеточные терапии) могут быть эффективны при лечении рака и других заболеваний и нарушений. В определенных контекстах, доступные подходы к адоптивной клеточной терапии не всегда могут быть полностью удовлетворительными. В некоторых аспектах, способность введенных клеток распознавать и связываться с мишенью, *например,* антигеном-мишенью, таким как BCMA, перемещать, локализовать и успешно проникать в соответствующие участки внутри субъекта, опухоли и их окружения, чтобы активироваться, размножаться, проявлять различные эффекторные функции, включая цитотоксическое уничтожение и секрецию различных факторов, таких как цитокины, сохраняться, в том числе долговременно, дифференцировать, переходить или участвовать в перепрограммировании в определенные фенотипические состояния для обеспечения эффективных и устойчивых ответных реакций после клиренса и повторного воздействия лиганда-мишени или антигена, и профилактики или уменьшение истощения, анергии, терминальной дифференциации и/или дифференциации в депрессивное состояние.

В некоторых аспектах, доступные подходы к лечению заболеваний или нарушений, таких как множественная миелома, являются сложными и не всегда могут быть полностью удовлетворительными. В некоторых аспектах, выбор схемы лечения может зависеть от множества факторов, включая доступность лекарственного средства, ответ на предыдущую терапию, агрессивность рецидива, пригодность для аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT), а также от того, произошел ли рецидив во время терапии или без нее. В некоторых аспектах, ММ приводит к рецидивам и ремиссиям, и существующая схема в некоторых случаях может привести к рецидиву и/или токсичности лечения. В некоторых случаях, субъекты с особенно агрессивным заболеванием, такие как субъекты с трудноизлечимым или рецидивирующим заболеванием после различных видов лечения, субъекты с тяжелым бременем заболевания, например, с большой опухолевой массой, и/или субъекты с особенно агрессивными типами заболевания, такими как плазмоцитома, могут особенно трудно поддаваться лечению, и ответы на определенные виды терапии у этих субъектов могут быть плохими или иметь короткую продолжительность. В некоторых случаях, субъекты, которые подвергались интенсивному предварительному лечению, например, субъекты, у которых возник рецидив после нескольких различных предшествующих терапий, могут демонстрировать низкую скорость ответа и/или высокую частоту нежелательных явлений. В некоторых аспектах, предложенные варианты осуществления основаны на наблюдении, что лечение в соответствии с предложенными вариантами осуществления приводит к высокой частоте ответа, низкой частоте нежелательных явлений (например, токсичности), длительному ответу и, в некоторых случаях, улучшению ответа с течением времени.

Предложенные варианты осуществления, в некоторых контекстах, основаны на наблюдении из клинического исследования, что введение сконструированных клеток, экспрессирующих конкретный рекомбинантный рецептор, таких как клетки, описанные в настоящем документе, приводит к высокой частоте ответов и низкой частоте нежелательных явлений, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS) или неврологические события (NE; или нейротоксичность; NT). В некоторых аспектах, предложенные клетки, способы и применения приводят к клеточной терапии, которая демонстрирует длительную жизнестойкость клеток после введения клеток, наряду с высокой скоростью ответа и низкой степенью токсичности (например, CRS или NE, таких как CRS 3 степени или выше или нейротоксичность 3 степени или выше). В некоторых аспектах, такой высокий ответ и низкий уровень токсичности (например, CRS 3 степени или выше или нейротоксичность 3 степени или выше) достигаются за счет использования различных доз клеток. Например, даже при относительно низкой дозе клеток, достигается

высокая частота объективного ответа и высокий уровень ответа (например, очень хороший частичный ответ, VGPR, или лучше). В некоторых случаях, можно вводить относительно высокую дозу клеток, и наблюдается, что такие дозы приводят к высокой частоте объективного ответа с низкой степенью токсичности (например, CRS 3 степени или выше или нейротоксичностью 3 степени или выше). В некоторых случаях, предложенные варианты осуществления также обеспечивают улучшенное размножение и/или жизнестойкость введенных сконструированных клеток, и в некоторых случаях, приводят к пролонгированному ответу и/или ответу, который улучшается с течением времени. В некоторых аспектах, было обнаружено, что лечение субъектов с агрессивным или не поддающимся лечению заболеванием (например, субъектов, предварительно подвергавшихся интенсивному лечению, субъектов с высокой опухолевой массой и/или субъектов с агрессивными типами заболевания) в соответствии с предложенными вариантами осуществления обеспечивает безопасное, эффективное и длительное лечение.

В некоторых случаях, оптимальный ответ на терапию может зависеть от способности сконструированных рекомбинантных рецепторов, таких как CAR, стабильно и надежно экспрессироваться на поверхности клеток и/или связывать антиген-мишень. Например, в некоторых случаях, гетерогенность транскрибируемой РНК из введенного трансгена (например, кодирующего рекомбинантный рецептор) может влиять на экспрессию и/или активность рекомбинантного рецептора, в некоторых случаях, при экспрессии в клетке, такой как Т-клетка человека, используемая в клеточной терапии. В некоторых контекстах, длина и тип спейсера в рекомбинантном рецепторе, таком как CAR, могут влиять на экспрессию, активность и/или функцию рецептора.

Кроме того, в некоторых контекстах, определенные рекомбинантные рецепторы могут демонстрировать антиген-независимую активность или передачу сигналов (также известную как «тоническая передача сигналов»), что может приводить к нежелательным эффектам, например, из-за повышенной дифференциации и/или истощения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, такая активность может ограничивать активность, действие или эффективность Т-клеток. В некоторых случаях, во время конструирования и размножения клеток ex vivo для экспрессии рекомбинантного рецептора, клетки могут демонстрировать фенотипы, указывающие на истощение, из-за тонической передачи сигналов через рекомбинантный рецептор.

В некоторых контекстах, свойства конкретных антигенов-мишеней, которые рекомбинантные рецепторы специфически связывают, распознают или направленно воздействуют, могут влиять на активность рецептора. В некоторых контекстах, антиген

созревания В-клеток (BCMA) обычно экспрессируется на злокачественных плазматических клетках и является привлекательной терапевтической мишенью для клеточной терапии. В некоторых случаях, BCMA может расщепляться гамма-секретазой с образованием растворимого BCMA (sBCMA) или «шеддинговой» формы BCMA, уменьшая экспрессию BCMA на поверхности клеток-мишеней. В некоторых случаях, активность BCMA-связывающих молекул, таких как анти-BCMA химерные антигенные рецепторы, может быть заблокирована или ингибирована присутствием растворимого BCMA. Необходимы улучшенные стратегии для оптимальных ответов на клеточные терапии, в частности, для рекомбинантных рецепторов, которые специфически связываются, распознают или направленно воздействуют на BCMA, такие как BCMA, экспрессируемые на поверхности клеток-мишеней.

Предложенные варианты осуществления, в некоторых контекстах, основаны на наблюдении, что определенные спейсеры и оптимизация последовательностей нуклеиновых кислот могут привести к последовательной и надежной экспрессии рекомбинантного рецептора. Предлагаемые BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы обладают преимуществами по сравнению с доступными подходами к клеточным терапиям, в частности, BCMA-таргетной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, предложенные BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы содержат полностью человеческие антигенсвязывающие домены с низкой аффинностью к связыванию растворимого BCMA. В некоторых вариантах осуществления, предложенные BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы содержат модифицированный спейсер, который приводит к усиленному связыванию с BCMA, экспрессируемым на поверхности клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления, предложенные BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы демонстрируют пониженную антиген-независимую тоническую передачу сигналов, что, в некоторых случаях, может приводить к уменьшению истощения клеток от антиген-независимой передачи сигналов и отсутствию ингибирования растворимым BCMA. В некоторых вариантах осуществления, предложенные BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы демонстрируют активность или эффективность в отношении клеток-мишеней, которые экспрессируют BCMA с низкой плотностью или низким уровнем.

В различных аспектах, предложенные BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, полинуклеотиды, кодирующие такие рецепторы, сконструированные клетки и клеточные композиции, обладают определенными желаемыми свойствами, которые могут преодолевать или противодействовать определенным ограничениям, которые могут снижать оптимальные ответы на клеточную терапию, например, клеточную терапию с

помощью сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах, было обнаружено, что композиции, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие иллюстративный BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, предложенный в настоящем документе, демонстрируют постоянство здоровья клеток сконструированных клеток и связаны с улучшенным клиническим ответом. В некоторых аспектах, было обнаружено, что композиции, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие иллюстративный BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, предложенный в настоящем документе, обогащены подтипами иммунных клеток, например подтипами CD4+ или CD8+ Т-клеток, которые ассоциированы с фенотипом Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), который, в некоторых аспектах, связан с повышенной жизнестойкостью и долговечностью сконструированных клеток. В некоторых контекстах, предложенные варианты осуществления, включая рекомбинантные рецепторы, полинуклеотиды, кодирующие такие рецепторы, сконструированные клетки и клеточные композиции, могут обеспечивать различные преимущества по сравнению с доступными терапиями, направленно воздействующими на BCMA, для улучшения активности рекомбинантных рецепторов и ответа на BCMA-таргетные клеточные терапии. Кроме того, было замечено, что предложенные способы и применения сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, обеспечивают преимущество при лечении субъектов, что приводит к высокой частоте ответа, длительному ответу и низкой частоте побочных эффектов при тестировании различных уровней доз. Кроме того, было замечено, что предложенные способы и применения сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, обеспечивают преимущество при лечении субъектов с особенно агрессивным и/или не поддающимся лечению заболеванием, или субъектов, которые рецидивируют и/или невосприимчивы к многочисленным различным предшествующим терапиям заболевания.

A. Химерные антигенные рецепторы

В некоторых аспектах предложены BCMA-связывающие агенты, такие как белки клеточной поверхности, такие как рекомбинантные рецепторы или химерные антигенные рецепторы, которые связывают или распознают молекулы BCMA, и полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие белки клеточной поверхности, такие как рекомбинантные рецепторы (например, химерные антигенные рецепторы; CAR) и клетки, экспрессирующие такие рецепторы. BCMA-связывающие белки клеточной поверхности обычно содержат антитела (*например,* антигенсвязывающие фрагменты антител) и/или другие связывающие пептиды, которые специфически распознают, например,

специфически связываются с BCMA, такими как белки BCMA, такими как белок BCMA человека. В некоторых аспектах, агенты связываются с внеклеточной частью BCMA. Также предложены клетки, например, сконструированные клетки, содержащие такие полинуклеотиды или экспрессирующие такие рецепторы, и композиции, содержащие такие сконструированные клетки. В некоторых аспектах, также предложены способы с использованием таких клеток и композиций и их применение, например, в терапевтических способах.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды оптимизированы или имеют определенные характеристики, предназначенные для оптимизации, такие как для использования кодонов, для уменьшения гетерогенности РНК и/или для модификации, например, увеличения или придания большей согласованности между партиями клеточных продуктов, экспрессии, такой как поверхностная экспрессия, кодированного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие белки клеточной поверхности, модифицированы по сравнению с эталонным полинуклеотидом, например, для удаления криптических или скрытых сайтов сплайсинга, чтобы уменьшить гетерогенность РНК. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие белки клеточной поверхности, оптимизированы по кодонам, например, для экспрессии в клетке млекопитающего, например человека, такой как Т-клетка человека. В некоторых аспектах, модифицированные полинуклеотиды приводят к улучшенному, например, повышенному или более однородному или более постоянному уровню экспрессии, например поверхностной экспрессии, при экспрессии в клетке. Такие полинуклеотиды можно использовать в конструкциях для создания сконструированных клеток, которые экспрессируют кодируемый BCMA-связывающий белок клеточной поверхности. Таким образом, также предложены клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы, кодируемые полинуклеотидами, представленными в настоящем документе, и их применение в адоптивной клеточной терапии, такой как лечение заболеваний и нарушений, связанных с экспрессией BCMA, таких как множественная миелома.

Представленные полинуклеотиды включают такие, которые кодируют рекомбинантные рецепторы, такие как антигенные рецепторы, которые специфически распознают, например, специфически связывают BCMA, такой как BCMA человека. В некоторых аспектах, также предложены кодированные рецепторы, такие как рецепторы, содержащие BCMA-связывающие полипептиды, и композиции и готовые и их применения.

BCMA-связывающие полипептиды включают антитела, такие как одноцепочечные антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты антител) или их части. В некоторых

примерах, рекомбинантные рецепторы представляют собой химерные антигенные рецепторы, такие как рецепторы, содержащие анти-BCMA антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В любом из вариантов осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент в предложенных CAR, которые специфически распознают антиген, например BCMA, специфически связываются с антигеном. Предложенные полинуклеотиды могут быть включены в конструкции, такие как конструкции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или РНК, такие как конструкции, которые можно вводить в клетки для экспрессии кодированных рекомбинантных BCMA-связывающих рецепторов.

В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий BCMA-связывающий рецептор, содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид, в некоторых случаях, кодированную выше последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих BCMA-связывающий рецептор, или присоединенную к 5' концу последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающий домен. В некоторых случаях, полинуклеотид, содержащий последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие BCMA-связывающий рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), 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. В некоторых случаях, полинуклеотид, кодирующий BCMA-связывающий рецептор, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую дополнительные молекулы, такие как суррогатный маркер или другие маркеры, или может содержать дополнительные компоненты, такие как промоторы, регуляторные элементы и/или мультицистронные элементы. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая BCMA-связывающий рецептор, может быть функционально связана с любым из дополнительных компонентов.

Предложенные BCMA-связывающие рецепторы, например, экспрессированные в клетках, используемых в способах и применениях, предложенных в настоящем документе, обычно содержат внеклеточную связывающую молекулу и внутриклеточный сигнальный домен. Предложенные связывающие молекулы включают полипептиды, содержащие антитела, включая одноцепочечные белки клеточной поверхности, *например,* рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы, содержащие такие антитела.

Предложенные связывающие молекулы (*например,* BCMA-связывающие молекулы)

включают одноцепочечные белки клеточной поверхности, такие как рекомбинантные рецепторы (*например,* антигенные рецепторы), которые включают одно из предложенных антител или их фрагмент (*например,* BCMA-связывающий фрагмент). Рекомбинантные рецепторы включают антигенные рецепторы, которые специфически связываются или специфически распознают BCMA, такие как антигенные рецепторы, содержащие предложенные анти-BCMA антитела, *например,* антигенсвязывающие фрагменты. Антигенные рецепторы включают функциональные не-TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). Также предложены клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы, и их применение в адоптивной клеточной терапии, такой как лечение заболеваний и нарушений, ассоциированных с экспрессией BCMA.

Примеры антигенных рецепторов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких антигенных рецепторов в клетки включают описанные, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013166321, WO2013071154, WO2013123061, публикациях 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 европейской патентной заявке № EP2537416, и/или те, которые описаны 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 те, которые описаны в публикации международной патентной заявки № WO2014055668. Типовые CAR включают CAR, описанные а любой из вышеуказанных публикаций, таких как WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, US 7,446,190 и US 8,389,282, и в которых антигенсвязывающая часть, *например,* scFv, заменена антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как предложено в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, предложенный CAR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:15-20, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO:15-20. В некоторых вариантах осуществления, предложенный CAR имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:19.

В некоторых вариантах осуществления, предложенный CAR кодирован полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO:9-14, или последовательностями, которые имеют, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO:9-14. В некоторых вариантах осуществления, предложенный CAR кодирован полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO:13 и 14, или последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO:13 и 14. В некоторых вариантах осуществления, предложенный CAR кодирован полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:13, или последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления, предложенный CAR кодирован полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:13.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий домен, содержит (a) нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:30, 31, 50, 51, 59, 60, 82, 84, 113, 115; (b) нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% идентична любой из SEQ ID NO:30, 31, 50, 51, 59, 60, 82, 84, 113, 115; или (c) вырожденную последовательность (a) или (b). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий домен, содержит (a) нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:29, 49, 58, 83, 114, 127, 128, 129., 130; (b) нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности нуклеотидов, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO:29, 49, 58, 83, 114, 126, 127, 128, 129, 130; или (c) вырожденную последовательность (a) или (b).

1. Антигенсвязывающий домен

К числу химерных рецепторов относятся химерные антигенные рецепторы (CAR).

Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, который включает, представляет собой или содержится внутри или содержит одно из предлагаемых анти-BCMA антител. Таким образом, химерные рецепторы, *например,* CAR, обычно включают в своих внеклеточных частях одну или несколько BCMA-связывающих молекул, таких как один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или одну или несколько вариабельных областей антител, и/или молекул антитела, таких как описаны в настоящем документе.

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), вариабельные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), и фрагменты однодоменных антител (*например,* sdAb, sdFv, нанотело). 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 или триспецифические 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, также называемые в настоящем документе «антигенсвязывающие фрагменты». Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

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

полноразмерной вариабельной 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, «30a», 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 6** 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 6. 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 вариабельная 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 вариабельной 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 вариабельная 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 «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные 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).

Антитела, включенные в предложенные CAR, включают фрагменты антител. «Фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» 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, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; вариабельные участки тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные антитела, содержащие только V_H область; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен в предложенных CAR представляет собой или содержит фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой фрагменты одноцепочечных антител, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L), такие как scFv.

Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, содержащие всю или часть вариабельной области тяжелой цепи или всю или часть вариабельной области легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека.

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.

Анти-BCMA антитела, включенные в предложенные CAR, включают антитела человека. «Антитело человека» представляет собой антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности, продуцируемой человеком или клеткой человека, или источником нечеловеческого происхождения, в котором используются репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитела человека, включая библиотеки антител человека. Термин исключает гуманизированные формы антител нечеловеческого происхождения, содержащих антигенсвязывающие области нечеловеческого происхождения, такие как те, в которых все или практически все CDR имеют нечеловеческое происхождение. Термин включает антигенсвязывающие фрагменты антител человека.

Антитела человека могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для получения интактных антител человека или интактных антител с вариабельными областями человека в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов, или которые присутствуют внехромосомно или случайным образом интегрированы в хромосомы

животного. У таких трансгенных животных локусы эндогенного иммуноглобулина обычно инактивированы. Антитела человека также могут быть получены из библиотек антител человека, включая библиотеки фагового дисплея и бесклеточные библиотеки, содержащие кодирующие антитела последовательности, происходящие из репертуара человека.

Антитела, включенные в предложенные CAR, включают антитела, которые представляют собой моноклональные антитела, включая фрагменты моноклональных антител. Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, полученному из или внутри популяции по существу гомогенных антител, *m. e.* отдельные антитела, входящие в популяцию, идентичны, за исключением возможных вариантов, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающие во время продуцирования препарата моноклонального антитела, такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных эпитопов, каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одного эпитопа на антигене. Термин не следует толковать как требующий продуцирования антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональное антитело может быть получено различными методами, включая, но не ограничиваясь ими, получение из гибридомы, методы рекомбинантной ДНК, фаговый дисплей и другие способы дисплея антител.

В некоторых вариантах осуществления, CAR включает BCMA-связывающую часть или части молекулы антитела, такую как вариабельная область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельная область легкой цепи (V_L) антитела, *например,* фрагмент антитела scFv. В некоторых вариантах осуществления, предложенные BCMA-связывающие CAR содержат антитело, такое как анти-BCMA антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, который придает BCMA-связывающие свойства предложенному CAR. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий домен могут представлять собой любое описанное анти-BCMA антитело или производное от любого описанного анти-BCMA антитела. См., *например,* Carpenter *et al., Clin Cancer Res.*, 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016090320, WO2016090327, WO2010104949 и WO2017173256. Любое из таких анти-BCMA антител или их антигенсвязывающих фрагментов можно использовать в предлагаемых CAR. В некоторых вариантах осуществления, анти-BCMA CAR содержит антигенсвязывающий домен, который представляет собой scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L), полученную из антитела, описанного в WO 2016090320 или WO 2016090327.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, *например,* анти-BCMA антитело

или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи (V_H или V_L), как описано, или ее достаточную антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления, анти-BCMA антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность V_H области или ее достаточную антигенсвязывающую часть, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, как описано. В некоторых вариантах осуществления, анти-BCMA антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность V_L области или ее достаточную антигенсвязывающую часть, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, как описано. В некоторых вариантах осуществления, анти-BCMA антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность V_H области, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, как описано, и содержит последовательность V_L области, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, как описано. Также антитела включают такие, которые имеют последовательности, по меньшей мере, точно или примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99% идентичные такой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой однодоменное антитело (sdAb), содержащее только последовательность V_H области или ее достаточную антигенсвязывающую часть, такую как любая из описанных выше V_H последовательностей (*например,* CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 и/или CDR-H4).

В некоторых вариантах осуществления, предложенное в настоящем документе антитело (*например,* анти-BCMA антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий V_H область, дополнительно содержит легкую цепь или ее достаточную антигенсвязывающую часть. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H область и V_L область или достаточную антигенсвязывающую часть V_H и V_L области. В таких вариантах осуществления, последовательность V_H области может представлять собой любую из описанных выше V_H последовательностей. В некоторых таких вариантах осуществления, антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab или scFv. В некоторых таких вариантах осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое также содержит константную область.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, *например,* его антигенсвязывающий фрагмент, в предложенном CAR имеет вариабельную область тяжелой цепи (V_H), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:32, 52, 61, 85, 116, 125, 131 или аминокислотную последовательность,

имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с V_H областью аминокислоты, выбранной из любой из SEQ ID NO:32, 52, 61, 85, 116, 125, 131, или содержащую CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, присутствующие в такой V_H последовательности. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела в предложенном CAR имеет V_H область любого из антител или антитело-связывающих фрагментов, описанных в WO 2016/090327, WO 2016/090320, WO 2017/173256 или WO 2019/. 090003.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, *например,* его антигенсвязывающий фрагмент, в предложенном CAR имеет вариабельную область легкой цепи (V_L), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO:33, 53, 62, 88, 119, 127, 132 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с V_L областью аминокислоты, выбранной из любой из SEQ ID NO:33, 53, 62, 88, 119, 127, 132, или содержащую CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, присутствующие в такой V_L последовательности. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела в предложенном CAR имеет V_L область любого из антител или антитело-связывающих фрагментов, описанных в WO 2016/090327, WO 2016/090320, WO 2017/173256 или WO 2019/090003.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела в предложенном CAR имеет V_H область и V_L область любого из антител или антитело-связывающих фрагментов, описанных в WO 2016/090327, WO 2016/090320, WO 2017/173256 или WO 2019/090003. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела в предложенном CAR представляет собой scFv любого из антител или антитело-связывающих фрагментов, описанных в WO 2016/090327, WO 2016/090320, WO 2017/173256 или WO 2019/090003.

В некоторых вариантах осуществления, BCMA-направленный CAR представляет собой анти-BCMA CAR, как описано в любой из WO 2016/090320, WO 2017/173256 или WO 2019/090003.

В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела, *например,* его антигенсвязывающий фрагмент, в предложенном CAR содержат: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:32 и 33, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53, соответственно или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:52 и 53, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61

и 62, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:61 и 62, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:85 и 88, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:125 и 127, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:131 и 132, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в предложенном CAR содержат: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:32 и 33, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:52 и 53, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и 62, соответственно или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:61 и 62, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 85 и 88, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 125 и 127, соответственно. В некоторых

вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 131 и 132, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, в предложенном CAR антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H и V_L область, и V_H область содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), содержащиеся в аминокислотной последовательности V_H области, выбранной из любой из SEQ ID NO:32, 52, 61, 85, 116, 125, 131; и V_L область содержит определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR-L1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR-L3), содержащиеся в аминокислотной последовательности V_L области, выбранной из любой из SEQ ID NO:33, 53, 62, 88, 119, 127, 132.

В некоторых вариантах осуществления, в представленном CAR, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H и V_L область, и V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:53; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:62; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:85, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:88; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:116, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:119; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:125, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3,

содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:131, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.

В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в предложенном CAR содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и 62, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленные в настоящем документе, содержат аминокислотные последовательности, выбранные из: SEQ ID NO:116 и 119, или любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые имеют, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с любой из указанных выше V_H и V_L, например, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательность с ними, или любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в области V_H, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в области V_L любой из указанных выше V_H и V_L.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, такой как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или диатело или однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой однодоменное антитело, содержащее только V_H область. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент

представляет собой scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L). В некоторых вариантах осуществления, фрагмент одноцепочечного антитела (*например,* scFv) включает один или несколько линкеров, соединяющих два домена или области антитела, такие как вариабельная область тяжелой цепи (V_H) и вариабельная область легкой цепи (V_L). Линкер обычно представляет собой пептидный линкер, *например* гибкий и/или растворимый пептидный линкер. Линкеры включают линкеры, богатые глицином и серином и/или в некоторых случаях треонином. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно включают заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамат, которые могут улучшать растворимость. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно включают один или несколько пролинов.

Соответственно, предлагаемые анти-BCMA антитела включают фрагменты одноцепочечных антител, такие как scFv и диатела, в частности, фрагменты одноцепочечных антител человека, обычно содержащие линкер(ы), соединяющие два домена или области антитела, такие как V_H и V_L области. Линкер обычно представляет собой пептидный линкер, *например* гибкий и/или растворимый пептидный линкер, такой как линкер, богатый глицином и серином.

В некоторых аспектах линкеры, богатые глицином и серином (и/или треонином), включают, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% таких аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, они включают, по меньшей мере, точно или примерно 50%, 55%, 60%, 70% или 75% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления, линкер по существу полностью состоит из глицина, серина и/или треонина. Линкеры обычно имеют длину от примерно 5 до примерно 50 аминокислот, обычно, от примерно 10 до примерно 30, *например,* 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и в некоторых примерах, от 10 до 25 аминокислот в длину. Примеры линкеров включают линкеры, имеющие различное количество повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO:7) или GGGS (3GS; SEQ ID NO:2), например, от 2, 3, 4 до 5 повторов такой последовательности. Примеры линкеров включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, представленной в SEQ ID NO:1 (GGGGSGGGGSGGGGS). Примеры линкеров дополнительно включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, представленной в SEQ ID NO:176 (GTSGSGKPGSGEGSTKG). Примеры линкеров дополнительно включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, представленной в SEQ ID NO:255 (SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, предложенные варианты

осуществления включают фрагменты одноцепочечных антител, *например,* scFv, содержащие один или несколько из вышеупомянутых линкеров, таких как линкеры с высоким содержанием глицина/серина, включая линкеры, содержащие повторы GGGS (SEQ ID NO:2) или GGGGS (SEQ ID NO:7), такой как линкер, представленный в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет аминокислотную последовательность, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:1. Фрагмент, *например,* scFv, может включать V_H область или ее часть, за которой следует линкер, за которой следует V_L область или ее часть. Фрагмент, *например,* scFv, может включать V_L область или ее часть, за которой следует линкер, за которой следует V_H область или ее часть.

В **таблице 7** представлены SEQ ID NO типовых антигенсвязывающих доменов, таких как антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые могут быть включены в предложенные BCMA-связывающие рецепторы, такие как анти-BCMA химерные антигенные рецепторы (CAR). В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащий V_H область, которая содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и V_L область, которая содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже (по нумерации Kabat). В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащие последовательность V_H области и последовательность V_L области, представленные в SEQ ID NO:, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже, или антитело, содержащее аминокислотную последовательность V_H и V_L области, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью V_H области и последовательностью V_L области, представленными в SEQ ID NO, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже. В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащие последовательность V_H области и последовательность V_L области, представленные в SEQ ID NO, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже. В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащие последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже, или антитело, содержащее аминокислотную последовательность scFv, которая имеет, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность

последовательности с последовательностью scFv, представленной в SEQ ID NO, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже. В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащее последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO:114, или антитело, содержащее аминокислотную последовательность scFv, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91% 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с ней. В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащие последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO, перечисленных в каждой строке **таблицы 7** ниже. В некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающий рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, содержащие последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO:114.

Таблица 7. Идентификатор последовательности (SEQ ID NO) для типовых антигенсвязывающих доменов

Антигенсвязывающий домен	**CDR-H1**	**CDR-H2**	**CDR-H3**	**CDR-L1**	**CDR-L2**	**CDR-L3**	**V_H**	**V_L**	**scFv**
BCMA-23	34	35	36	22	23	24	32	33	29
BCMA-25	37	38	39	40	41	42	52	53	49
BCMA-26	34	35	54	55	56	57	61	62	58
BCMA-52	66	70	72	74	76	77	85	88	83
BCMA-55	97	101	103	105	107	108	116	119	114
BCMA-C1, V_H-V_L							125	127	126
BCMA-C1, V_H-V_L							125	127	128
BCMA-C2, V_H-V_L							131	132	129
BCMA-C2, V_H-V_L							131	132	130

Среди антител, *например,* антигенсвязывающих фрагментов, в предлагаемых CAR есть антитела человека. В некоторых вариантах осуществления предложенного анти-BCMA антитела человека, *например,* антигенсвязывающих фрагментов, антитело человека

содержит V_H область, которая включает часть, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой V сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии, часть, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой D сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии, и/или часть, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой J сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии; и/или содержит V_L область, которая включает часть, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой V сегментом каппа- или лямбда-цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии, и/или часть, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой J сегментом каппа- или лямбда-цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления, часть V_H области соответствует CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3. В некоторых вариантах осуществления, часть V_H области соответствует каркасной области 1 (FR1), FR2, FR2 и/или FR4. В некоторых вариантах осуществления, часть V_L области соответствует CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления, часть V_L области соответствует FR1, FR2, FR2 и/или FR4.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-H1, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей области CDR-H1 в последовательности, кодируемой V сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, антитело человека, в некоторых вариантах осуществления, содержит CDR-H1, имеющую последовательность, которая на 100% идентична или отличается не более чем на одну, две или три аминокислоты по сравнению с соответствующей областью CDR-H1 в последовательности, кодируемой V сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-H2, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность аминокислотной последовательности с соответствующей областью CDR-H2 в последовательности, кодируемой V сегментом

тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, антитело человека, в некоторых вариантах осуществления, содержит CDR-H2, имеющую последовательность, которая на 100% идентична или отличается не более чем на одну, две или три аминокислоты по сравнению с соответствующей областью CDR-H2 в последовательности, кодируемой V сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-H3, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность аминокислотной последовательности с соответствующей областью CDR-H3 в последовательности, кодируемой V сегментом, D сегментом или J сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, антитело человека, в некоторых вариантах осуществления, содержит CDR-H3, имеющую последовательность, которая на 100% идентична или отличается не более чем на одну, две или три аминокислоты по сравнению с соответствующей областью CDR-H3 в последовательности, кодируемой V сегментом, D сегментом или J сегментом тяжелой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-L1, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей области CDR-L1 в последовательности, кодируемой V сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, антитело человека, в некоторых вариантах осуществления, содержит CDR-L1, имеющую последовательность, которая на 100% идентична или отличается не более чем на одну, две или три аминокислоты по сравнению с соответствующей областью CDR-L1 в последовательности, кодируемой V сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-L2, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей области CDR-L2 в последовательности, кодируемой V сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, антитело человека, в некоторых вариантах осуществления, содержит CDR-L2, имеющую последовательность, которая на 100% идентична или отличается не более чем на одну, две или три аминокислоты по сравнению с соответствующей областью CDR-L2 в последовательности, кодируемой V сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-L3, имеющую, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, соответствующей области CDR-L3 в последовательности, кодируемой V сегментом и J сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, антитело человека, в некоторых вариантах осуществления, содержит CDR-L3, имеющую последовательность, которая на 100% идентична или отличается не более чем на одну, две или три аминокислоты по сравнению с соответствующей областью CDR-L3 в последовательности, кодируемой V сегментом и J сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, антитело человека, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит каркасную область, которая содержит последовательности сегментов гена зародышевой линии человека. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитело человека содержит V_H область, в которой каркасная область, *например,* FR1, FR2, FR3 и FR4, имеет, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%% идентичность последовательности с каркасной областью, кодируемой V сегментом и/или J сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления, антитело человека содержит V_L область, в которой каркасная область, *например,* FR1, FR2, FR3 и FR4, имеет, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с каркасной областью, кодируемой V сегментом и/или J сегментом легкой цепи человека из нуклеотидов зародышевой линии. Например, в некоторых таких вариантах осуществления, последовательность каркасной области, содержащаяся в V_H области и/или V_L области, отличается не более чем на 10 аминокислот, например, не более чем на 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту по сравнению с последовательностью каркасной области, кодируемой сегментом антитела зародышевой линии человека.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное антитело может представлять собой анти-BCMA scFv мыши, описанное в публикации международной патентной заявки № WO 2010/104949.

Антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, может содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина, такую как один или несколько доменов константной области. В некоторых вариантах осуществления, константные области включают константную область легкой цепи и/или константную область 1 тяжелой цепи (C_H1). В некоторых вариантах осуществления, антитело включает C_H2 и/или C_H3 домен, такой как Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет

собой Fc область IgG человека, такого как IgG1 или IgG4.

2. Спейсер

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, содержащий антитело (*например,* антигенсвязывающий фрагмент), предложенное в настоящем документе, такое как те, которые экспрессируются сконструированными клетками, используемыми в способах и применениях, предложенных в настоящем документе, дополнительно включает спейсер или спейсерную область. Спейсер обычно представляет собой полипептидный спейсер и обычно расположен внутри CAR между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR. В некоторых аспектах, спейсер может представлять собой или включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область иммуноглобулина, такая как шарнирная область IgG, *например,* шарнирная область, полученная из IgG4 или IgG4 и/или C_H1/C_L область и/или Fc область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или одна или несколько ее частей относится к IgG человека, такому как IgG4, или IgG1, или IgG2 человека. Как правило, спейсер, такой как часть константной области, служит спейсерной областью между антигенраспознающим компонентом (*например,* scFv) и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления, длина и/или композиция спейсера предназначены для оптимизации или стимулирования определенных особенностей взаимодействия между CAR и его мишенью; в некоторых аспектах, он предназначен для оптимизации биофизического синаптического расстояния между клеткой, экспрессирующей CAR, и клеткой, экспрессирующей мишень для CAR, во время или при или после связывания CAR с его мишенью на экспрессирующей мишень клетке; в некоторых аспектах экспрессирующей мишень клеткой является опухолевая клетка, экспрессирующая BCMA. В некоторых вариантах осуществления, CAR экспрессируется Т-клеткой, и длина спейсера соответствует длине, совместимой с активацией Т-клетки или для оптимизации эффективности CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой спейсерную область, расположенную между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом рекомбинантного рецептора, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная область представляет собой область, расположенную между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом рекомбинантного рецептора, например, CAR.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер может иметь длину, обеспечивающую повышенную отвечаемость клетки после связывания антигена, по сравнению с отсутствием спейсера и/или в присутствии другого спейсера, такого как

спейсер, отличающийся только по длине. В некоторых вариантах осуществления, длина спейсера составляет, по меньшей мере, 100 аминокислот, например, по меньшей мере, 110, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 аминокислот в длину. В некоторых примерах, длина спейсера составляет точно или примерно 12 аминокислот или составляет не более 12 аминокислот. Примеры спейсеров включают спейсеры, содержащие, по меньшей мере, от примерно 10 до 300 аминокислот, от примерно 10 до 200 аминокислот, от примерно 50 до 175 аминокислот, от примерно 50 до 150 аминокислот, от примерно 10 до 125 аминокислот, от примерно 50 до 100 аминокислот, от примерно 100 до 300 аминокислот, от примерно 100 до 250 аминокислот, от примерно 125 до 250 аминокислот или от примерно 200 до 250 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, спейсер или спейсерная область содержит, по меньшей мере, примерно 12 аминокислот, по меньшей мере, примерно 119 аминокислот или менее, по меньшей мере, примерно 125 аминокислот, по меньшей мере, примерно 200 аминокислот или, по меньшей мере, примерно 220 аминокислот, или, по меньшей мере, примерно 225 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит от 125 до 300 аминокислот в длину, от 125 до 250 аминокислот в длину, от 125 до 230 аминокислот в длину, от 125 до 200 аминокислот в длину, от 125 до 180 аминокислот в длину, от 125 до 150 аминокислот в длину, от 150 до 300 аминокислот в длину, от 150 до 250 аминокислот в длину, от 150 до 230 аминокислот в длину, от 150 до 200 аминокислот в длину, от 150 до 180 аминокислот в длину, от 180 до 300 аминокислот в длину, от 180 до 250 аминокислот в длину, от 180 до 230 аминокислот в длину, от 180 до 200 аминокислот в длину, от 200 до 300 аминокислот в длину, от 200 до 250 аминокислот в длину, от 200 до 230 аминокислот в длину, от 230 до 300 аминокислот в длину, от 230 до 250 аминокислот в длину или от 250 до 300 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или содержит или содержит примерно 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 или 229 аминокислот в длину или длину между любыми из вышеперечисленных.

Примеры спейсеров включают спейсеры, содержащие часть(и) константной области иммуноглобулина, такие как спейсеры, содержащие шарнир Ig, такой как шарнирный домен IgG. В некоторых аспектах, спейсер включает только шарнир IgG, шарнир IgG, связанный с одним или несколькими доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG, связанный с доменом C_H3. В некоторых вариантах осуществления, шарнир IgG, C_H2 и/или C_H3 могут быть получены, полностью или частично, из IgG4 или IgG2. В некоторых вариантах

осуществления, спейсер может представлять собой химерный полипептид, содержащий одну или несколько последовательностей шарнира, C_H2 и/или C_H3, полученных из IgG4, IgG2 и/или IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, шарнирная область включает всю или часть шарнирной области IgG4 и/или шарнирную область IgG2, где шарнирная область IgG4 необязательно представляет собой шарнирную область IgG4 человека, и шарнирная область IgG2 необязательно представляет собой шарнирную область IgG2 человека; C_H2 область включает всю или часть C_H2 области IgG4 и/или C_H2 области IgG2, где C_H2 область IgG4 необязательно представляет собой C_H2 область IgG4 человека, и C_H2 область IgG2 необязательно представляет собой C_H2 область IgG2 человека; и/или C_H3 область содержит всю или часть C_H3 области IgG4 и/или C_H3 области IgG2, где C_H3 область IgG4 необязательно представляет собой C_H3 область IgG4 человека, и C_H3 область IgG2 необязательно представляет собой C_H3 область IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления, C_H2 и C_H3 шарнир включает всю или часть каждой шарнирной области C_H2 и C_H3 из IgG4. В некоторых вариантах осуществления, шарнирная область является химерной и содержит шарнирную область из IgG4 человека и IgG2 человека; C_H2 область является химерной и включает C_H2 область из IgG4 человека и IgG2 человека; и/или C_H3 область является химерной и включает C_H3 область из IgG4 человека и IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4, содержащий, по меньшей мере, одну аминокислотную замену по сравнению с шарнирной областью IgG4 человека; химерную C_H2 область IgG2/4 человека; и C_H3 область IgG4 человека.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер может быть полностью или частично получен из IgG4 и/или IgG2 и может содержать мутации, такие как мутации одной или нескольких отдельных аминокислот в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах, аминокислотная модификация представляет собой замену пролина (P) на серин (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная модификация представляет собой замену глутамина (Q) на аспарагин (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, например, мутацию N177Q в положении 177 в C_H2 области последовательности полноразмерной Fc IgG4, представленной в SEQ ID NO:173, или N176Q в положении 176 в C_H2 области последовательности полноразмерной Fc IgG2, представленной в SEQ ID NO:172. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, которая необязательно имеет длину примерно 228 аминокислот; или спейсер, представленный в SEQ ID NO:174. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит аминокислотную

последовательность

ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO: 174),

кодируемую полинуклеотидом, оптимизированным для экспрессии кодонов и/или для элиминации сайтов сплайсинга, таких как криптические сайты сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность спейсера содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:200. В некоторых вариантах осуществления, кодирующая последовательность спейсера содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:236 или 8.

Дополнительные типовые спейсеры 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, нуклеотидная последовательность спейсера оптимизирована для снижения гетерогенности РНК после экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность спейсера оптимизирована для уменьшения криптических сайтов сплайсинга или уменьшения вероятности события сплайсинга в сайте сплайсинга.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:237, и кодируется полинуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:157. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:156. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:134, и кодируется полинуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:135. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:174, кодированную полинуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:175, 200, 236 или 8, или полинуклеотидом, который имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO:175, 200, 236 или 8. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO:174, кодируемой полинуклеотидом, который необязательно оптимизирован для использования кодонов и/или для снижения гетерогенности РНК.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:200.

3. Трансмембранный домен и внутриклеточные сигнальные компоненты

Антигенраспознающий компонент (например, антигенсвязывающий домен) обычно связан с одной или несколькими внутриклеточными сигнальными областями, содержащими сигнальные компоненты, такие как сигнальные компоненты, которые имитируют стимуляцию и/или активацию через комплекс антигенного рецептора, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, BCMA-связывающая молекула (*например,* антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связана с одним или несколькими трансмембранными доменами, такими как описаны в настоящем документе, и внутриклеточными сигнальными областями или доменами, содержащими один или несколько внутриклеточных компонентов, таких как описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном варианте осуществления, используется трансмембранный домен, который естественным образом ассоциирован с одним из доменов рецептора, *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 поверхностных белков 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 домены включают домены, полученные из (*т.е.* содержащие, по меньшей мере, трансмембранный(е) домен(ы) из) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3-эпсилон, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и/или CD154. Например, трансмембранный домен может представлять собой CD28 трансмембранный домен, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ

ID NO:139 или SEQ ID NO:140. 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.

Внутриклеточные сигнальные области или домены включают такие, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации 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 внутриклеточным сигнальным доменом CAR.

Рецептор, *например,* CAR, обычно включает внутриклеточную сигнальную область, содержащую, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент или сигнальный домен комплекса TCR, такой как цепь TCR CD3, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, *например,* дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах, BCMA-связывающее антитело связано 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, CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3-ζ) или Fc рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления, во время или после лигирования CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен CAR стимулирует и/или активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, *например* Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых случаях, 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

внутриклеточного сигнального домена компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используется вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный 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, инициируя передачу сигнала после рекрутинга антигенного рецептора, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, обладающую такой же функциональной способностью.

В контексте естественного TCR, полная активация обычно требует не только передачи сигналов через TCR, но и 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.

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 класса цитоплазматических сигнальных последовательностей.

В некоторых аспектах, CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную стимуляцию и/или 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 TCR или CD3 дзета, FcR гамма, CD3 гамма, CD3 дельта и CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область или домен в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления,

CD3 дзета содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:144 или SEQ ID NO:145.

В некоторых вариантах осуществления, CAR включает сигнальный домен (*например,* внутриклеточный или цитоплазматический сигнальный домен) и/или трансмембранную часть костимулирующей молекулы, такой как костимулирующая молекула Т-клетки. Примеры костимулирующих молекул включают CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. Например, костимулирующая молекула может быть получена из 4-1BB и может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, кодируемую последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO:5 или SEQ ID NO:6. В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает как стимулирующие или активирующие компоненты (*например,* цитоплазматическую сигнальную последовательность), так и костимулирующие компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие или активирующие компоненты включены в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR и костимулирующие CAR, экспрессированные на одной и той же клетке (см. WO 2014/055668). В некоторых аспектах CAR, направленно воздействующий на BCMA, является стимулирующим или активирующим CAR; в других аспектах, он является костимулирующим CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетки дополнительно включают ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov *et al.,* Sci. Transl. Medicine, 5(215) (декабрь 2013), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от BCMA, где стимулирующий или активирующий сигнал, доставляемый через BCMA-таргетный CAR, ослабляется или ингибируется за счет связывания ингибирующего CAR с его лигандом, *например,* для уменьшения эффектов вне мишени.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит CD28 трансмембранный и сигнальный домен, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (*например,* CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3 дзета.

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

В некоторых вариантах осуществления, предложенный химерный антигенный рецептор содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически распознает антиген созревания B-клеток (BCMA), такой как любой антигенсвязывающий домен, описанный в настоящем документе; (b) спейсер длиной, по меньшей мере, 125 аминокислот; (c) трансмембранный домен; и (d) внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора, содержащий V_H область и V_L область, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора, содержащий V_H область, которая представляет собой или содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности V_H области SEQ ID NO:116, и V_L область, которая представляет собой или содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности V_L области SEQ ID NO:119. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора, содержащий V_H область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора, содержащий V_H область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора, содержащий V_H область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора, содержащий V_H область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора содержит V_H область, которая представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, и V_L область, которая представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область включает стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, является компонентом Т-клеточного рецептора (TCR) и/или включает иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ) или ее функциональный вариант или сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий цитоплазматический домен является человеческим или получен из белка человека. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующий цитоплазматический домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая стимулирующий цитоплазматический домен, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:144, или представляет собой последовательность с оптимизированным кодоном и/или ее вырожденную последовательность. В других вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:145. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клетки или ее сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область является человеческой или получена из белка человека. В других вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая костимулирующую область, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, или

представляет собой кодон-оптимизированную последовательность и/или ее вырожденную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая костимулирующую сигнальную область, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен, полученный из CD4, CD28 или CD8. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен, полученный из CD28. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен является человеческим или получен из белка человека. В других вариантах осуществления, трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138.

Предложены химерные антигенные рецепторы, содержащие: (1) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген созревания В-клеток человека (BCMA), где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с последовательностью V_H области SEQ ID NO:116; и (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%% идентичность последовательности с последовательностью V_L области любой из SEQ ID NO:119; (2) спейсер, представленный в SEQ ID NO:174, или где нуклеиновая кислота, кодирующая спейсер, представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:200; (3) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен CD28 человека; и (4) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ) и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие такой химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления, V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в последовательности V_H области SEQ ID NO:116; и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в последовательности V_L области SEQ ID NO:119; или V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие

последовательности SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно.

Предложены химерные антигенные рецепторы, содержащие: (1) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген созревания В-клеток человека (BCMA), где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в последовательности V_H области SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в последовательности V_L области SEQ ID NO:119; или V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в последовательности V_H области SEQ ID NO:116; и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в последовательности V_L области SEQ ID NO:119; или V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или V_H область содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащие последовательности SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L область содержит CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, содержащие последовательности SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно; (2) спейсер, представленный в SEQ ID NO:174, или где нуклеиновая кислота, кодирующая спейсер, представляет собой или содержит последовательность,

представленную в SEQ ID NO:200; (3) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен CD28 человека; и (4) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ) человека и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клетки, необязательно из 4-1BB человека или CD28 человека. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие такой химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит последовательность V_H области SEQ ID NO:116 и последовательность V_L области SEQ ID NO:119. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен такого рецептора содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114. В некоторых вариантах осуществления, другие домены, области или компоненты химерного антигенного рецептора включают любые домены, области или компоненты, описанные в настоящем документе.

4. Суррогатный маркер

В некоторых вариантах осуществления, CAR или полинуклеотид, кодирующий CAR, дополнительно включает суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности (например, усеченный маркер клеточной поверхности), который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора. Например, в некоторых аспектах, внешние гены маркера используют в связи со сконструированной клеточной терапией для обеспечения возможности обнаружения или селекции клеток и, в некоторых случаях, также для стимуляции самоубийства клеток посредством ADCC. Типовые маркерные гены включают усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt), который может совместно экспрессироваться с представляющим интерес трансгеном (например, CAR) в трансдуцированных клетках (см., например, патент США № 8,802,374). EGFRt содержит эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Erbitux®). По этой причине Erbitux® можно использовать для идентификации или селекции клеток, которые были сконструированы с конструкцией EGFRt, в том числе клеток, сконструированных совместно с другим рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR). Кроме того, EGFRt обычно используется в качестве механизма самоубийства в связи с клеточной терапией. В некоторых аспектах, когда EGFRt коэкспрессируется в клетках с представляющим интерес трансгеном (например, CAR), он может быть таргетирован моноклональным антителом цетуксимабом для снижения или истощения перенесенных генно-модифицированных клеток посредством ADCC (см. патент США № 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). Важно отметить, что суицидальный подход с использованием tEGFR требует наличия эпитопа антитела. Другим примером такого маркерного гена является простат-специфический мембранный

антиген (PSMA) или его модифицированная форма. PSMA или его модифицированные формы могут содержать аминокислотную последовательность, связанную или распознаваемую PSMA-таргетной молекулой, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. PSMA-таргетные молекулы можно использовать для идентификации или селекции клеток, которые были сконструированы с помощью PSMA или модифицированной конструкции, в том числе в клетках, также сконструированных совместно с другим рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR), предложенный в настоящем документе. В некоторых аспектах, маркер включает весь или часть (*например,* усеченную форму) CD34, рецептор фактора роста нервов (NGFR), рецептор эпидермального фактора роста (*например,* EGFR) или PSMA.

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 могут 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 представлена в SEQ ID NO:246) или простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированную форму. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbitux®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, сконструированных с конструкцией tEGFR и кодируемым экзогенным белком, 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, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (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, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, *например,* T2A. См. WO 2014031687. В некоторых вариантах осуществления, введение конструкции, кодирующей CAR и суррогатный маркер, разделенных рибосомным переключателем T2A, может экспрессировать два белка из одной и той же конструкции, так что суррогатный маркер можно использовать в качестве маркера для обнаружения клеток, экспрессирующих такую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в международной публикации № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR) или PSMA, который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность 2A (например, расщепляемый линкер T2A, P2A, E2A или F2A, описанный в другом месте настоящего документа). Типовой полипептид для усеченного суррогатного маркера EGFR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:246, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность

последовательности с SEQ ID NO:246. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой молекулу, например белок клеточной поверхности, не встречающийся в природе на Т-клетках или не встречающийся 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 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 или в ответ на него; 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, 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 антитело, содержащее только V_H область, и внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах, внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета-цепи цепи CD3-

дзета (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах, внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы (*например,* костимулирующей молекулы Т-клетки), например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах, костимулирующей молекулой Т-клетки является CD28 или 4-1BB.

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). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант, 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 домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен из 42 аминокислот 4-1BB человека (№ доступа Q07011.1). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит стимулирующий сигнальный домен CD3 дзета человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3ζ человека (№ доступа: P20963.2) или сигнальный домен CD3 дзета, как описан в патенте США №: 7,446,190.

Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело или фрагмент BCMA, такое как любое из антител BCMA человека, включая sdAb и scFv, описанные в настоящем документе, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих Ig-шарнир, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело или фрагмент BCMA, такое как любое из антител BCMA человека, включая sdAb и scFv, описанные в настоящем документе, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих Ig-шарнир, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, такие конструкции CAR дополнительно включают элемент проскока рибосомы T2A и/или

последовательность tEGFR, *например,* ниже CAR.

В некоторых вариантах осуществления, мультиспецифические связывающие молекулы, например, мультиспецифические химерные рецепторы, такие как мультиспецифические CAR, могут содержать любые из мультиспецифических антител, включая, *например,* биспецифические антитела, мультиспецифические одноцепочечные антитела, *например,* диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv и тандемные три-scFv.

B. 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: 25, и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24. 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: 25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, или сигнальный пептид CD8-альфа, представленный в SEQ ID NO: 26.

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 T2A, может вызывать проскок рибосомы (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A 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 2A. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в описанных в настоящем документе способах и системах, без ограничения, последовательностей 2A из вируса ящура (F2A, *например,* SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей A (E2A, *например,* SEQ ID NO: 20), вирус Thosea asigna (T2A, *например,* SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиньи (P2A, *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.

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; Verhoeyen *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,* Chicaybam *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 MHC, 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, *m.e.* 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 встречаются 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 или 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 лейкафереза. 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,* Т-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 лейкафереза. 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 PBMC 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 (T_{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 T_{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. PBMC 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 (T_{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 T_{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, селектированных 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 PBMC 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 желательно разделить, *например,* которые желательно отрицательно или положительно селектировать.

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, апирогенном 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 меченными 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 выделение 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 инициирующей культивирование композиции питающих клеток, таких как неделящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), (*например,* так, чтобы полученная популяция клеток содержала, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или больше питающих клеток PBMC 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 PBMC, облученные гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления, PBMC 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.

C. 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-BCMA CAR. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходных композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии, например терапии аутологичными клетками, включая терапии в соответствии с любым из предложенных способов. 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-BCMA 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; криозамораживания 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

криозамораживания 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 ± 6 часов, 72 часа ± 6 часов или 96 часов ± 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 ± 6 часов, 48 часов ± 6 часов или 72 часа ± 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 отношение 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 лейкафереза; 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 лейкафереза. В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкафереза. 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 Ca^{++}/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 лейкафереза), промывают для удаления одного или нескольких антикоагулянтов, таких как гепарин, добавленных во время афереза или лейкафереза.

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 лейкафереза) 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 лейкафереза 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 лейкафереза. В одном аспекте, аутологичная плазма добавляется к продукту лейкафереза для улучшения буферной способности матрицы продукта лейкафереза. В некоторых аспектах, общий объем цельной крови, обрабатываемой для получения продукта лейкафереза, 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 лейкафереза подвергают процедуре, например промывке и составлению для криоконсервации в процессе, в течение примерно 48 часов после завершения сбора лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, продукт лейкафереза 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 лейкафереза. В некоторых аспектах, одна или несколько стадий промывки удаляют антикоагулянт во время сбора лейкафереза, клеточные отходы, которые могли накопиться в продукте лейкафереза, 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 лейкафереза 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 лейкафереза 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 лейкафереза, 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 лейкафереза

подвергается криоконсервации и/или криозащите (например, замораживанию) при плотности точно, примерно или, по меньшей мере, $5x10^6$ клеток/мл, $10x10^6$ клеток/мл, $20x10^6$ клеток/мл, $30x10^6$ клеток/мл, $40x10^6$ клеток/мл, $50x10^6$ клеток/мл, $60x10^6$ клеток/мл, $70x10^6$ клеток/мл, $80x10^6$ клеток/мл, $90x10^6$ клеток/мл, $100x10^6$ клеток/мл, $110x10^6$ клеток/мл, $120x10^6$ клеток/мл, $130x10^6$ клеток/мл, $140x10^6$ клеток/мл или $150x10^6$ 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 лейкафереза 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 лейкафереза 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 лейкафереза составляет меньше $15x10^9$ клеток, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза аликвотируют в четыре контейнера для криоконсервации, таких как пакеты. В некоторых вариантах осуществления, когда общее количество жизнеспособных клеток в продукте афереза или продукте лейкафереза составляет 15-$30x10^9$ клеток, криоконсервированный и/или криозащищенный продукт афереза или продукт лейкафереза 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 лейкафереза 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

лейкафереза) 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 направленно воздействующее 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 лейкафереза) 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 лейкафереза) 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 лейкафереза), 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 лейкафереза, 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 лейкафереза), 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 лейкафереза) 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, селектируют или обогащают путем хроматографического выделения, такого как колоночная хроматография, включая аффинную хроматографию, или гель-проникающую 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 (CATCH). 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 (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 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

(T_{CM}), 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 B, который может специфически связываться с эпитопом или участком молекулы, и также содержит партнера по связыванию, также называемого в настоящем документе партнером по связыванию C, 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 C и, по меньшей мере, одним сайтом связывания Z является нековалентным взаимодействием. В некоторых случаях, связывающее взаимодействие между партнером по связыванию C 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 C 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 PCT №№ 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 C). 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 C) 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: 256). 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: 256, 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 стрептавидина дикого типа из *Streptomyces avidinii,* представленного в SEQ ID NO: 256, или его функционально активный

фрагмент. Например, в некоторых вариантах осуществления, стрептавидин может включать фрагмент стрептавидина дикого типа, который усечен на N- и/или С-конце. Такие минимальные стрептавидины включают любые, которые начинаются с N-конца в области аминокислотных положений 10-16 SEQ ID NO: 256 и заканчиваются на С-конце в области аминокислотных положений 133-142 SEQ ID NO: 256. В некоторых вариантах осуществления, функционально активный фрагмент стрептавидина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления, стрептавидин, такой как представлен в SEQ ID NO: 257, может дополнительно содержать N-концевой метионин в положении, соответствующее Ala13, с нумерацией, представленной в SEQ ID NO: 256. Ссылка на положение остатков в стрептавидине или мутеинах стрептавидина относится к нумерации остатков в SEQ ID NO: 256.

Примеры стрептавидинов или мутеинов стрептавидина упоминаются, например, в WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6,022,951, WO 98/40396 или WO 96/24606. Примеры мутеинов стрептавидина 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 стрептавидина может содержать аминокислоты, которые не являются частью не модифицированного или стрептавидина дикого типа, или может включать только часть дикого типа или не модифицированного стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления, мутеин стрептавидина содержит, по меньшей мере, одну субъединицу, которая может иметь на одну аминокислотную замену (замену) больше по сравнению с субъединицей не модифицированного или дикого типа стрептавидина, например, по сравнению с субъединицей стрептавидина дикого типа, представленной в SEQ. ID NO: 256 или его функционально активного фрагмента, например, представленного в SEQ ID NO: 257.

В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания, такая как константа диссоциации (K_d), стрептавидина или мутеина стрептавидина для связывающего домена составляет меньше $1x10^{-4}$ M, $5x10^{-4}$ M, $1x10^{-5}$ M, $5x\ 10^{-5}$ M, $1x10^{-6}$ M, $5x10^{-6}$ M или $1x10^{-7}$ M, но обычно больше $1x10^{-13}$ M, $1x10^{-12}$ M или $1x10^{-11}$ M. 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} M. В некоторых случаях, аффинность связывания можно дополнительно улучшить путем внесения мутации внутри молекулы стрептавидина, 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 C, присутствующий в агенте (например, агент, связывающийся с рецептором, или агент селекции). В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность с общей формулой His-Pro-Xaa, где Xaa представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, например, содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 258. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 259. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность имеет общую формулу, представленную в SEQ ID NO: 260, такую как указана в SEQ ID NO: 261. В одном примере, пептидная последовательность представляет собой Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называемую Strep-tag®, представленную в SEQ ID NO: 262). 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: 263). 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-Xaa, где Xaa 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: 260 (см., например, международную опубликованную заявку PCT № WO 02/077018, патент США № 7,981,632). В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд содержит последовательность, имеющую формулу, представленную в любой из SEQ ID NO: 264 или 265. В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд имеет аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 266-270. 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 C, например, C1 и C2, реагент мультимеризации и/или реагенты олигомерных частиц, связанные с одним или несколькими агентами через партнер по связыванию C, 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: 256. 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: 271 или SEQ ID NO: 272 или 273 (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: 274, 275 или 276 (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: 277 или SEQ ID NO: 278. В конкретных вариантах осуществления, молекула представляет собой тетрамер стрептавидина или мутеин стрептавидина, содержащий последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 257, 272, 275, 277, 279, 273 или 276, 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 $3,7x10^{-5}$ М для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly, также называемого Strep-tag®, представленного в SEQ ID NO: 262), и/или которая составляет точно или меньше $7,1x10^{-5}$ М для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-

Glu-Lys, также называемого Strep-tag® II, представленного в SEQ ID NO: 264), и/или которая составляет точно или меньше $7,0x10^{-5}$ M, $5,0x10^{-5}$ M, $1,0x10^{-5}$ M, $5,0x10^{-6}$ M, $1,0x10^{-6}$ M, $5,0x10^{-7}$ M или $1,0x10^{-7}$ M, но обычно больше $1x10^{-13}$ M, $1x10^{-12}$ M или $1x10^{-11}$ M для любого из пептидных лигандов, представленных в любой из SEQ ID NO: 264, 264-265, 269-270, 266-268, 261, 262, 258, 260.

В некоторых вариантах осуществления, полученный мутеин стрептавидина демонстрирует аффинность связывания, характеризующуюся константой ассоциации (K_a), которая составляет точно или больше $2,7x10^4$ M^{-1} для пептидного лиганда (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly, также называемого Strep-tag®, представленного в SEQ ID NO: 262) и/или которая составляет точно или больше $1,4x10^4$ M^{-1} для пептидного лиганда (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys, также называемого Strep-tag® II, представленного в SEQ ID NO: 264), и/или которая составляет точно или больше $1,43x10^4$ M^{-1}, $1,67x10^4$ M^{-1}, $2x10^4$ M^{-1}, $3,33x10^4$ M^{-1}, $5x10^4$ M^{-1}, $1x10^5$ M^{-1}, $1,11x10^5$ M^{-1}, $1,25x10^5$ M^{-1}, $1,43x10^5$ M^{-1}, $1,67x10^5$ M^{-1}, $2x10^5$ M^{-1}, $3,33x10^5$ M^{-1}, $5x10^5$ M^{-1}, $1x10^6$ M^{-1}, $1,11x10^6$ M^{-1}, $1,25x10^6$ M^{-1}, $1,43x10^6$ M^{-1}, $1,67x10^6$ M^{-1}, $2x10^6$ M^{-1}, $3,33x10^6$ M^{-1}, $5x10^6$ M^{-1}, $1x10^7$ M^{-1}, но обычно меньше $1x10^{13}$ M^{-1}, $1x10^{12}$ M^{-1} или $1x10^{11}$ M^{-1} для любого из пептидных лигандов, представленных в любой из SEQ. ID NOS: 264, 264-265, 269-270, 266-268, 261, 262, 258, 260.

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 $1x10^7$ г/моль до $1x10^9$ 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, направленно воздействующее на комплекс TCR, или его компонент, антитело, направленно воздействующее на 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-меченными анти-CD3 и Strep-меченными 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, которые включены посредством ссылки во всей полноте.

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 мМ 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 уравновешивают и загружают либо тиолированным мутеином стрептавидина, либо малеимидным мутеином стрептавидина, и проводят элюирование, добавляя 3,5 мл буфера для связывания (100 мМ NaH_2PO_4, 150 мМ NaCl, 5 мМ 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 Millopore). Затем отфильтрованный раствор загружают в колонку (Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare) для эксклюзионной хроматографии (SEC) с хроматографической системой AKTA Explorer (GE Healthcare). Фракции с миллиединицей оптической плотности (mAU) больше или равной 1500 mAU объединяют. Объединенный образец, содержащий олигомерный мутеин стрептавидина, обрабатывают 100 мМ гидроксиламина при pH 6,35 в течение 15 минут при комнатной температуре. Для удаления гидроксиламина 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 OKT3 (ATCC® CRL-8001™; см. также патент США № 4,361,549), и содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи анти-CD3 антитела OKT3, описанный в Arakawa et al. J. Biochem. 120, 657-662 (1996). Эти последовательности представлены в SEQ ID NO: 280 и 281, 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 вариабельные домены тяжелой и легкой цепей анти-CD28 антитела CD28.3, представленные в SEQ ID NO: 282 и 283, 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 $7,5x10^6$ г/моль до $2x10^8$ 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, направленно воздействующее на комплекс TCR или его компонент, антитело, направленно воздействующее на 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 $900x10^6$ Т-клеток (например, $900x10^6$ CD3+ Т-клеток или $450x10^6$ CD4+ Т-клеток и $450x10^6$ 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, $0,01x10^6$ клеток/мл, $0,1x10^6$ клеток/мл, $0,5x10^6$ клеток/мл, $1,0x10^6$ клеток/мл, $1,5x10^6$ клеток/мл, $2,0x10^6$ клеток/мл, $2,5x10^6$ клеток/мл, $3,0x10^6$ клеток/мл, $4,0x10^6$ клеток/мл, $5,0x10^6$ клеток/мл, $10x10^6$ клеток/мл или $50x10^6$ 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, $3,0x10^6$ 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, направленно воздействующим на комплекс TCR или его компонент, антителом, направленно воздействующим на 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 усилии 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 ± 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 ± 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 ± 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-BCMA 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 генной 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 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, например, стимулированные клетки, конструируют в стимулирующих условиях 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 рекомбинантный IL-2, IL-7 и/или IL-15 человека или включают их. В некоторых вариантах осуществления, клетки сконструированы, например, трансдуцированы или в условиях стимуляции в присутствии рекомбинантного IL-2, IL-7 и IL-15, такого как рекомбинантный IL-2 человека (например, 100 МЕ/мл), рекомбинантный IL-7 человека (например, 600 МЕ/мл) и/или рекомбинантный IL-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; Verhoeyen 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 Sepax® и Sepax® 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 x 10^6, 100 x 10^6, 150 x 10^6, 200 x 10^6, 250 x 10^6, 300 x 10^6, 350 x 10^6, 400 x 10^6, 450 x 10^6, 500 x 10^6, 550 x 10^6, 600 x 10^6, 700 x 10^6, 800 x 10^6, 900 x 10^6 или 1,000 x 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 50x10^6 клеток, точно или примерно 100x10^6 клеток, точно или примерно 150x10^6 клеток, точно или примерно 200x10^6 клеток, точно или примерно 250x10^6 клеток, точно или примерно 300x10^6 клеток, точно или примерно 350x10^6 клеток, точно или примерно 400x10^6 клеток, точно или примерно 450x10^6 клеток, точно или примерно 500x10^6 клеток, точно или примерно 550x10^6 клеток, точно или примерно 600x10^6 клеток, точно или примерно 700x10^6 клеток, точно или примерно 800x10^6 клеток, точно или примерно 900x10^6 клеток или точно или примерно 1000x10^6 клеток, или любое значение между любыми из вышеперечисленных. В конкретных вариантах осуществления, до 900x10^6 клеток входной популяции подвергают стимуляции, и количество точно, примерно или до 600x10^6 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 300x10^6 клеток, например, в жизнеспособные Т-клетки из стимулированной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, трансдуцируют или подвергают трансдукции точно или примерно 100x10^6 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 600x10^6 клеток, например, в жизнеспособные Т-клетки из стимулированной клеточной популяции. В некоторых

вариантах осуществления, трансдуцируют или подвергают трансдукции точно или примерно $600x10^6$ клеток, например, жизнеспособных Т-клеток из стимулированной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, стимуляции подвергают до $900x10^6$ 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 $600x10^6$ 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 CTS™, 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 ± 6 часов, 48 часов ± 6 часов или 72 часов ± 6 часов. В конкретных вариантах осуществления, трансдукцию, включая инкубацию после трансдукции, проводят в течение или в течение примерно 72 часов, 72 ± 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 ± 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 желательно 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 g. 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 больший 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 усилии 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 (кпПЦР).

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 дцДНК смешивают с бромидом этидия, наносят на кассету для электрофореза, и фракции образца обнаруживают с помощью сверхяркого зеленого LED.

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 зонд, 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 экспрессирующих 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 p30 белка P рибонуклеазы) или 18S рРНК (18S рибосомная РНК), 28S рРНК (28S рибосомная РНК), TUBA (α-тубулин), ACTB (β-актин), β2M (β2-микроглобулин), ALB (альбумин), RPL32 (рибосомный белок L32), TBP (белок, связывающий последовательность TATA), CYCC (циклофилин C), EF1A (фактор элонгации 1α), 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 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 в 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 ±2°C, ±1°C, ±0,5°C или ±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 IL-7, например, рекомбинантным IL-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 IL-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, 750 МЕ/мл или 1000 МЕ/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки, например, трансформированные клетки, инкубируют в присутствии точно или примерно 600 МЕ/мл IL-7.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например трансформированные клетки, инкубируют с рекомбинантным IL-15, например, рекомбинантным IL-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 IL-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 IL-15, например рекомбинантного IL-2 человека.

В конкретных вариантах осуществления, клетки, например трансформированные 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, 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 IL-2, IL-7 и/или IL-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 ATP 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 Т-клеток OpTmizer™ CTS™ (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-глутамина (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 Т-клеточной добавкой и свободной формой L-глутамина, и не содержит какую-либо замену сыворотки иммунных клеток, какую-либо дипептидную форму L-глутамина или любого рекомбинантного цитокина. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная среда содержит минимальную среду (например, минимальную среду для размножения Т-клеток OpTmizer™), L-глутамин и один или несколько дополнительных компонентов, таких как добавки (например, добавку для размножения Т-клеток OpTmizer™).

В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или примерно $0,25x10^6$ клеток/мл, $0,5x10^6$ клеток/мл, $0,75x10^6$ клеток/мл, $1,0x10^6$ клеток /мл, $1,25x10^6$ клеток/мл, $1,5x10^6$ клеток/мл, $1,75x10^6$ клеток/мл или $2,0x10^6$ клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления, клетки инкубируют в бессывороточной среде в концентрации точно или примерно $0,75x10^6$ 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 ± 6 часов, 48 часов ± 6 часов или 72 часов ± 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 $0,75x\ 10^{\ 6}$ 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 Т-клеток OpTmizer™, но не содержит заменители сыворотки иммунных клеток, любую дипептидную форму L-глутамина 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 глутамина, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления, концентрация глутамина, 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 глутамина, 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 глутамина, 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 глутамина, 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 ± 6 часов, 48 часов ± 6 часов или 72 часов ± 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 ± 6 часов, 48 часов ± 6 часов или 72 часа ± 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 ±40%, ±35%, ±30%, ±25%, ±20%, ±15%, ±10%, ±5%, ±2%, ±1% или меньше ±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, ±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, ±25%, ±20%, ±15%, ±10%, ±5% или ±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 удвоений клеточной популяции, например, удвоений которые возникают во время инкубации. В конкретных вариантах осуществления, количество удвоений 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:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 которым 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 мутеин 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 мкМ, 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 мкМ, 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 ± 6 часов, 72 часа ± 6 часов или 96 часов ± 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, транссептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, внутрихориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или задней околосклеральной 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 подвергают 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, $1x10^6$, $2x10^6$, $5x10^6$, $1x10^7$, $5x10^7$ или $1x10^8$ сконструированных клеток, всего клеток, Т-клеток или PBMC. 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

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), например, анти-BCMA CAR, такой как CAR, направленно воздействующий на BCMA 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-BCMA 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-BCMA 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-BCMA 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 CB19+. 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 представляют собой 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 CD45+ клеток в композиции представляют собой CD3+, по меньшей мере или примерно 40% всего клеток в композиции экспрессируют анти-BCMA CAR, меньше чем примерно 1,5% всего живых CD45+ клеток в композиции представляют собой NK-клетки или клетки, положительные в отношении экспрессии маркера NK-клеток, и меньше примерно 0,1% всего живых CD45+ клеток в композиции представляют собой BCMA+. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 96% всего живых CD45+ клеток в композиции представляют собой CD3+, по меньшей мере или примерно 50% всего клеток в композиции экспрессируют анти-BCMA CAR, меньше чем примерно 0,5% всего живых CD45+ 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 BCMA+.

В конкретных вариантах осуществления, композиция, содержащая сконструированные Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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-BCMA 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-BCMA 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 CD45+ 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 CD45+ 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 CD45+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CD3+CD4+ клетки составляют от примерно 55% до примерно 65% всего живых CD45+ клеток в композиции, в то время как CD3+CD8+ клетки составляют от примерно 35% до примерно 45% всего живых CD45+ 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 CD45+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD3+ клетки (например, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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 CD45+ клеток или CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD3+ клетки (например, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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 CD45+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки (например, CD4+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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 CD45+ клеток или CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки (например, CD4+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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 CD45+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD8+ клетки (например, CD8+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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 CD45+ клеток или их CAR-экспрессирующих клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD8+ клетки (например, CD8+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA 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 CD45+ клеток в композиции.

В конкретных вариантах осуществления, клетки CAR+CD3+ (например, клетки CD3+, экспрессирующие анти-BCMA CAR) составляют от примерно 35% до примерно 65% всего живых CD45+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки (например, CD4+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR) составляют от примерно 25% до примерно 55% всего живых CD45+ клеток в композиции, в то время как CAR+CD8+ клетки (например, CD8+ клетки экспрессирующие анти-BCMA CAR), составляют от примерно 10% до примерно 30% всего живых CD45+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, составляют примерно 50% всего живых CD45+ 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 CD45+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CD3+ клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, составляют примерно 60% всего живых CD45+ клеток в композиции. В конкретных вариантах осуществления, CAR+CD4+ клетки составляют примерно 40%, тогда как CAR+CD8+ клетки составляют примерно 20% всего живых CD45+ клеток в композиции.

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

В некоторых вариантах, выходная композиция содержит соотношение от %61 до 1:5, от 4:1 до 1:4, 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-BCMA CAR, к CD8+ Т-клеткам, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, соотношение CD4+ Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (например, анти-BCMA CAR), к CD8+ Т-клеткам, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор (например, анти-BCMA 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 5:1 до 2:1 или от примерно 5:1 до примерно 2:1 CD4+CAR+ Т-клеток к CD8+CAR+ Т-клеткам.

В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит соотношение от примерно 5:1 до примерно 1:2 или от примерно 4:1 до примерно 1:1 CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит соотношение от 5:1 до 2:1 или от примерно 4:1 до примерно 1:1 CD4+CAR+ Т-клеток к CD8+CAR+ 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, 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% жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 75% жизнеспособных клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90% или, по меньшей мере, точно или примерно 95% жизнеспособных клеток. В некоторых 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, 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% жизнеспособных CD3+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 75% жизнеспособных CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90% или, по меньшей мере, точно или примерно 95% жизнеспособных CD3+ Т-клеток. В некоторых 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, 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% жизнеспособных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 75% жизнеспособных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90% или, по меньшей мере, точно или примерно 95% жизнеспособных CD4+ Т-клеток. 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, 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% жизнеспособных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 75% жизнеспособных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит по меньшей мере, точно или примерно 85%, по меньшей мере, точно или примерно 90% или, по меньшей мере, точно или примерно 95% жизнеспособных CD8+ Т-клеток.

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-BCMA 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-BCMA 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-BCMA 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-BCMA 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

суррогатным маркером экспрессии рекомбинантного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 5%, по меньшей мере или примерно 10%, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, 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 97%, по меньшей мере или примерно 99% или больше 99% клеток композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% клеток композиции экспрессируют анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 5%, по меньшей мере или примерно 10%, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, 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 97%, по меньшей мере или примерно 99% или больше 99% CD3+ Т-клеток композиции экспрессируют анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% CD3+ Т-клеток композиции экспрессируют анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 5%, по меньшей мере или примерно 10%, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, 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 97%, по меньшей мере или примерно 99% или больше 99% клеток композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% клеток композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-BCMA CAR.

В некоторых вариантах осуществления, композиция включает, по меньшей мере,

или по меньшей мере, примерно 0,2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,7x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,8x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 0,9x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,1x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,7x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,8x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 1,9x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,1x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,7x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,8x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 2,9x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,1x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,7x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,8x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 3,9x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,1x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,7x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,8x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 4,9x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,1x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,2x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,3x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,4x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,5x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,7x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,8x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, 5,9x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл или 6x10^6 CD3+CAR+ клеток/мл, каждый включительно. В некоторых вариантах осуществления, композиция включает, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 0,2x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,7x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,8x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 0,9x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,1x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,2x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,7x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,8x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 1,9x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,1x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,2x10^6

жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,7x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,8x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 2,9x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,1x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,2x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,7x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,8x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 3,9x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,1x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,2x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,7x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,8x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 4,9x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,1x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,2x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,3x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,4x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,5x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,7x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,8x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, 5,9x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл или 6x10^6 жизнеспособных CD3+CAR+ клеток/мл, каждый включительно.

В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 30%, 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 97%, по меньшей мере или примерно 99%, или больше 99% CD4+ Т-клеток композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор, например анти-BCMA CAR. В конкретных вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% CD4+ Т-клеток в композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор, например анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 30%, 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 97%, по меньшей мере или примерно 99%, или больше 99% CD8+ Т-клеток композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, анти-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% CD8+ Т-клеток композиции экспрессируют рекомбинантный рецептор, например анти-BCMA CAR.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 5%, по меньшей мере или примерно 10%, по меньшей мере или примерно 20%, по меньшей мере или примерно 30%, 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 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-BCMA CAR), CD4+CAR+ (например, CD4+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-BCMA CAR) и/или CD8+CAR+ (например, CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-BCMA CAR). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 50% живых CD4+ клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-BCMA 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-BCMA 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-BCMA 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-BCMA CAR. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или примерно 60% живых CD45+ клеток в композиции представляют собой CD3+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-

BCMA CAR, по меньшей мере или примерно 40% представляют собой CD4+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-BCMA CAR, и по меньшей мере или примерно 20% представляют собой CD8+ Т-клетки, которые экспрессируют анти-BCMA CAR.

В любом из последующих вариантов осуществления, композиция может содержать примерно или, по меньшей мере, примерно $10x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $20x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $25x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $50x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $100x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $200x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $400x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $600x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $800x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $1000x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $1200x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $1400x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $1600x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $1800x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $2000x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $2500x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $3000x10^6$, или примерно или, по меньшей мере, примерно $4000x10^6$ 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 $5x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $10x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $20x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $25x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $50x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $100x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $150x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $200x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $250x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $300x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $350x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $400x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $450x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $500x10^6$, примерно или, по меньшей мере, примерно $550x10^6$, или примерно или, по меньшей мере, примерно $600x10^6$ 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, $5x10^6$ клеток/мл, $10x10^6$ клеток/мл, $20x10^6$ клеток/мл, $30x10^6$ клеток/мл, $40x10^6$ клеток/мл, $50x10^6$ клеток/мл, $60x10^6$ клеток/мл, $70x10^6$ клеток/мл, $80x10^6$ клеток/мл, $90x10^6$ клеток/мл, $100x10^6$ клеток/мл, $110x10^6$ клеток/мл, $120x10^6$ клеток/мл, $130x10^6$ клеток/мл, $140x10^6$ клеток/мл или $150x10^6$ клеток/мл в растворе или буфере, например, в растворе или буфере для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, от примерно или до примерно $900x10^6$ клеток (например, жизнеспособных CD4+ Т-клеток и жизнеспособных CD8+ Т-клеток или жизнеспособных CD3+ Т-клеток) подвергают стимуляции, где примерно или до примерно $600x10^6$ 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 $100x10^6$ до примерно $1400x10^6$ 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-Т-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 композиций имеют большую долю и/или частоту подобных наивным клеток, 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-клетки 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 B. 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 клеток и 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, 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 клеток 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 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%, по меньшей мере, или точно или примерно 65% CD4+ Т-клеток в выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD4+ Т-клетки центральной памяти, или CD4+ Т-клетки центральной памяти. 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% и точно или примерно 65% CD4+ Т-клеток в выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD4+ 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+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти или CD4+CAR+ 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+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти, или CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти. 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 на или примерно 55%, от точно или примерно 55% до точно или примерно 60%, или от точно или примерно 60% до точно или примерно 65% CD4+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти или CD4+CAR+ 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% CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD8+ Т-клетки центральной памяти, или CD8+ 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% CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD8+ Т-клетки центральной памяти, или CD8+ Т-клетки центральной памяти. 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 на или примерно 55%, от точно или примерно 55% до или примерно 60%, или от точно или примерно 60% и точно или примерно 65% CD8+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным или CD8+ Т-клетки центральной памяти клетки или CD8+ 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% CD8+CAR+ Т-клеток выходной композиции представляют собой подобные наивным Т-клетки или CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти или CD8+CAR+ 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% CD8+CAR+ Т-клеток выходной композиции являются подобные наивным или CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти или CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти. 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 на 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 подобные наивным или CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти, или

CD8+CAR+ 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 (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 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 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 B- 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 B- 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 клеток и клеток 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 точно или примерно 50%, по меньшей мере точно или примерно 55%, по меньшей мере точно или примерно 60%, или по меньшей мере 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 примерно 60% до точно или примерно 65% CD4+ 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+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% CD4+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% CD4+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% CD8+ 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+ 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 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+ 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% 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 B- 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 B- 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, 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, 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 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 аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% всего рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+ CCR7+ и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 40% всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в терапевтической Т-клеточной композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 95% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 65% всего

рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+ CCR7+ и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 45% всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в терапевтической Т-клеточной композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% всего рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции составляют CD27+CCR7+, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 55%, при, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60%, или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 65% всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в терапевтической Т-клеточной композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 75% всего рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+ CCR7+ и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 55% всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в терапевтической Т-клеточной композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% всего рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+ CCR7+, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% всего рецептор$^+$/CD8$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+ CCR7+, и, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 65% всего рецептор$^+$/CD4$^+$ клеток в композиции представляют собой CD27+CCR7+. В некоторых аспектах, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 98% клеток в композиции представляют собой CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, по меньшей мере, или, 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, PBMC или образца афереза или лейкафереза), 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-BCMA 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, ±25%, ±20%, ±15%, ±10%, ±5% или ±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, or 1900 и 2000 нг/мл, каждый включительно.

В настоящем документе также описан способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие CAR, который направленно воздействует на BCMA, где входная 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 нарушение, 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».

Во всем данном описании, 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, исключающие 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 объемом 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 остальном 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

1. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

2. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 5:1;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

3. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей

сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

4. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 $CD27^+CCR7^+$.

5. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,9.

6. Способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки; и

интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR^+ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где композиция содержит от точно или примерно $50x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где композиция содержит от $70x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где композиция содержит от $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $200x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где композиция содержит от $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $160x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

11. Способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

12. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2,5 до примерно 5:1;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

13. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно; и

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

14. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

15. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR),

который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $100x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 $CD27^+CCR7^+$.

16. Способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

17. Способ лечения множественной миеломы (MM), где способ включает введение субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии MM, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,9.

18. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно;

по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки; и

интегрированное число копий вектора (iVCN) CAR^+ Т-клеток в композиции в среднем составляет от или от примерно 0,4 копии на диплоидный геном до 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, отличающийся тем, что композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 1:2 до примерно 4:1, от примерно 1:1,5 до примерно 2:1, или точно или примерно 1:1.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, где композиция содержит $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, в соотношении от примерно 5:1 до примерно 2:1, от примерно 4:1 до примерно 2:1, от примерно 3:1 до примерно 2:1, точно или примерно 5:1, точно или примерно 4:1, точно или примерно 3:1 или точно или примерно 2:1.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11-20, где композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11-20, где композиция содержит от точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11-20, где композиция содержит точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11-20, где композиция содержит точно или примерно $30x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6 и 11-20, где композиция содержит точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, 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.

27. Способ по любому из вариантов осуществления, 1-26, где от точно или примерно 2% до точно или примерно 30% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно, аннексин V или активную каспазу 3.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, где от точно или примерно 5% до точно или примерно 10% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, 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.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, 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.

31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, где от точно или примерно 20% до точно или примерно 30% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, 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% от CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где от точно или примерно 80% до точно или примерно 85% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип подобных наивным или центральной памяти.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где от точно или примерно 85% до точно или примерно 90% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где от точно или примерно 90% до точно или примерно 95% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный

наивным или центральной памяти.

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, 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 наивным или центральной памяти.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-37, 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.

39. Способ по варианту осуществления 38, где маркер, экспрессируемый на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти, выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD27, CD28 и CCR7.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 1-39, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ и/или $CD62L^-CCR7^+$.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 1-40, 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 $CD62L^-CCR7^+$.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 1-41, 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 $CD62L^-CCR7^+$.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 1-42, 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 $CD27^+CCR7^+$.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ 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% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

54. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

58. Способ по любому из вариантов осуществления 1-53, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой

$CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

60. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

61. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 1-58, где, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции представляют собой $CD27^+CCR7^+$.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,9 до точно или примерно 0,8.

65. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,8.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,8 до точно или примерно 0,7.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,7 до точно или примерно 0,6.

68. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,6 до точно или примерно 0,5. .

69. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,5 до точно или примерно 0,4.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 1-69, 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.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-69, 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.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 1-69, 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.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 1-69, 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.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 1-73, где на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект получил, по меньшей мере, 3 схемы лечения против миеломы.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 1-74, где на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект получил три или несколько терапий, необязательно, четыре или несколько предшествующих терапий, выбранных из:

трансплантации аутологичных стволовых клеток (ASCT);

иммуномодулирующего агента;

ингибитора протеасомы; и

анти-CD38 агента,

кроме случаев, когда субъект не является кандидатом на получение или имеет противопоказания для одной или нескольких терапий.

76. Способ по любому из вариантов осуществления 1-75, где на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект получил три или несколько терапий, необязательно, четыре или несколько предшествующих терапий, необязательно, выбранных из:

трансплантации аутологичных стволовых клеток (ASCT);

иммуномодулирующего агента и ингибитора протеасом, по отдельности или в комбинации; и

анти-CD38 агента.

77. Способ по любому из вариантов осуществления 1-76, где на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект получил все три из следующих терапий: трансплантация аутологичных стволовых клеток (ASCT); схема, включающая иммуномодулирующий агент и ингибитор протеасомы; и анти-CD38 агент.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 1-77, где индукция с или без трансплантации костного мозга и с или без поддерживающей терапии считается одной схемой для целей определения количества предшествующих схем лечения против миеломы.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 1-78, где на момент или до введения композиции сконструированных Т-клеток субъект невосприимчив к последней схеме лечения против миеломы.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 1-79, где не поддающаяся лечению миелома определяется как документально подтвержденное прогрессирующее заболевание в течение или в пределах 60 дней, измеренное от последней дозы, до завершения лечения по последней схеме лечения против миеломы.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 75-80, где иммуномодулирующий агент выбран из талидомида, леналидомида и помалидомида, по отдельности или в комбинации.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 75-81, где ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба, по отдельности или в комбинации.

83. Способ по любому из вариантов осуществления 75-82, где субъект прошел, по меньшей мере, 2 последовательных цикла лечения по каждой из схем иммуномодулирующего агента и/или схем ингибитора протеасом, за исключением случаев, когда прогрессирование заболевания было лучшим ответом на схему.

84. Способ по любому из вариантов осуществления 75-83, где анти-CD38-агент представляет собой анти-CD38-антитело.

85. Способ по любому из вариантов осуществления 75-84, где анти-CD38-агент представляет собой или содержит даратумумаб.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 75-85, где анти-CD38-агент применяют как часть комбинированной схемы или в качестве монотерапии.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 1-86, где во время введения дозы клеток и/или во время противолимфомной химиотерапии или лейкафереза, субъект не имеет активный или в анамнезе плазмаклеточный лейкоз (PCL).

88. Способ по любому из вариантов осуществления 1-87, где на момент введения у субъекта был рецидив или возникла невосприимчивость к лечению после, по меньшей мере,

3 или, по меньшей мере, 4 предшествующих терапий множественной миеломы.

89. Способ по любому из вариантов осуществления 1-88, где на момент введения у субъекта время с момента постановки диагноза множественной миеломы составляет приблизительно 4 года, или от 2 до 15 лет, или от 2 до 12 лет.

90. Способ по любому из вариантов осуществления 1-89, где на момент введения субъект получил примерно 10, или от 3 до 15, или от 4 до 15 предыдущих схем лечения множественной миеломы.

91. Способ по любому из вариантов осуществления 1-90, где на момент введения субъект был невосприимчив или не отвечал на бортезомиб, карфилзомиб, леналидомид, помалидомид и/или анти-CD38 моноклональное антитело.

92. Способ по любому из вариантов осуществления 1-91, где на момент введения субъекту ранее была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 1-91, где на момент введения субъекту ранее не была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток (ASCT) из-за того, что субъект не подходит для проведения ASCT, например, из-за возраста или других документально подтвержденных причин.

94. Способ по любому из вариантов осуществления 1-93, где на момент введения субъект имеет цитогенетику IMWG высокого риска.

95. Способ по любому из вариантов осуществления 1-94, где у субъекта нет поражения центральной нервной системы ММ, плазмаклеточного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема, синдрома POEMS (полинейропатии, органомегалии, эндокринопатии, моноклонального белка, изменений кожи) и/или клинически значимого амилоидоза.

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 BCMA-таргетную терапию, такую как анти-BCMA моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

98. Способ по любому из вариантов осуществления 1-97, дополнительно включающий получение образца лейкафереза 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 лейкафереза.

100. Способ по варианту осуществления 98 или 99, где субъект не получал

иммунодепрессивную терапию в течение 4 недель от лейкафереза, например, ингибитор кальциневрина, метотрексат или другие химиотерапевтические агенты, микофенолат, рапамицин, иммунодепрессивные антитела, такие как анти-TNF, анти- IL6 или анти-IL6R.

101. Способ по любому из вариантов осуществления 98-100, где субъекту не была проведена трансплантация аутологичных стволовых клеток в течение точно или примерно 6 месяцев до момента проведения лейкафереза.

102. Способ по любому из вариантов осуществления 1-101, где субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию.

103. Способ по любому из вариантов осуществления 1-102, где субъект не достиг объективного ответа (частичного ответа (PR) или лучше) в ответ на предшествующую терапию.

104. Способ по любому из вариантов осуществления 1-103, где субъект имеет или был идентифицирован как имеющий общее состояние по оценке Восточной объединенной онкологической группы (ECOG PS) 0 или 1.

105. Способ по любому из вариантов осуществления 1-104, где CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR-L1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:119;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108 соответственно;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1,

CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно; или

V_H, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119;

(b) спейсер, содержащий химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, которая необязательно имеет длину примерно 228 аминокислот; или спейсер, представленный в SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, необязательно, трансмембранный домен CD28 человека; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ), и костимулирующую сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клетки или ее сигнальную часть.

106. Способ по варианту осуществления 105, где V_H представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; и V_L представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119.

107. Способ по варианту осуществления 105 или 106, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv.

108. Способ по любому из вариантов осуществления, 105-107, где V_H и V_L соединены гибким линкером.

109. Способ по варианту осуществления 108, где scFv содержит линкер, содержащий аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1).

110. Способ по любому из вариантов осуществления 105-109, где V_H является карбокси-концевой к V_L.

111. Способ по любому из вариантов осуществления 105-110, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114 или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:114.

112. Способ по любому из вариантов осуществления 105-111, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114.

113. Способ по любому из вариантов осуществления 105-112, где нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержит (a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:113; (b) нуклеотидную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с ней; или (c)

вырожденную последовательность (a) или (b).

114. Способ по любому из вариантов осуществления 105-113, где нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:115.

115. Способ по любому из вариантов осуществления 105-114, где V_H является амино-концевой к V_L.

116. Способ по любому из вариантов осуществления 105-115, где цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143.

117. Способ по любому из вариантов осуществления 105-116, где костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

118. Способ по любому из вариантов осуществления 105-117, где костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB, необязательно, 4-1BB человека.

119. Способ по любому из вариантов осуществления 105-118, где костимулирующая сигнальная область представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4.

120. Способ по любому из вариантов осуществления 105-119, где костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом цепи CD3-дзета (CD3ζ).

121. Способ по любому из вариантов осуществления 105-120, где трансмембранный домен представляет собой или содержит трансмембранный домен CD28 человека.

122. Способ по любому из вариантов осуществления 105-121, где трансмембранный домен представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138.

123. Способ по любому из вариантов осуществления 105-122, где CAR содержит от своего N конца к C концу, по порядку: внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

124. Способ по любому из вариантов осуществления 105-123, где CAR содержит:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR-L1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2) и определяющую комплементарность легкую цепь область 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:119;

(b) спейсер, содержащий модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4 длиной примерно 228 аминокислот;

(c) трансмембранный домен CD28 человека; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ), и костимулирующую сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

125. Способ по варианту осуществления 124, где CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:114, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:114;

(b) спейсер, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:174, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматическую сигнальную область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, содержащую последовательность из SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4.

126. Способ по варианту осуществления 124 или 125, где CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность,

представленную в SEQ ID NO:114;

(b) спейсер, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматическую сигнальную область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 124-126, где CAR содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:19.

128. Способ по любому из вариантов осуществления 1-127, где после экспрессии полинуклеотида, кодирующего CAR, в клетке человека, необязательно Т-клетке человека, транскрибируемая РНК, необязательно матричная РНК (мРНК) из полинуклеотида демонстрирует, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% гомогенность РНК.

129. Способ по любому из вариантов осуществления 1-128, где CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с ней.

130. Способ по любому из вариантов осуществления 1-129, где CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, содержащей последовательность, представленную в SEQ ID NO:13.

131. Способ по любому из вариантов осуществления 1-130, где связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена и/или CAR, или показатель, указывающий на функцию или активность CAR после воздействия на клетки, экспрессирующие поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или шеддинговой формы BCMA.

132. Способ по варианту осуществления 131, где концентрация или количество растворимой или шеддинговой формы BCMA соответствует концентрации или количеству, присутствующему в сыворотке или крови или плазме субъекта или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов с множественной миеломой или при концентрации или количестве растворимого или шеддингового BCMA, при которых связывание или показатель снижен или заблокирован, или по существу снижен или заблокирован, для клеток, экспрессирующих эталонный анти-BCMA рекомбинантный рецептор, необязательно эталонный анти-BCMA CAR, в том же анализе.

133. Способ по любому из вариантов осуществления 1-132, где перед введением субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м^2 поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 30 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней, и/или циклофосфамид в дозе точно или примерно 200-400 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 300 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 1-133, где перед введением субъект получал противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м^2 поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 30 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней.

135. Способ по любому из вариантов осуществления 1-134, где перед введением субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение циклофосфамида в дозе точно или примерно 200-400 мг/м^2 поверхности тела субъекта, необязательно, в дозе точно или примерно 300 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней.

136. Способ по любому из вариантов осуществления 1-135, где субъект получал противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, ежедневно, и циклофосфамида в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, ежедневно, в течение 3 дней.

137. Способ по любому из вариантов осуществления 1-136, где способ способен обеспечить определенный ответ или исход, необязательно, в указанный момент времени после начала введения, по меньшей мере, у одного из или у, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или по меньшей мере, 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих заболевание или нарушение, где:

ответ выбирают из группы, состоящей из объективного ответа (OR), полного ответа (CR), строгого полного ответа (sCR), очень хорошего частичного ответа (VGPR), частичного ответа (PR) и минимального ответа (MR);

ответ или исход представляет собой OR; и/или

ответ или исход представляет собой или содержит CR.

138. Способ согласно варианту осуществления 137, где когорта субъектов имеет, по меньшей мере, такое же количество предшествующих терапий, прогноз или прогностический фактор, подтип, вторичное поражение или другую указанную характеристику или характеристики пациента, что и субъект, которого лечили данным

способом.

139. Способ по варианту осуществления 137 или 138, где ответ или исход является устойчивым более чем в течение точно или примерно 3, 6, 9 или 12 месяцев.

140. Способ по любому из вариантов осуществления 137-139, где ответ или исход, определенный через точно или примерно 3, 6, 9 или 12 месяцев после указанного момента времени, равен или лучше по сравнению с ответом или результатом, определенным в указанный момент времени.

141. Способ по любому из вариантов осуществления 137-140, где ответ или исход представляет собой или включает или дополнительно включает отсутствие нейротоксичности, отсутствие синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или отсутствие синдрома активации макрофагов/гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза. (MAS/HLH).

142. Способ по любому из вариантов осуществления 1-141, где способ не приводит к определенному исходу токсичности, необязательно, в указанный момент времени после начала введения, по меньшей мере, у одного из или у, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или, по меньшей мере, 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих заболевание или нарушение.

143. Способ согласно варианту осуществления 142, где указанным исходом токсичности является нейротоксичность, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдром активации макрофагов/гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (MAS/HLH).

144. Способ по варианту осуществления 142 или 143, где указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность, и нейротоксичность не возникает, по меньшей мере, у 60%, 70% или 80% субъектов в когорте.

145. Способ по любому из вариантов осуществления 142-144, где указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность 3 степени или выше или нейротоксичность 4 степени или выше.

146. Способ по любому из вариантов осуществления 142-145, где указанный исход токсичности представляет собой нейротоксичность 3 степени или выше, и нейротоксичность 3 степени или выше не возникает у, по меньшей мере, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов в когорте.

147. Способ согласно варианту осуществления 142 или 143, где указанный исход токсичности представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно 3 степени или выше, или синдром высвобождения цитокинов (CRS) 4 степени или выше.

148. Способ по варианту осуществления 147, где CRS не возникает у, по меньшей мере, 15%, 20%, 25% или 30% субъектов в когорте.

149. Способ по любому из вариантов осуществления 137-148, где указанный момент времени составляет точно или примерно 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев или 12 месяцев после начала введения.

150. Способ по любому из вариантов осуществления 1-149, где композицию клеток вводят парентерально, необязательно, внутривенно.

151. Способ по любому из вариантов осуществления 1-150, где субъектом является человек.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 1-151, где композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, получают с помощью производственного процесса, включающего воздействие на входную 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.

153. Способ по варианту осуществления 152, где производственный процесс дополнительно включает введение в Т-клетки стимулируемой популяции гетерологичного полинуклеотида, кодирующего CAR, который направленно воздействует на BCMA, тем самым создавая популяцию трансформированных клеток.

154. Способ по варианту осуществления 153, где производственный процесс дополнительно включает инкубацию популяции трансформированных клеток в течение до 96 часов.

155. Способ по варианту осуществления 154, где инкубацию проводят в минимальных средах, не содержащих один или несколько рекомбинантных цитокинов.

156. Способ по варианту осуществления 154 или 155, где производственный процесс дополнительно включает сбор Т-клеток трансформированной популяции с получением, таким образом, композиции конструированных клеток.

157. Способ по варианту осуществления 156, где сбор проводят в период между 24 и 120 часами, включительно, после начала воздействия стимулирующим реагентом.

158. Способ по варианту осуществления 156 или 157, где сбор проводят в период между 48 и 120 часами, включительно, после начала воздействия стимулирующим

реагентом.

159. Способ по любому из вариантов осуществления 156-158, где сбор проводят в момент обнаружения интегрированного вектора в геноме, но до достижения стабильного интегрированного числа копий вектора (iVCN) на диплоидный геном.

160. Способ по любому из вариантов осуществления 156-159, 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.

161. Способ по варианту осуществления 160, 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.

162. Способ по любому из вариантов осуществления 156-161, 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.

163. Способ по любому из вариантов осуществления 156-162, 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.

164. Способ по любому из вариантов осуществления 1-163, где клетки входной 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 B- 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+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+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%.

165. Способ по варианту осуществления 164, где входная 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 он проводится среди множества различных отдельных субъектов.

166. Способ по любому из вариантов осуществления 152-165, где композиция, содержащая генетически модифицированные клетки, не содержит остаточные микроносители после производственного процесса.

167. Способ по любому из вариантов осуществления 1-166, где ММ представляет собой рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению множественную миелому (r/r ММ).

168. Готовое изделие, содержащее композицию, содержащую генетически сконструированные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на BCMA, и инструкции по введению композиции клеток в соответствии со способом по любому из вариантов осуществления 1-167.

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-BCMA 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 демонстрировать 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 BCMA-таргетные CAR терапевтические Т-клеточные композиции оценивают на фенотип и активность.

Все процессы, включая конструирование Т-клеток с одним и тем же BCMA-таргетным CAR. CAR содержит связывающий домен scFv, спейсер, полученный из IgG, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, включающую, подряд, эндодомен 4-1BB и эндодомены CD3-дзета. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая анти-BCMA CAR, не включает идентифицированные потенциальные криптические донорные и акцепторные сайты сплайсинга. Вирусный вектор дополнительно

содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит суррогатным маркером экспрессии CAR; отделенный от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A.

A. Создание BCMA-таргетных CAR T-клеточных композиций.

В процессе A без размножения, образцы для лейкафереза собирают у доноров-людей, промывают и подвергают иммуноаффинной селекции на CD4+ и CD8+ T-клеточные композиции. После селекции, отдельные CD4+ и CD8+ T-клеточные композиции криозамораживают и затем размораживают и смешивают в приблизительном соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ T-клеток к жизнеспособным CD8+ T-клеткам (примерно $300x10^6$ CD4+ и $300x10^6$ 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-BCMA 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 B без размножения, образцы для лейкафереза 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+ T-клеточные композиции смешивают до $900x10^6$ всего жизнеспособных CD4+ и CD8+ T-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-BCMA 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, отдельные композиции CD4+ и CD8+ клеток селектируют из образцов человеческого лейкафереза и подвергают криозамораживанию. Выбранные клеточные композиции затем размораживают и смешивают в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам. Приблизительно $300x10^6$ Т-клеток ($150x10^6$ CD4 и $150x10^6$ CD8+ Т-клеток) смешанной композиции стимулируют в присутствии парамагнитных микроносителей с полистироловым покрытием с прикрепленными анти-CD3 и анти-CD28 антителами при соотношении микроносителей к клеткам 1:1 в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15, в течение от 18 до 30 часов. После инкубации, приблизительно $100x10^6$ жизнеспособных клеток из стимулированной клеточной композиции концентрируют в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Клетки трансдуцируют центрифужной инокуляцией при приблизительно 1600 g в течение 60 минут, с лентивирусным вектором, кодирующим анти-BCMA CAR. После центрифужной инокуляции клетки ресуспендируют в бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15, и инкубируют в течение примерно 18-30 часов при температуре примерно 37°C. Затем клетки культивируют для размножения путем переноса в биореактор (например, биореактор с качающимся движением) примерно в 500 мл бессывороточной среды, содержащей удвоенную концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15, как это используется во время стадий инкубации и трансдукции. Когда достигается заданная плотность жизнеспособных клеток, начинают перфузию, где среду заменяют полунепрерывной перфузией с непрерывным перемешиванием. На следующий день клетки культивируют в биореакторе до тех пор, пока не достигают пороговой плотности клеток примерно $3x10^6$ клеток/мл, что обычно происходит в процессе, включающем 6-7 дней размножения. Анти-CD3 и анти-CD28-антитела, конъюгированные с парамагнитными микроносителями, удаляют из клеточной композиции под действием магнитного поля. Затем клетки собирают, составляют и подвергают криозащите.

B. Чистота сконструированных Т-клеточных композиций.

Т-клеточные композиции, полученные в результате процессов конструирования без размножения, окрашивают антителами, распознающими поверхностные маркеры, включая CD3, маркер NK-клеток и BCMA, 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 NK-клеток и CD19+ клеток.

C. 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. 5B,** 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. 5C,** 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).

F. 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-BCMA 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 лейкафереза от одного здорового донора (HD1) или 3 пациентов с множественной миеломой (MM1, MM2 или MM3), и осуществляют производственные циклы для конструирования Т-клеток с анти-BCMA CAR с использованием процесса без размножения, по существу, как описано для процесса А в примере 1. Композиции сконструированных Т-клеток сравнивают с композициями Т-клеток, полученными в процессе соответствующего донора с использованием процесса с размножением, как описано в примере 1. CAR содержит связывающий домен scFv, спейсер, полученный из IgG, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, включающую, подряд, эндодомен 4-1BB и эндодомены CD3 дзета. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая анти-BCMA CAR, не включает идентифицированные потенциальные криптические донорные и акцепторные сайты сплайсинга. 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.

Анализируют клетки из сконструированных Т-клеточных композиций, полученных от подходящих доноров с помощью способов без размножения и с размножением. В частности, анти-BCMA CAR-Т-клеточные продукты оценивают с помощью проточной цитометрии на поверхностные маркеры, включая CD4, CD8, CCR7, CD45RA, и на CAR (суррогатный маркер+ или анти-идиотип+). Клетки гейтируют на живых CD3+ клетках, которые являются дважды положительными по экспрессии CAR. Клетки CD3+CAR+ затем гейтируют либо как CD4+ клетки (**ФИГ.7**, верхняя панель), либо как CD8+ клетки (**ФИГ.7**, нижняя панель) перед субтипированием памяти. Клеточные композиции, полученные с использованием процесса без размножения, демонстрируют более высокие доли Т-клеток, подобных наивным и центральных памяти, и более низкие доли подтипов эффекторной памяти по сравнению с клеточными композициями, полученными с использованием процесса с размножением.

2) Пролиферативная способность.

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 10 дней в присутствии микроносителей, конъюгированных с агонистическим анти-идиотипическим антителом против анти-BCMA CAR для получения CAR-зависимого стимула. Этот анализ имитирует приспособленность и способность клеток выживать при длительном воздействии антигена, что может происходить in vivo при введении. Пролиферативную способность оценивают после долговременной CAR-зависимой стимуляции, и каждые 2 дня определяют общее количество живых клеток (**ФИГ. 8A-8C**). Не трансдуцированные (ложные) CD3+ Т-клетки человека от MM1 или от MM3 включают в качестве отрицательного контроля. Клетки из анти-BCMA клеточных продуктов без размножения демонстрируют по существу повышенную пролиферативную способность (в среднем в 2-7 раз) по сравнению со сконструированными клетками в клеточном продукте с размножением соответствующего донора. Эти результаты согласуются с наблюдением, что клеточные продукты без размножения 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) Продуцирование цитокинов

Композиции сконструированных CAR-T-клеток из процесса без размножения или с размножением перед длительной стимуляцией инкубируют на связанном с планшетом анти-ID в течение 5 часов. Внутриклеточное продуцирование цитокинов IL-2, IFNγ или TNF измеряют с помощью проточной цитометрии. Частоту CAR+ клеток, экспрессирующих один цитокин, определяют в популяциях CD4+CAR+ или CD8+CAR+. Секрецию белка цитокинов измеряют с помощью количественного определения концентрации секретируемых цитокинов с помощью мультиплексного иммуноанализа после культивирования клеток в течение 24 часов с MM.1S BCMA-положительными клетками-мишенями.

Продуцирование цитокинов анти-BCMA CAR-T-клетками, полученными в процессах как без размножения, так и с размножением, является устойчивым и наблюдается в CAR+, но не в CAR-отрицательных клетках (**ФИГ. 9A-9C,** CAR-отрицательные данные не показаны). Клетки, полученные в результате процесса без размножения, имеют тенденцию быть более полифункциональными, с большей долей клеток, одновременно продуцирующих IL-2, IFNγ и TNFα. Как показано на **ФИГ. 9D,** доля клеток CAR+CD8+ в продукте процесса без размножения, которые одновременно продуцируют IL-2, IFNγ и TNFα, значительно выше, чем доля клеток CAR+CD8+ в продукте процесса с размножением. Клетки в продукте процесса без размножения продуцируют значительно большее количество секретируемых цитокиновых белков по сравнению с клетками в продукте процесса с размножением (**ФИГ. 9E**). В целом, эти результаты показывают, что не анти-BCMA CAR продукт процесса без размножения является более полифункциональным и продуцирует большее количество цитокина на клетку по сравнению с анти-BCMA CAR продуктом процесса с размножением в ответ на подачу сигналов через CAR.

4) Цитолитическая активность.

Композиции сконструированных CAR-T-клеток из процесса без размножения или с размножением перед длительной стимуляцией совместно культивируют с клетками-мишенями RPMI-8226/NLR, экспрессирующими NucLight Red (NLR), чтобы можно было отслеживать их под микроскопом, и цитотоксичность измеряют путем количественного определения с использованием непрерывной визуализации живых клеток. Сконструированные композиции CAR-T-клеток соответствующего донора, и клетки-мишени совместно культивируют при соотношении эффектора к клеткам-мишеням (E:T) 1:1 и 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 преобразовывают в площадь под кривой (AUC) для сравнения либо для отдельных доноров/процессов, либо для производственного процесса. В целом, сконструированные композиции CAR-T-клеток, полученные с использованием процесса без размножения, проявляют сходную цитолитическую активность по сравнению с композициями Т-клеток, полученными с использованием процесса с размножением, в расчете на клетку (**ФИГ. 10A-10B**).

Пример 3: Противоопухолевая активность in vivo Т-клеточных композиций, полученных с использованием процессов без размножения.

Анти-BCMA CAR-T-клеточные композиции, полученные в результате процессов конструирования без размножения и с размножением соответствующих доноров, оценивают на модели ксенотрансплантата опухоли миеломы у мышей OPM-2. Мышам NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*IL-2rg*^{tm1Wjl}/SzJ с ослабленным иммунитетом вводят внутривенно 2,0x10^5 клеток миеломы OPM-2 люциферазы светлячка-зеленого флуоресцентного белка (FfLuc-GFP), и через 13 дней мышей произвольно распределяют на группы для баланса опухолевой массы. На следующий день мышам внутривенно вводят совместимые с донором жизнеспособные анти-BCMA CAR CD3+ Т-клетки человека в количестве 1,0x10^6 (высокая доза) или 0,25x10^6 клеток (низкая доза) клеток на мышь (n = 8 мышей в группе). Контрольные мыши не получают лечение (только опухоль, пунктирные линии; n = 10 мышей). Рост диссеминированной опухоли оценивают с помощью визуализации OPM-2 FfLuc-положительных BLI. Изменения яркости BLI (p/s; ось y) показаны для всех групп (опухолевая масса) (**ФИГ. 11A**), и рост опухоли с 1 по 53 день показан на графиках до и после, рассчитанных из AUC для каждой группы (**ФИГ. 11B**). Различия сравнивают с помощью U-критерия Манна-Уитни; *p <0,05.

У мышей, леченных высокими дозами продуктов процесса без размножения, наблюдается полная регрессия опухоли ниже исходного уровня, которая сохраняется в течение, по меньшей мере, 53 дней; тогда как у мышей, леченных продуктами процесса с размножением соответствующего донора, наблюдается начальное подавление роста опухоли ниже исходного уровня, которое не является устойчивым, где опухолевая масса увеличивается до уровня выше исходного примерно на 20 день после лечения (**ФИГ. 11A,** левая панель).

У мышей, леченных низкой дозой продуктов процесса с размножением, наблюдается умеренное временное снижение опухолевой массы по сравнению с не леченными контрольными мышами (только опухоль), что указывает на то, что продукты

процесса с размножением активны при такой низкой дозе. Напротив, регрессия опухоли ниже исходного уровня наблюдается у мышей с ксенотрансплантатом OPM-2, которым вводят низкие дозы продуктов процесса без размножения соответствующих доноров от доноров HD1, MM2 и MM3 (**ФИГ. 11B,** правая панель).

Кровь собирают у половины мышей на 4 и 17 день, и у половины мышей на 10 и 24 день после лечения CAR T-клетками. Циркулирующие CAR T-клетки количественно определяют с помощью проточной цитометрии для оценки потенциала размножения продуктов процесса без размножения. В частности, клетки крови анализируют с помощью проточной цитометрии для идентификации CAR-специфичных CD3+ T-клеток человека, и количество клеток рассчитывают на микролитр крови для отдельных мышей. Количество циркулирующих CAR T-клеток в группе, получавшей продукты процесса с размножением, выше на 4 день после лечения по сравнению с количеством продуктов процесса без размножения, как в группах с низкими дозами, так и в группах с высокими дозами (**ФИГ. 12A-12B**). Однако после 4 дня, в группах, получавших продукт процесса без размножения, наблюдается большее размножение CAR T-клеток in vivo, в среднем, приблизительно в 10 раз выше, по сравнению с группами, получавшими продукт процесса с размножением (**ФИГ. 12B,** без размножения, CB; с размножением, E). Взятые вместе, эти данные in vivo согласуются с большей пролиферативной способностью и эффективностью CAR-T-клеток композиций с процессом без размножения, что может быть показателем усиленной противоопухолевой активности у людей.

Пример 4: Введение анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей и/или не поддающейся лечению множественной миеломой.

T-клеточные композиции, экспрессирующие химерный антиген-рецептор (CAR), содержащие аутологичные T-клетки, экспрессирующие CAR, специфичный в отношении антигена созревания B-клеток (BCMA), вводят людям с рецидивирующей и/или не поддающейся лечению множественной миеломой (MM).

Композиции, содержащие аутологичные T-клетки, сконструированные для экспрессии типового CAR, специфичного для BCMA, вводят взрослым людям с рецидивирующей или не поддающейся лечению (R/R) множественной миеломой (MM), которые ранее получали 3 или более курсов лечения против миеломы.

Вводимые анти-BCMA CAR-экспрессирующие терапевтические T-клеточные композиции создают с помощью процесса, разработанного для получения CAR T-клеточного продукта с фенотипическим профилем, содержащим высокую долю менее дифференцированных типов клеток, что может повлиять на клинический ответ и устойчивость ответа. Процесс включает основанное на иммуноаффинности (например,

иммуномагнитной селекции) обогащение $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток из предварительно криоконсервированных образцов лейкафереза от отдельных субъектов, подлежащих лечению. Выделенные $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки смешивают и подвергают стимуляции с использованием анти-CD3/анти-CD28 Fab-конъюгированных олигомерных реагентов мутеина стрептавидина с последующей трансдукцией стимулированной композиции вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), кодирующим анти-BCMA CAR. CAR содержит домен связывания scFv, спейсер, полученный из IgG, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, включающую, подряд, эндодомен 4-1BB и эндодомены CD3 дзета. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая анти-BCMA CAR, не включает идентифицированные потенциальные криптические донорные и акцепторные сайты сплайсинга.

Этот процесс не включает последующую стадию размножения трансдуцированных клеток и, как правило, короче, чем процесс, который включает размножение трансдуцированных клеток. Клетки собирают примерно через 4 дня после начала стимуляции, и затем добавляли криопротектор. В результате процесса получают клеточную композицию, обогащенную фенотипом центральной памяти по сравнению с исходными образцами и клеточными композициями, полученными с использованием производственного процесса, который включает стадию культивирования, направленную на размножение трансдуцированных клеток.

Субъект получил противолимфомную химиотерапию (LDC) флударабином (flu, 30 мг/м^2/день) в/в и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м^2/день) в/в в течение 3 дней до инфузии CAR-T. LDC вводят в -5, -4 и -3 дни перед инфузией.

Криоконсервированные клеточные композиции размораживают у постели больного перед внутривенным введением, при этом день инфузии обозначают как 1 день (от 2 до 9 дней после завершения LDC). В 1 день субъектам вводят дозу Т-клеток, экспрессирующих CAR из расчета $20x10^6$ CAR+ Т-клеток или $40x10^6$ всего CAR+ Т-клеток. В исследовании рассматривается дозирование субъектов одним из следующих дополнительных уровней дозы: $60x10^6$ всего CAR+ Т-клеток или $80x10^6$ всего CAR+ Т-клеток. Каждая доза содержит CD3+CAR+ Т-клетки (≥80% CD3+ клеток; ≥10% CD3+CAR+ клеток).

Оценка эффективности включает лабораторные исследования, оценку EMP (клиническое обследование или ПЭТ, КТ или МРТ), исследование скелета, биопсию и аспирацию костного мозга. Ответ на заболевание оценивают с использованием «Единых критериев ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG)» (Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346).

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	GGGGSGGGGSGGGGS	$(4GS)_3$ линкер (ак)
2	GGGS	3GS линкер (ак)
3	gctgagagtcaagttttccaggtccgccgacgctccagcct	4-1BB/CD3 дзета спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
4	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB-полученная внутриклеточная последовательность совместной подачи сигнала (ак)
5	aagcgggggagaaagaaactgctgtatattttcaaacagcctttatgagacctgtgcagactacccaggaggaagacggatgcagctgtaggtttcccgaggaagaggaaggaggctgtgagctg	4-1BB-полученная внутриклеточная последовательность совместной подачи сигнала (нт)

6	aagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgc agaccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcg gctgcgagctg	4-1BB-полученная внутриклеточная последовательность совместной подачи сигнала (нт)
7	GGGGS	4GS линкер (ак)
8	gaatctaagtacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgt gttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtgac ctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtgg acggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagttccagagc acctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaag agtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctc caaggccaagggccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaaga ggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccg atatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacac ctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatc aagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaa ccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag	Альтернативный CO/SSE спейсер (нт)
9	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctccctgag gctgtcttgcgcagccagcggcttcacctttagcgactactatatgtcctggatcagacag gcacctggcaagggcctggagtgggtgagctacatcagctcctctggctccacaatcta ctatgccgactctgtgaagggccggtttaccatcagcagagataacgccaagaattccct gtatctgcagatgaacagcctgagggccgaggacacagccgtgtactattgcgccaag gtggacggcgattacaccgaggattattggggccagggcacactggtgaccgtgagct ccggcggcggcggctctggaggaggaggcagcggcggaggaggctcccagtctgc cctgacacagccagccagcgtgtccggctctcccggacagtccatcacaatctcttgtac cggctctagctccgacgtgggcaagtacaacctggtgtcctggtatcagcagcccctg gcaaggcccctaagctgatcatctacgatgtgaacaagaggccatctggcgtgagcaat cgcttcagcggctccaagtctggcaataccgccacactgaccatcagcggcctgcagg gcgacgatgaggcagattactattgttctagctacggcggcagcagatcctacgtgttcg gcacaggcaccaaggtgaccgtgctggaatctaagtacggaccgccttgtcctccttgtc ccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctg	анти-BCMA CAR

	atgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcc cgaggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaag cctagagaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgca ccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcct agcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaagagagccccaggtt tacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcct ggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcct gagaacaactacaagaccacacctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtat agtagactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgt gatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggc aagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggtta ccgtggccttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaa gcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcctgcaga ttccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagtgaagttcagcagatccgcc gacgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtacaacgagctgaacctgggg agaagagaagagtacgacgtgctggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggc ggcaagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagac aagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggca agggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacg cactgcacatgcaggccctgccacctaga	
10	gaggtgcagctggtgcagagcggaggaggcctggtgcagcctggcaggtccctgcg cctgtcttgcaccgccagcggcttcacatttggcgactatgccatgtcctggttcaagcag gcaccaggcaagggcctggagtgggtgggctttatccgctctaaggcctacggcggca ccacagagtatgccgccagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacgactctaa gagcatcgcctacctgcagatgaactctctgaagaccgaggacacagccgtgtactatt gcgcagcatggagcgccccaaccgattattggggccagggcaccctggtgacagtga gctccggcggcggcggctctggaggaggaggaagcggaggaggaggatccgacat ccagatgacacagtcccctgcctttctgtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgac atgtcgcgcctcccagggcatctctaactacctggcctggtatcagcagaagcccggca atgcccctcggctgctgatctacagcgcctccaccctgcagagcggagtgccctcccg gttcagaggaaccggctatggcacagagttttctctgaccatcgacagcctgcagccag aggatttcgccacatactattgtcagcagtcttacaccagccggcagacatttggccccg gcacaagactggatatcaaggagtctaaatacggaccgccttgtcctccttgtcccgctc ctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatc agcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgagg	анти-BCMA CAR

	tgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctag agaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccag gattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctagca gcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaagagagccccaggtttaca cactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtc aagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgaga acaactacaagaccacacctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagta gactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgat gcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag atgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccg tggccttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaagca gcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattc cccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagtgaagttcagcagatccgccga cgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtacaacgagctgaacctggggag aagagaagagtacgacgtgctggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcg gcaagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagaca agatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaa gggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacgc actgcacatgcaggccctgccacctaga	
11	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctctctgagg ctgagctgcgcagcctccggcttcacctttttctgactactatatgagctggatcaggcagg caccaggcaagggcctggagtgggtgtcttacatcagctcctctggcagcacaatctact atgccgactccgtgaagggcaggttcaccatctctcgcgataacgccaagaatagcctg tatctgcagatgaactccctgcgggccgaggatacagccgtgtactattgcgccaaggt ggacggcccccctttcctttgatatctggggccagggcacaatggtgaccgtgagctccg gaggaggaggatccggcggaggaggctctggcggcggcggctctagctatgtgctga cccagccaccatccgtgtctgtggcacctggacagacagcaaggatcacctgtggagc aaacaatatcggcagcaagtccgtgcactggtaccagcagaagcctggccaggcccc aatgctggtggtgtatgacgatgacgatcggcccagcggcatccctgagagattttctgg cagcaactccggcaataccgccacactgaccatctctggagtggaggcaggcgacga ggcagattacttctgtcacctgtgggaccggagcagagatcactacgtgttcggcacag gcaccaagctgaccgtgctggaatctaagtacggaccgccttgtcctccttgtcccgctc ctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatc agcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgagg tgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctag	анти-BCMA CAR

	agaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccag gattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctagca gcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaagagagccccaggtttaca cactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtc aagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgaga acaactacaagaccacacctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagta gactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgat gcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag atgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccg tggccttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaagca gcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattc cccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagtgaagttcagcagatccgccga cgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtacaacgagctgaacctggggag aagagaagagtacgacgtgctggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcg gcaagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagaca agatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaa gggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacgc actgcacatgcaggccctgccacctaga	
12	agctatgagctgacacagcctccaagcgcctctggcacacctggacagcgagtgacaa tgagctgtagcggcaccagcagcaacatcggcagccacagcgtgaactggtatcagca gctgcctggcacagcccctaaactgctgatctacaccaacaaccagcggcctagcggc gtgcccgatagattttctggcagcaagagcggcacaagcgccagcctggctatttctgg actgcagagcgaggacgaggccgactattattgtgccgcctgggacggctctctgaac ggccttgtttttggcggaggcaccaagctgacagtgctgggatctagaggtggcggag gatctggcggcggaggaagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagc tggtgcagtctggcgccgaagtgaagaagcctggcgagagcctgaagatcagctgca aaggcagcggctacagcttcaccagctactggatcggctgggtccgacagatgcctgg caaaggccttgagtggatgggcatcatctaccccggcgacagcgacaccagatacagc cctagctttcagggccacgtgaccatcagcgccgacaagtctatcagcaccgcctacct gcagtggtccagcctgaaggcctctgacaccgccatgtactactgcgccagatactctg gcagcttcgacaattggggccagggcacactggtcaccgtgtccagcgagtctaaatac ggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcct ccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtgg tggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaa gtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagttccagagcacctacagagtg	анти-BCMA CAR

	gtgtccgtgctgacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgca aggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagg gccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgacca agaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtgg aatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctcctgtgctgga cagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaagatggcaaga gggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccag aaaagcctgagcctgtctctgggcaagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtg ctggcctgttacagcctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtcaagcggggca gaaagaagctgctctacatcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaa gaggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctg agagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccag ctgtacaacgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcgg agaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaagaggg cctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatg aagggcgagcgcagaagaggcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagca ccgccaccaaggatacctatgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	
13	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatcgccatc agctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccctggcaaggccc ctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcggcgtgtccaatagattcag cggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggccgagg acgaggccgattactactgcagcagcaacacccggtccagcacactggtttttggcgga ggcaccaagctgacagtgctgggatctagaggtggcggaggatctggcggcggagg aagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtctggcgcc gagatgaagaaacctggcgcctctctgaagctgagctgcaaggccagcggctacacct tcatcgactactacgtgtactggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatctatg ggctggatcaaccccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattccagggcaga gtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatggaactgagccggctg agatccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatctcagcgcgacggctacatgg attattggggccagggaaccctggtcaccgtgtccagcgagtctaaatacggaccgcct tgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagccta aggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcc caagaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacg ccaagaccaagcctagagaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgct gacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaac	анти-BCMA CAR

	aagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaaga gagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgt ccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagc aatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctcctgtgctggacagcgacggca gtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgtt cagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgag cctgtctctgggcaagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttac agcctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctg ctctacatcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagatgg ctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagtgaagttc agcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtacaacgag ctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcggagaggcagaga tcctgaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgag ctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcg cagaagaggcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaagg atacctatgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	
14	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatcgccatc agctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccctggcaaggccc ctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcggcgtgtccaatagattcag cggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggccgagg acgaggccgattactactgcagcagcaacacccggtccagcacactggtttttggcgga ggcaccaagctgacagtgctgggatctagaggtggcggaggatctggcggcggagg aagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtctggcgcc gagatgaagaaacctggcgcctctctgaagctgagctgcaaggccagcggctacacct tcatcgactactacgtgtactggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatctatg ggctggatcaaccccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattccagggcaga gtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatggaactgagccggctg agatccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatctcagcgcgacggctacatgg attattggggccagggaaccctggtcaccgtgtccagcgagtctaaatacggaccgcct tgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagccta aggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcc caagaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacg ccaagaccaagcctagagaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgct gacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaac aagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaaga	анти-BCMA CAR

	gagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgt ccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagc aatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctcctgtgctggacagcgacggca gtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgtt cagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgag cctgtctctgggcaagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttac agcctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtcaggagtaagaggagcaggctc ctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcatt accagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagc agatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtacaacgagctga acctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcggagaggcagagatcct gaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctg cagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcag aagaggcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggata cctatgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	
15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGDYTEDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSIT ISCTGSSSDVGKYNLVSWYQQPPGKAPKLIIYDVNKRPS GVSNRFSGSKSGNTATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGS RSYVFGTGTKVTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	анти-BCMA CAR
16	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFK QAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDD	анти-BCMA CAR

	SKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAWSAPTDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPAFLSASVGDR VTVTCRASQGISNYLAWYQQKPGNAPRLLIYSASTLQS GVPSRFRGTGYGTEFSLTIDSLQPEDFATYYCQQSYTSR QTFGPGTRLDIKESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	
17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGPPSFDIWGQGTMV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTAR ITCGANNIGSKSVHWYQQKPGQAPMLVVYDDDDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRD HYVFGTGTKLTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII FWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	анти-BCMA CAR
18	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWYQQ	анти-BCMA

	LPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL QSEDEADYYCAAWDGSLNGLVFGGGTKLTVLGSRGGG GSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTR YSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RYSGSFDNWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	CAR
19	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQHPGKA PKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGG SGGGGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGY TFIDYYVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQR DGYMDYWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	анти-BCMA CAR

20	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQHPGKA PKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGG SGGGGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGY TFIDYYVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQR DGYMDYWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	анти-BCMA CAR
21	YFDSL	BCMA эпитоп
22	TGSSSDVGKYNLVS	BCMA-23 CDR-L1 (ак)
23	DVNKRPS	BCMA-23 CDR-L2 (ак)
24	SSYGGSRSYV	BCMA-23 CDR-L3 (ак)
25	ggctgattattattgtagctcatatggaggtagtaggtctt	BCMA-23 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
26	ctactacatgagctggatccgccaggctccagggaaggggc	BCMA-23 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга

27	ctactatatgtcctggatcagacaggcacctggcaagggcc	BCMA-23 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
28	ggcagattactattgttctagctacggcggcagcagatcct	BCMA-23 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
29	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGDYTEDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSIT ISCTGSSSDVGKYNLVSWYQQPPGKAPKLIIYDVNKRPS GVSNRFSGSKSGNTATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGS RSYVFGTGTKVTVL	BCMA-23 scFv (ак)
30	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGAT CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTC ATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACGCA GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACA ACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAA AGTAGACGGAGACTACACAGAGGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGT TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAG TCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCC TGGACAGTCGATCACTATCTCCTGCACTGGAAGCAGC AGTGATGTTGGCAAATATAATCTTGTCTCCTGGTACC AACAGCCCCCAGGCAAAGCCCCCAAGCTCATAATTTA TGACGTCAATAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGC	BCMA-23 scFv (нт)

	TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCACCCTGA CAATCTCTGGGCTCCAGGGTGACGACGAGGCTGATTA TTATTGTAGCTCATATGGAGGTAGTAGGTCTTATGTC TTCGGAACTGGGACCAAGGTGACCGTCCTA	
31	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctccctgag gctgtcttgcgcagccagcggcttcacctttagcgactactatatgtcctggatcagacag gcacctggcaagggcctggagtgggtgagctacatcagctcctctggctccacaatcta ctatgccgactctgtgaagggccggtttaccatcagcagagataacgccaagaattccct gtatctgcagatgaacagcctgagggccgaggacacagccgtgtactattgcgccaag gtggacggcgattacaccgaggattattggggccagggcacactggtgaccgtgagct ccggcggcggcggctctggaggaggaggcagcggcggaggaggctcccagtctgc cctgacacagccagccagcgtgtccggctctcccggacagtccatcacaatctcttgtac cggctctagctccgacgtgggcaagtacaacctggtgtcctggtatcagcagcccccctg gcaaggcccctaagctgatcatctacgatgtgaacaagaggccatctggcgtgagcaat cgcttcagcggctccaagtctggcaataccgccacactgaccatcagcggcctgcagg gcgacgatgaggcagattactattgttctagctacggcggcagcagatcctacgtgttcg gcacaggcaccaaggtgaccgtgctg	BCMA-23 scFv (нт)
32	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGDYTEDYWGQGTL VTVSS	BCMA-23 V_H Цепь (ак)
33	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVSWYQ QPPGKAPKLIIYDVNKRPSGVSNRFSGSKSGNTATLTISG LQGDDEADYYCSSYGGSRSYVFGTGTKVTVL	BCMA-23 V_L Цепь (ак)
34	DYYMS	BCMA-23, -26 CDR-H1 (ак) нумерация Kabat
35	YISSSGSTIYYADSVKG	BCMA-23, -26 CDR-H2 (ак) нумерация Kabat
36	VDGDYTEDY	BCMA-23 CDR-H3 (ак)

37	DYAMS	BCMA-25 CDR-H1 (ак) нумерация Kabat
38	FIRSKAYGGTTEYAASVKG	BCMA-25 CDR-H2 (ак) нумерация Kabat
39	WSAPTDY	BCMA-25 CDR-H3 (ак)
40	RASQGISNYLA	BCMA-25 CDR-L1 (ак)
41	SASTLQS	BCMA-25 CDR-L2 (ак)
42	QQSYTSRQT	BCMA-25 CDR-L3 (ак)
43	ctatgccatgtcctggttcaggcaggcaccaggcaagggcc	BCMA-25 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
44	gtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgacatgtcgcg	BCMA-25 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
45	gtgggctttatccgctctaaggcctacggcggcaccacaga	BCMA-25 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
46	gtgacatgtcgcgcctcccagggcatctctaactacctggc	BCMA-25 спрогнозированный

		акцепторный сайт сплайсинга
47	tacagcgcctccaccctgcagagcggagtgccctcccggtt	BCMA-25 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
48	ctatgccatgtcctggttcaagcaggcaccaggcaagggcc	BCMA-25 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
49	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFR QAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDD SKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAWSAPTDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPAFLSASVGDR VTVTCRASQGISNYLAWYQQKPGNAPRLLIYSASTLQS GVPSRFRGTGYGTEFSLTIDSLQPEDFATYYCQQSYTSR QTFGPGTRLDIK	BCMA-25 scFv последовательность (ак)
50	gaggtgcagctggtgcagagcggaggaggcctggtgcagcctggcaggtccctgcg cctgtcttgcaccgccagcggcttcacatttggcgactatgccatgtcctggttcaggcag gcaccaggcaagggcctggagtgggtgggctttatccgctctaaggcctacggcggca ccacagagtatgccgccagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacgactctaa gagcatcgcctacctgcagatgaactctctgaagaccgaggacacagccgtgtactatt gcgcagcatggagcgccccaaccgattattggggccagggcaccctggtgacagtga gctccggcggcggcggctctggaggaggaggaagcggaggaggaggatccgacat ccagatgacacagtcccctgcctttctgtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgac atgtcgcgcctcccagggcatctctaactacctggcctggtatcagcagaagcccggca atgcccctcggctgctgatctacagcgcctccaccctgcagagcggagtgccctcccg gttcagaggaaccggctatggcacagagttttctctgaccatcgacagcctgcagccag aggatttcgccacatactattgtcagcagtcttacaccagccggcagacatttggccccg gcacaagactggatatcaag	BCMA-25 scFv (нт)
51	gaggtgcagctggtgcagagcggaggaggcctggtgcagcctggcaggtccctgcg cctgtcttgcaccgccagcggcttcacatttggcgactatgccatgtcctggttcaagcag	BCMA-25 scFv (нт) (O/SSE)

	gcaccaggcaagggcctggagtgggtgggctttatccgctctaaggcctacggcggca ccacagagtatgccgccagcgtgaagggccggttcaccatcagccgggacgactctaa gagcatcgcctacctgcagatgaactctctgaagaccgaggacacagccgtgtactatt gcgcagcatggagcgccccaaccgattattggggccagggcaccctggtgacagtga gctccggcggcggcggctctggaggaggaggaagcggaggaggaggatccgacat ccagatgacacagtcccctgcctttctgtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgac atgtcgcgcctcccagggcatctctaactacctggcctggtatcagcagaagcccggca atgcccctcggctgctgatctacagcgcctccaccctgcagagcggagtgccctcccg gttcagaggaaccggctatggcacagagttttctctgaccatcgacagcctgcagccag aggatttcgccacatactattgtcagcagtcttacaccagccggcagacatttggccccg gcacaagactggatatcaag	
52	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFR QAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDD SKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAWSAPTDYWGQGTL VTVSS	BCMA-25 VH цепь (ак)
53	DIQMTQSPAFLSASVGDRVTVTCRASQGISNYLAWYQQ KPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYGTEFSLTIDSL QPEDFATYYCQQSYTSRQTFGPGTRLDIK	BCMA-25 VL цепь (ак)
54	VDGPPSFDI	BCMA-26 CDR-H3 (ак)
55	GANNIGSKSVH	BCMA-26 CDR-L1 (ак)
56	DDDDRPS	BCMA-26 CDR-L2 (ак)
57	HLWDRSRDHYV	BCMA-26 CDR-L3 (ак)
58	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGPPSFDIWGQGTMV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTAR ITCGANNIGSKSVHWYQQKPGQAPMLVVYDDDDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRD HYVFGTGTKLTVL	BCMA-26 scFv последовательность (ак)
59	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctctctgagg	BCMA-26 scFv

	ctgagctgcgcagcctccggcttcacctttctgactactatatgagctggatcaggcagg caccaggcaagggcctggagtgggtgtcttacatcagctcctctggcagcacaatctact atgccgactccgtgaagggcaggttcaccatctctcgcgataacgccaagaatagcctg tatctgcagatgaactccctgcgggccgaggatacagccgtgtactattgcgccaaggt ggacggcccccctccttttgatatctggggccagggcacaatggtgaccgtgagctccg gaggaggaggatccggcggaggaggctctggcggcggcggctctagctatgtgctga cccagccaccatccgtgtctgtggcacctggacagacagcaaggatcacctgtggagc aaacaatatcggcagcaagtccgtgcactggtaccagcagaagcctggccaggcccc aatgctggtggtgtatgacgatgacgatcggcccagcggcatccctgagagattttctgg cagcaactccggcaataccgccacactgaccatctctggagtggaggcaggcgacga ggcagattacttctgtcacctgtgggaccggagcagagatcactacgtgttcggcacag gcaccaagctgaccgtgctg	(нт)
60	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctctctgagg ctgagctgcgcagcctccggcttcacctttctgactactatatgagctggatcaggcagg caccaggcaagggcctggagtgggtgtcttacatcagctcctctggcagcacaatctact atgccgactccgtgaagggcaggttcaccatctctcgcgataacgccaagaatagcctg tatctgcagatgaactccctgcgggccgaggatacagccgtgtactattgcgccaaggt ggacggcccccctccttttgatatctggggccagggcacaatggtgaccgtgagctccg gaggaggaggatccggcggaggaggctctggcggcggcggctctagctatgtgctga cccagccaccatccgtgtctgtggcacctggacagacagcaaggatcacctgtggagc aaacaatatcggcagcaagtccgtgcactggtaccagcagaagcctggccaggcccc aatgctggtggtgtatgacgatgacgatcggcccagcggcatccctgagagattttctgg cagcaactccggcaataccgccacactgaccatctctggagtggaggcaggcgacga ggcagattacttctgtcacctgtgggaccggagcagagatcactacgtgttcggcacag gcaccaagctgaccgtgctg	BCMA-26 scFv (нт) (O/SSE)
61	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGPPSFDIWGQGTMV TVSS	BCMA-26 V_H Цепь (ак)
62	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHWYQQK PGQAPMLVVYDDDDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGV EAGDEADYFCHLWDRSRDHYVFGTGTKLTVL	BCMA-26 VL цепь (ак)
63	GYSFTSYW	BCMA-52 CDR-H1 (ак)
64	GYSFTSYWIG	BCMA-52 CDR-

		H1 (ак) - нумерация AbM
65	GYSFTSY	BCMA-52 CDR-H1 (ак) - нумерация Chothia
66	SYWIG	BCMA-52 CDR-H1 (ак) - нумерация Kabat
67	IYPGDSDT	BCMA-52 CDR-H2 (ак)
68	IIYPGDSDTR	BCMA-52 CDR-H2 (ак) - нумерация AbM
69	YPGDSD	BCMA-52 CDR-H2 (ак) - нумерация Chothia
70	IIYPGDSDTRYSPSFQG	BCMA-52 CDR-H2 (ак) - нумерация Kabat
71	ARYSGSFDN	BCMA-52 CDR-H3 (ак)
72	YSGSFDN	BCMA-52 CDR-H3 (ак) - нумерация Kabat, Chothia и AbM
73	SSNIGSHS	BCMA-52 CDR-L1 (ак)
74	SGTSSNIGSHSVN	BCMA-52 CDR-L1 (ак) -

		нумерация Kabat, Chothia и AbM
75	TNN	BCMA-52 CDR-L2 (ак)
76	TNNQRPS	BCMA-52 CDR-L2 (ак) - Kabat, Chothia, and нумерация AbM
77	AAWDGSLNGLV	BCMA-52 CDR-L3 (ак) - нумерация Kabat, Chothia и AbM
78	ctggccatcagtggcctccagtctgaggatgaggctgatta	BCMA-52 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
79	agatacagcccgtccttccaaggccacgtcaccatctcagc	BCMA-52 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
80	ctggctatttctggactgcagagcgaggacgaggccgacta	BCMA-52 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
81	agatacagccctagctttcagggccacgtgaccatcagcgc	BCMA-52 спрогнозированный акцепторный

		сайт сплайсинга (O/SSE)
82	tcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcacca tgtcttgttctggaaccagctccaacatcggaagtcactctgtaaactggtaccagcagct cccaggaacggcccccaaactcctcatctatactaataatcagcggccctcaggggtcc ctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggcctcc agtctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatggcagcctgaatggtctgg tattcggcggagggaccaagctgaccgtcctaggttctagaggtggtggtggtagcggc ggcggcggctctggtggtggtggatccctcgagatggccgaggtgcagctggtgcagt ctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaagatctcctgtaagggttctgga tacagctttaccagctactggatcggctgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctgg agtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccagatacagcccgtccttccaag gccacgtcaccatctcagctgacaagtccatcagcactgcctacctgcagtggagcagc ctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgcgctactctggttctttcgataactg gggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca	BCMA-52 scFv
83	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWYQQ LPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL QSEDEADYYCAAWDGSLNGLVFGGGTKLTVLGSRGGG GSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTR YSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RYSGSFDNWGQGTLVTVSS	BCMA-52 scFv (ак)
84	agctatgagctgacacagcctccaagcgcctctggcacacctggacagcgagtgacaa tgagctgtagcggcaccagcagcaacatcggcagccacagcgtgaactggtatcagca gctgcctggcacagcccctaaactgctgatctacaccaacaaccagcggcctagcggc gtgcccgatagattttctggcagcaagagcggcacaagcgccagcctggctatttctgg actgcagagcgaggacgaggccgactattattgtgccgcctgggacggctctctgaac ggccttgtttttggcggaggcaccaagctgacagtgctgggatctagaggtggcggag gatctggcggcggaggaagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagc tggtgcagtctggcgccgaagtgaagaagcctggcgagagcctgaagatcagctgca aaggcagcggctacagcttcaccagctactggatcggctgggtccgacagatgcctgg caaaggccttgagtggatgggcatcatctaccccggcgacagcgacaccagatacagc cctagctttcagggccacgtgaccatcagcgccgacaagtctatcagcaccgcctacct gcagtggtccagcctgaaggcctctgacaccgccatgtactactgcgccagatactctg gcagcttcgacaattggggccagggcacactggtcaccgtgtccagc	BCMA-52 scFv (нт) (O/SSE)

85	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGHVTISADKSIS TAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGSFDNWGQGTLVT VSS	BCMA-52 VH цепь (ак)
86	gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaag atctcctgtaagggttctggatacagctttaccagctactggatcggctgggtgcgccag atgcccgggaaaggcctggagtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccag atacagcccgtccttccaaggccacgtcaccatctcagctgacaagtccatcagcactgc ctacctgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgcgct actctggttctttcgataactggggtcaaggtactctggtgaccgtctcctcagc	BCMA-52 VH цепь (нт)
87	gaagtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaagcctggcgagagcctgaag atcagctgcaaaggcagcggctacagcttcaccagctactggatcggctgggtccgac agatgcctggcaaaggccttgagtggatgggcatcatctaccccggcgacagcgacac cagatacagccctagctttcagggccacgtgaccatcagcgccgacaagtctatcagca ccgcctacctgcagtggtccagcctgaaggcctctgacaccgccatgtactactgcgcc agatactctggcagcttcgacaattggggccagggcacactggtcaccgtgtccagc	BCMA-52 VH цепь (нт) (O/SSE)
88	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWYQQ LPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL QSEDEADYYCAAWDGSLNGLVFGGGTKLTVLG	BCMA-52 VL цепь (ак)
89	tcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcacca tgtcttgttctggaaccagctccaacatcggaagtcactctgtaaactggtaccagcagct cccaggaacggcccccaaactcctcatctatactaataatcagcggccctcaggggtcc ctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggcctcc agtctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatggcagcctgaatggtctgg tattcggcggagggaccaagctgaccgtcctaggt	BCMA-52 VL цепь (нт)
90	agctatgagctgacacagcctccaagcgcctctggcacacctggacagcgagtgacaa tgagctgtagcggcaccagcagcaacatcggcagccacagcgtgaactggtatcagca gctgcctggcacagcccctaaactgctgatctacaccaacaaccagcggcctagcggc gtgcccgatagattttctggcagcaagagcggcacaagcgccagcctggctatttctgg actgcagagcgaggacgaggccgactattattgtgccgcctgggacggctctctgaac ggccttgtttttggcggaggcaccaagctgacagtgctggga	BCMA-52 VL цепь (нт) (O/SSE)
91	QNEYF	BCMA-52-scFV-mFc BCMA связывающий эпитоп 1

92	CIPCQL	BCMA-52-scFV-mFc BCMA связывающий эпитоп 2
93	CQRYC	BCMA-52-scFV-mFc BCMA связывающий эпитоп 3
94	GYTFIDYY	BCMA-55 CDR-H1 (ак)
95	GYTFIDYYVY	BCMA-55 CDR-H1 (ак) - нумерация AbM
96	GYTFIDY	BCMA-55 CDR-H1 (ак) - нумерация Chothia
97	DYYVY	BCMA-55 CDR-H1 (ак) - нумерация Kabat
98	INPNSGGT	BCMA-55 CDR-H2 (ак)
99	WINPNSGGTN	BCMA-55 CDR-H2 (ак) - нумерация AbM
100	NPNSGG	BCMA-55 CDR-H2 (ак) - нумерация Chothia
101	WINPNSGGTNYAQKFQG	BCMA-55 CDR-H2 (ак) - нумерация Kabat

102	ARSQRDGYMDY	BCMA-55 CDR-H3 (ак)
103	SQRDGYMDY	BCMA-55 CDR-H3 (ак) - нумерация Kabat, Chothia и AbM
104	ISCTGTSSD	BCMA-55 CDR-L1 (ак)
105	TGTSSDVG	BCMA-55 CDR-L1 (ак) - нумерация Kabat, Chothia и AbM
106	EDS	BCMA-55 CDR-L2 (ак)
107	EDSKRPS	BCMA-55 CDR-L2 (ак) - нумерация Kabat, Chothia и AbM
108	SSNTRSSTLV	BCMA-55 CDR-L3 (ак) - нумерация Kabat, Chothia и AbM
109	gccctcaggggtttctaatcgcttctctggctccaagtctg	BCMA-55 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
110	cgaggctgattattactgcagctcaaatacaagaagcagca	BCMA-55 спрогнозированный

		акцепторный сайт сплайсинга
111	cgaggccgattactactgcagcagcaacacccggtccagca	BCMA-55 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
112	gcccagcggcgtgtccaatagattcagcggcagcaagagcg	BCMA-55 спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
113	caatctgccctgactcagcctgcctccgtgtctgcgtctcctggacagtcgatcgccatct cctgcactggaaccagcagtgacgttggttggtatcaacagcacccaggcaaagcccc caaactcatgatttatgaggacagtaagcggccctcaggggtttctaatcgcttctctggct ccaagtctggcaacacggcctccctgaccatctctgggctccaggctgaggacgaggc tgattattactgcagctcaaatacaagaagcagcactttggtgttcggcggagggaccaa gctgaccgtcctaggttctagaggtggtggtggtagcggcggcggcggctctggtggt ggtggatccctcgagatggccgaagtgcagctggtgcagtctggggctgagatgaaga agcctggggcctcactgaagctctcctgcaaggcttctggatacaccttcatcgactacta tgtatactggatgcgacaggcccctggacaagggcttgagtccatgggatggatcaacc ctaacagtggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcaccatgaccag ggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacc gccatgtattactgtgcgcgctcccagcgtgacggttacatggattactggggtcaaggt actctggtgaccgtctcctca	BCMA-55 scFv
114	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQHPGKA PKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGG SGGGGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGY TFIDYYVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKF QGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQR DGYMDYWGQGTLVTVSS	BCMA-55 scFv (ак)
115	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatcgccatc	BCMA-55 scFv

	agctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccctggcaaggccc ctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcggcgtgtccaatagattcag cggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggccgagg acgaggccgattactactgcagcagcaacacccggtccagcacactggtttttggcgga ggcaccaagctgacagtgctgggatctagaggtggcggaggatctggcggcggagg aagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtctggcgcc gagatgaagaaacctggcgcctctctgaagctgagctgcaaggccagcggctacacct tcatcgactactacgtgtactggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatctatg ggctggatcaaccccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattccagggcaga gtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatggaactgagccggctg agatccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatctcagcgcgacggctacatgg attattggggccagggaaccctggtcaccgtgtccagc	(нт) (O/SSE)
116	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGYTFIDYYVYWM RQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDT SISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQG TLVTVSS	BCMA-55 V_H цепь (ак)
117	gaagtgcagctggtgcagtctggggctgagatgaagaagcctggggcctcactgaagc tctcctgcaaggcttctggatacaccttcatcgactactatgtatactggatgcgacaggc ccctggacaagggcttgagtccatgggatggatcaaccctaacagtggtggcacaaact atgcacagaagtttcagggcagggtcaccatgaccagggacacgtccatcagcacagc ctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacaccgccatgtattactgtgcgcgct cccagcgtgacggttacatggattactggggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca	BCMA-55 V_H цепь (нт)
118	gaagtgcagctggtgcagtctggcgccgagatgaagaaacctggcgcctctctgaagc tgagctgcaaggccagcggctacaccttcatcgactactacgtgtactggatgcggcag gcccctggacagggactcgaatctatgggctggatcaaccccaatagcggcggcacca attacgcccagaaattccagggcagagtgaccatgaccagagacaccagcatcagcac cgcctacatggaactgagccggctgagatccgacgacaccgccatgtactactgcgcc agatctcagcgcgacggctacatggattattggggccagggaaccctggtcaccgtgtc cagc	BCMA-55 V_H цепь (нт) (O/SSE)
119	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQHPGKA PKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG	BCMA-55 V_L цепь (ак)
120	caatctgccctgactcagcctgcctccgtgtctgcgtctcctggacagtcgatcgccatct cctgcactggaaccagcagtgacgttggttggtatcaacagcacccaggcaaagcccc caaactcatgatttatgaggacagtaagcggccctcaggggtttctaatcgcttctctggct	BCMA-55 V_L цепь (нт)

	ccaagtctggcaacacggcctccctgaccatctctgggctccaggctgaggacgaggc tgattattactgcagctcaaatacaagaagcagcactttggtgttcggcggagggaccaa gctgaccgtccta	
121	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatcgccatc agctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccctggcaaggccc ctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcggcgtgtccaatagattcag cggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggccgagg acgaggccgattactactgcagcagcaacacccggtccagcacactggtttttggcgga ggcaccaagctgacagtgctg	BCMA-55 V_L цепь (нт) (O/SSE)
122	MLMAG	BCMA-55-scFv-mFc BCMA связывающий эпитоп 1
123	YFDSLL	BCMA-55-scFv-mFc BCMA связывающий эпитоп 2
124	QLRCSSNTPPL	BCMA-55-scFv-mFc BCMA связывающий эпитоп 3
125	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKR APGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVT VSS	BCMA-C1 V_H Цепь (ак)
126	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKR APGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPPSLAMSLGKRATI SCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQT GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIP RTFGGGTKLEIK	BCMA-C1 V_H-V_L scFv (ак)
127	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWY QQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTID	BCMA-C1 V_L Цепь (ак)

	PVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK	
128	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWY QQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGGGGSGG GGSGGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTD YSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRF AFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDY WGQGTSVTVSS	BCMA-C1 V_L-V_H scFv (ак)
129	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWV KQAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVET SATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYW GQGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQSHRFMS TSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQKPGQSPKLLIFSA SYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCQ QHYSTPWTFGGGTKLDIK	BCMA-C2 V_H-V_L scFv (ак)
130	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQ QKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISS VQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLDIKGGGGSGG GGSGGGGSQIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFT NFGMNWVKQAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKG RFAFSVETSATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEIYYGY DGGFAYWGQGTLVTVSA	BCMA-C2 V_L-V_H scFv (ак)
131	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWV KQAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVET SATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYW GQGTLVTVSA	BCMA-C2 V_H Цепь (ак)
132	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQ QKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISS VQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLDIK	BCMA-C2 V_L Цепь (ак)
133	QNEYFDSLL	BCMA эпитоп
134	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 спейсер эктодомена (ак)
135	attgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatcca tgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc	CD28 спейсер эктодомена (нт)

136	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 эндо (ак)
137	aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc	CD28 эндо (нт)
138	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 трансмембранный домен (ак)
139	atgttttgggtgctggtcgtggtcggaggggtgctggcctgttacagcctgctggtgacagtcgctttcatcatcttctgggtg	CD28 трансмембранный домен (нт)
140	atgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtc	CD28 трансмембранный домен (нт)
141	aggggtgctggcctgttacagcctgctggtgacagtcgctt	CD28TM спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
142	MPLLLLLPLLWAGALA	CD33 сигнальный пептид
143	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-дзета полученный внутриклеточный сигнальный домен (ак)
144	agagtcaagttttccaggtccgccgacgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaaccccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaagg	CD3-дзета полученный внутриклеточный сигнальный домен (нт)
145	agagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccag	CD3-дзета

	ctgtacaacgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcgg agaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaagaggg cctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatg aagggcgagcgcagaagaggcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagca ccgccaccaaggatacctatgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	полученный внутриклеточный сигнальный домен (нт)
146	MALPVTALLLPLALLLHA	CD8 альфа сигнальный пептид
147	MLQMARQCSQNEYFDSLLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQR YCNASMTNSVKGMNAILWTCLGLSLIISLAVFVLTFLLR KMSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKGRTGDEIVLPR GLEYTVEECTCEDCIKNKPKVDSDHCFPLPAMEEGATIL VTTKTNDYCNSLSAALSVTEIEKSISAR	BCMA яванского макака; № GenBank EHH60172.1
148	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A пептид (ак)
149	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A пептид (ак)
150	ctttttcgcaacgggtttgc	EF1a/HTLV промотор прямой праймер
151	ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccc cgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcg gggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgcca gaacacagctgaagcttcgaggggctcgcatctctccttcacgcgcccgccgccctacc tgaggccgccatccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctc ctgaactgcgtccgccgtctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcctttgtcc ggcgctcccttggagcctacctagactcagccggctctccacgctttgcctgaccctgctt gctcaactctacgtctttgtttcgttttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccgg cgcctac	EF1альфа промотор с HTLV1 энхансером
152	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A пептид (ак)
153	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A пептид (ак)
154	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR альфа цепь сигнальный пептид

155	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatccca	GMCSFR альфа цепь сигнальная последовательность
156	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	шарнир-C_H2-C_H3 спейсер (ак)
157	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	шарнир-C_H3 спейсер (ак)
158	LLHACIPCQLR	BCMA эпитоп человека (остатки 17-27)
159	CIPCQLR	BCMA эпитоп человека (остатки 21-27)
160	SNTPPLTCQR	BCMA эпитоп человека (остатки 30-39)
161	SVTNSVK	BCMA эпитоп человека (остатки 44-50)
162	CSQNEYF	BCMA эпитоп человека (остатки 8-15)
163	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNARSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR	Вариант BCMA человека; № GenBank ABN42510.1
164	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQ	BCMA

	RYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLL RKISSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPR GLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEGATIL VTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR	человека; № GenBank BAB60895.1
165	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQ RYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLL RKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPR GLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEGATIL VTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR	BCMA человека; NCBI № NP_001183.2
166	MVLQTQVFISLLLWISGAYG	IgG-каппа человека сигнальный пептид(ак)
167	atggtgctgcagacccaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctccggagcatacgga	IgG-каппа человека сигнальная последовательность (нт)
168	atggtgctgcagacacaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctccggagcatacgga	IgG-каппа человека сигнальная последовательность (нт)
169	atggtgctgcagacccaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctctggcgcctacggc	IgG-каппа человека сигнальная последовательность (нт)
170	atggtgctgcagacccaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctctggcgcctatgga	IgG-каппа человека сигнальная последовательность (нт)
171	atggtgctgcagacacaggtgttcatctccctgctgctgtggatctctggagcatacgga	IgG-каппа

		человека сигнальная последовательность (нт)
172	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQ TYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNY KTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc IgG2 человека (Uniprot P01859)
173	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Fc IgG4 человека (Uniprot P01861)
174	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF QSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Модифицированный IgG4 шарнир-IgG2/IgG4 C_H2-IgG4 C_H3 спейсер (ак)
175	gaatctaagtacggaccgccctgccctccctgccctgctcctcctgtggctggaccaag cgtgttcctgtttccacctaagcctaaagataccctgatgatttcccgcacacctgaagtga cttgcgtggtcgtggacgtgagccaggaggatccagaagtgcagttcaactggtacgtg gacggcgtggaagtccacaatgctaagactaaaccccgagaggaacagtttcagtcaa cttaccgggtcgtgagcgtgctgaccgtcctgcatcaggattggctgaacgggaagga gtataagtgcaaagtgtctaataagggactgcctagctccatcgagaaaacaattagtaa ggcaaaagggcagcctcgagaaccacaggtgtataccctgcccctagccaggagga	Модифицированный IgG4 шарнир-IgG2/IgG4 C_H2-IgG4 C_H3 спейсер (нт)

	aatgaccaagaaccaggtgtccctgacatgtctggtcaaaggcttctatccaagtgacat cgccgtggagtgggaatcaaatgggcagcccgagaacaattacaagaccacaccacc cgtgctggactctgatggaagtttctttctgtattccaggctgaccgtggataaatctcgct ggcaggagggcaacgtgttctcttgcagtgtcatgcacgaagccctgcacaatcattata cacagaagtcactgagcctgtccctgggcaaa	
176	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер (ак)
177	tttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagaccccacctgtaggtttggcaagct aggatcaaggttaggaacagagagacagcagaatatgggccaaacaggatatctgtgg taagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagttggaacagcagaatatgggcc aaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagatggtc ccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttccagggtgcc ccaaggacctgaaatgaccctgtgccttatttgaactaaccaatcagttcgcttctcgcttct gttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagccca	MND промотор
178	ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccc cgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcctagagaaggtggcgcg gggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgcca gaacacagctgaagcttcgaggggctcgcatctctccttcacgcgcccgccgccctacc tgaggccgccatccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctc ctgaactgcgtccgccgtctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcctttgtcc ggcgctcccttggagcctacctagactcagccggctctccacgctttgcctgaccctgctt gctcaactctacgtctttgtttcgttttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccgg cgcctacggctagcgcc	модифицированный EF1 альфа промотор
179	MAQQCFHSEYFDSLLHACKPCHLRCSNPPATCQPYCDP SVTSSVKGTYTVLWIFLGLTLVLSLALFTISFLLRKMNPE ALKDEPQSPGQLDGSAQLDKADTELTRIRAGDDRIFPRS LEYTVEECTCEDCVKSKPKGDSDHFFPLPAMEEGATILV TTKTGDYGKSSVPTALQSVMGMEKPTHTR	BCMA мыши; NCBI № NP_035738.1
180	cagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaa	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
181	gggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgc	Оптимизированный акцепторный

		сайт сплайсинга
182	cggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccgtggcct	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
183	gctgagagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcct	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
184	acacctccactggatccccaagagctggatatcctgaaaac	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
185	accggattcctcctgatccaagcctggccagagaacagaac	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
186	acggccagtttagcctggctgtggtgtctctgaacatcacc	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
187	aagtttctttctgtattccagactgaccgtggataaatctc	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
188	cgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggacct	оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
189	agtctaaatacggac	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
190	tcaactggtatgtgg	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга

191	accatctccaaggcc	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
192	gccccaggtttacac	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
193	tcagcagatccgccg	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
194	ctcctgtgtgaactc	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
195	tcggaaagtgtgcaa	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
196	cagcacggccagttt	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
197	aaccggggcgagaac	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
198	ctggaaggcgagccc	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
199	tgttcatgtgagcgg	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга (последние 4 нт вне кодирующей области)
200	gagtctaaatacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtgg	оптимизированный SSE модифицирован

	acggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagttccagagc acctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaag agtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctc caaggccaagggccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaaga ggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccg atatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacac ctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatc aagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaa ccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag	ный IgG4 шарнир-IgG2/IgG4 C_H2-IgG4 C_H3 спейсер (нт)
201	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A пептид (ак)
202	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A пептид (ак)
203	cgccttgtcctccttgtccagctcctcctgttgccggacct	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
204	cagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaa	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
205	accggattcctcctgattcaggcctggccagagaacagaac	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга
206	cgtctaggtaagttt	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
207	gaccaaggtgaccgt	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
208	tgcactggtaccagc	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
209	taaactggtaccagc	Спрогнозированный донорный

		сайт сплайсинга
210	atctcctgtaagggt	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
211	ggtcaaggtactctg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
212	gaggacagtaagcgg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
213	ggtcaaggtactctg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
214	tgcctccgtgtctgc	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
215	caccaaggtgaccgt	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
216	tgaactggtatcagc	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
217	atctcttgaaatggt	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
218	ggccagggcacactg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
219	gaggacagcaagagg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
220	ggccagggaaccctg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга

221	tgccagcgttagtgc	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
222	aatctaagtacggac	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
223	tcaactggtacgtgg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
224	acaattagtaaggca	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
225	accacaggtgtatac	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
226	tttccaggtccgccg	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
227	ctgctctgtgagtta	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
228	acgcaaagtgtgtaa	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
229	caacatggtcagttt	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
230	aacagaggtgaaaac	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
231	ctggagggtgagcca	Спрогнозированный донорный сайт сплайсинга
232	tggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatat	спрогнозирован

		ный акцепторный сайт сплайсинга промотора
233	tgaactgcgtccgccgtctaggtaagtttaaagctcaggtc	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга промотора
234	ttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccggcgc	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга промотора
235	gatatcgaattcctgcagcc	Обратный праймер только 5′ WPRE
236	GAGTCTAAATACGGACCGCCTTGTCCTCCTTGTCCAG CTCCTCCTGTTGCCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCT CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAAG AGGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAG AGGAACAGTTCCAGAGCACCTACAGAGTGGTGTCCG TGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA AAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGC CTAGCAGCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCAAGAGAGCCCCAGGTTTACACACTGCCTCC AAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAATCAGGTGTCCCT GACATGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACAGCGAC GGCAGTTTCTTCCTGTATAGTAGACTCACCGTGGATA AATCAAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC	Спейсер – кодон-оптимизированный (нт)

	AGAAAAGCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAAA	
237	ESKYGPPCPPCP	Спейсер (IgG4шарнир) (ак)
238	gaatctaagtacggaccgccctgcccccttgccct	Спейсер (IgG4шарнир) (нт)
239	aagtttctttctgtattccaggctgaccgtggataaatctc	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга спейсера
240	gggcaacgtgttctcttgcagtgtcatgcacgaagccctgc	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга спейсера
241	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A пептид (ак)
242	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A пептид (ак)
243	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A пептид (ак)
244	ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctagg	T2A пептид (нт)
245	cttgaaggtggtggcgaaggcagaggcagcctgcttacatgcggagatgtggaagagaaccccggacctaga	T2A пептид (нт)
246	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYAHTИNWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	усеченный EGFR (tEGFR) последовательность (ак)

247	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgat cccacgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactcactctccataaat gctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagtggcgatctccacatcctgc cggtggcatttaggggtgactccttcacacatactcctcctctggatccacaggaactgg atattctgaaaaccgtaaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaa caggacggacctccatgcctttgagaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaa catggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctc aaggagataagtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaata caataaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattataagcaaca gaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtgctcccccga gggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctcttgccggaatgtcagccgagg cagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggtgagccaagggagtttgtggag aactctgagtgcatacagtgccacccagagtgcctgcctcaggccatgaacatcacctg cacaggacggggaccagacaactgtatccagtgtgcccactacattgacggcccccac tgcgtcaagacctgcccggcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtctggaagt acgcagacgccggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcact gggccaggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactgg gatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccctggggatcggcctcttcatgtg a	усеченный EGFR (tEGFR) последовательность (нт)
248	atgctgctcctcgtgacaagcctgctcctgtgtgaactccctcatccagcttttctgctcatt cctcggaaagtgtgcaacggcatcggcatcggagagttcaaggacagcctgagcatca atgccaccaacatcaagcacttcaagaattgcaccagcatcagcggcgacctgcacatt ctgcctgtggcctttagaggcgacagcttcacccacacacctccactggatccccaaga gctggatatcctgaaaaccgtgaaagagattaccggattcctcctgatccaagcctggcc agagaacagaaccgatctgcacgccttcgagaacctcgagatcatcagaggccggac caaacagcacggccagtttagcctggctgtggtgtctctgaacatcaccagtctgggcct gagaagcctgaaagaaatctccgacggcgacgtgatcatctccggaaacaagaacctg tgctacgccaacaccatcaactggaagaagctgttcggcacctccggccagaaaacaa agatcatctctaaccggggcgagaacagctgcaaggccaccggacaagtttgtcacgc cctgtgtagccctgaaggctgttggggacccgaacctagagactgtgtgtcctgccgga atgtgtcccggggcagagaatgtgtggataagtgcaacctgctggaaggcgagccccg cgagtttgtggaaaacagcgagtgcatccagtgtcaccccgagtgtctgccccaggcca tgaacattacatgcaccggcagaggccccgacaactgtattcagtgcgcccactacatc gacggccctcactgcgtgaaaacatgtccagctggcgtgatgggagagaacaacaccc tcgtgtggaagtatgccgacgccggacatgtgtgccacctgtgtcaccctaattgcacct	усеченный EGFR (tEGFR) последовательность (нт) (O/SSE)

	acggctgtaccggacctggcctggaaggatgccctacaaacggccctaagatccccag cattgccaccggaatggttggagccctgctgcttctgttggtggtggccctcggaatcgg cctgttcatgtga	
249	actcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaac	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга усеченного маркера
250	acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggac	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга усеченного маркера
251	atggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataaca	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга усеченного маркера
252	tcttcatgtgagcgg	спрогнозированный акцепторный сайт сплайсинга усеченного маркера
253	aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttt tacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttca ttttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcagg caacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgcc accacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgccacggcggaact catcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaatt ccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctgg attctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcctt	Вирус гепатита сурков (WHP) пост-транскрипционный регуляторный элемент (WPRE)

	cccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacga gtcggatctccctttgggccgcctccccgc	
254	tcaattggtacgtgg	Спрогнозированный сайт сплайсинга
255	SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA	Линкер (ак)
256	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGA LTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGW TVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLT SGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGV NNGNPLDAVQQ	Стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii № UniProt P22629
257	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAE SRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAH SATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTL VGHDTFTKVKPSAAS	Минимальный стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii
258	His-Pro-Gln-Phe	Стрептавидин-связывающий пептид
259	His-Pro-Xaa	Стрептавидин-связывающий пептид Xaa выбран из Gln, Asp и Met
260	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
261	-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
262	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	Стрептавидин связывающий пептид, Strep-tag®
263	WSHPQFEK	Strep-tag® II
264	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
265	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
266	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
267	WSHPQFEKGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
268	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
269	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
270	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
271	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGA LTGTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGW TVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLT SGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGV NNGNPLDAVQQ	Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
272	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAE SRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAH SATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTL VGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
273	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGN AESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRN AHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKS TLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
274	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGA LTGTYIGARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWT VAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTS GTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVN NGNPLDAVQQ	Мутеин стрептавидина Ile44-Gly45-Ala- 46-Arg47 Виды: Streptomyces

		avidinii
275	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNAE SRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAH SATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTL VGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
276	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNA ESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKST LVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 Виды: Streptomyces avidinii
277	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAE SRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAH SATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLV GHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Виды: Streptomyces avidinii
278	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGA LTGTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGW TVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLT SGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Виды: Streptomyces avidinii

279	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGN AESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRN AHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKS TLVGHDTFTKVKPSAAS	Minimal стрептавидин Виды: Streptomyces avidinii
280	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	Вариабельная тяжелая цепь анти-CD3 антитела OKT3
281	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 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	Вариабельная легкая цепь анти-CD3 антитела OKT3
282	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	Вариабельная тяжелая цепь анти-CD28 антитела CD28.3
283	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	Вариабельная легкая цепь анти-CD28 антитела

	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	CD28.3

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 наивным или центральной памяти.

2. Способ лечения множественной миеломы (ММ), где способ включает введение субъекту, страдающему или подозреваемому в наличии ММ, композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который направленно воздействует на антиген созревания В-клеток (BCMA), где:

композиция содержит $CD8^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие CAR;

композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR до точно или примерно $100x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, 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 $CD27^+CCR7^+$.

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 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 4:1, от примерно 1:1,5 до примерно 2:1, 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 5:1 до примерно 2:1, от примерно 4:1 до примерно 2:1, от примерно 3:1 до примерно 2:1, точно или примерно 5:1, точно или примерно 4:1, точно или примерно 3:1 или точно или примерно 2:1.

6. Способ по любому из пп.2-5, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $80x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно $5x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

10. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что композиция содержит от точно или примерно $10x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, до точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, включительно.

11. Способ по любому из пп.1-8 и 10, отличающийся тем, что композиция содержит точно или примерно $20x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

12. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что композиция содержит точно или примерно $30x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

13. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что композиция содержит точно или примерно $40x10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 90% клеток в композиции представляют собой $CD3^+$ клетки.

15. Способ по любому из пп.1-14, 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.

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что от точно или примерно 2% до точно или примерно 30% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что от точно или примерно 5% до точно или примерно 10% CAR^+ Т-клеток в композиции экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

18. Способ по любому из пп.1-16, 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.

19. Способ по любому из пп.1-16, 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.

20. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что от точно или примерно 20% до 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.1-16, 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.

22. Способ по любому из пп.2-21, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

23. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что от точно или примерно 80% до точно или примерно 85% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

24. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что от точно или примерно 85% до точно или примерно 90% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

25. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что от точно или примерно 90% до точно или примерно 95% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

26. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что от точно или примерно 95% до точно или примерно 99% CAR^+ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти.

27. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что 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 наивным или центральной памяти.

28. Способ по любому из пп. 1 и 3-27, отличающийся тем, что, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции, которые имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, являются поверхностно-положительными по маркеру, экспрессируемому на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что маркер, экспрессируемый на Т-клетках, подобных наивным или центральной памяти, выбран из группы, состоящей из CD45RA, CD27, CD28 и CCR7.

30. Способ по любому из пп. 1 и 3-29, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 80% CAR^+ Т-клеток в композиции, которые имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, имеют фенотип, выбранный из $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ или $CD62L^-CCR7^+$.

31. Способ по любому из пп.1-30, 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 наивным 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 имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, выбранный из $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$ или $CD62L^-CCR7^+$.

33. Способ по любому из пп.1-32, 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 композиция имеет фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

34. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным 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 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным 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 70% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным 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 80% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным 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 85% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

39. Способ по любому из пп.1-38, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 50% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным 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 60% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным 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 70% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

42. Способ по любому из пп.1-41, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 80% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

43. Способ по любому из пп.1-42, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85% $CD4^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

44. Способ по любому из пп.1-43, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

45. Способ по любому из пп.1-44, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

46. Способ по любому из пп.1-45, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

47. Способ по любому из пп. 1-46, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

48. Способ по любому из пп. 1-47, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CCR7^+CD45RA^+$ или $CCR7^+CD45RA^-$.

49. Способ по любому из пп.1-48, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 50% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

50. Способ по любому из пп.1-49, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 60% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

51. Способ по любому из пп.1-50, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 70% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

52. Способ по любому из пп.1-51, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 80% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

53. Способ по любому из пп.1-52, отличающийся тем, что по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85% $CD8^+CAR^+$ Т-клеток в композиции имеют фенотип, подобный наивным или центральной памяти, который представляет собой $CD27^+CCR7^+$.

54. Способ по любому из пп.1-53, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет меньше или меньше примерно 0,9.

55. Способ по любому из пп.1-54, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,9 до точно или примерно 0,8.

56. Способ по любому из пп.1-54, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем

оставляет меньше или меньше примерно 0,8.

57. Способ по любому из пп.1-54 и 56, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,8 до точно или примерно 0,7.

58. Способ по любому из пп.1-54 и 56, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,7 до точно или примерно 0,6.

59. Способ по любому из пп.1-54 и 56, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,6 до точно или примерно 0,5.

60. Способ по любому из пп.1-54 и 56, отличающийся тем, что доля интегрированного числа копий вектора (iVCN) в общем VCN в CAR^+ Т-клетках в композиции в среднем составляет от точно или примерно 0,5 до точно или примерно 0,4.

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 0,4 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 2,0 копий на диплоидный геном, включительно.

63. Способ по любому из пп.1-62, 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.

64. Способ по любому из пп.1-62, 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 копий на диплоидный геном, включительно.

65. Способ по любому из пп.1-62, 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.

66. Способ по любому из пп.1-65, отличающийся тем, что на момент или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект ранее получил

по меньшей мере 3 схемы лечения против миеломы.

67. Способ по любому из пп.1-66, отличающийся тем, что на момент или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект получил все три из следующих схем лечения против миеломы: трансплантация аутологичных стволовых клеток (ASCT); схема, включающая иммуномодулирующий агент и ингибитор протеасомы; и анти-CD38 агент.

68. Способ по п.66 или 67, где на момент или до введения композиции, содержащей сконструированные Т-клетки, субъект невосприимчив к последней схеме лечения против миеломы.

69. Способ по п.68, отличающийся тем, что не поддающаяся лечению миелома определяется как документально подтвержденное прогрессирующее заболевание во время или в течение 12 месяцев, измеренное от последней дозы, до завершения лечения по последней схеме лечения против миеломы.

70. Способ по любому из пп.1-69, отличающийся тем, что субъект ранее не получал терапию CAR Т-клетками или генетически модифицированными Т-клетками.

71. Способ по любому из пп.1-70, отличающийся тем, что субъект ранее не получал BCMA-таргетную терапию, такую как анти-BCMA моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

72. Способ по любому из пп.1-71, дополнительно включающий получение образца лейкафереза от субъекта для изготовления композиции, содержащей сконструированные Т-клетки.

73. Способ по любому из пп. 1-72, где CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR-H1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR-H2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR-L1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR-L2) и определяющую комплементарность легкую цепь область 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO:119;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и

108, соответственно;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, содержащую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L, содержащую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно; или

V_H, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119;

(b) спейсер, содержащий химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, которая необязательно имеет длину примерно 228 аминокислот; необязательно, где спейсер представлен в SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен CD28 человека; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматический сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ), и костимулирующую сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клетки или ее сигнальную часть.

74. Способ по п.73, отличающийся тем, что V_H представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; и V_L представляет собой или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119.

75. Способ по п.73 или 74, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv.

76. Способ по любому из пп.73-75, отличающийся тем, что V_H и V_L соединены гибким линкером.

77. Способ по п.75 или п.76, отличающийся тем, что scFv содержит линкер, содержащий аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1).

78. Способ по любому из пп.73-77, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:114.

79. Способ по любому из пп.73-78, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114.

80. Способ по любому из пп. 73-79, отличающийся тем, что цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143.

81. Способ по любому из пп.73-80, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

82. Способ по любому из пп.73-81, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

83. Способ по любому из пп.73-82, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4.

84. Способ по любому из пп.73-83, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом цепи CD3-дзета (CD3ζ).

85. Способ по любому из пп.73-84, отличающийся тем, что трансмембранный домен представляет собой или содержит трансмембранный домен CD28 человека.

86. Способ по любому из пп.73-85, отличающийся тем, что трансмембранный домен представляет собой или содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138.

87. Способ по любому из пп.73-86, отличающийся тем, что CAR содержит от своего N до C конца, по порядку: внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

88. Способ по любому из пп. 1-87, где CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:114, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности аминокислот с последовательностью SEQ ID NO:114;

(b) спейсер, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:174, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:138; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматическую сигнальную область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:4, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:4.

89. Способ по любому из пп. 1-88, где CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:114;

(b) спейсер, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, содержащую цитоплазматическую сигнальную область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.

90. Способ по любому из пп.1-89, где CAR содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:19.

91. Способ по любому из пп.1-90, отличающийся тем, что перед введением субъект получил противолимфомную терапию, включающую введение флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м^2 поверхности тела субъекта, необязательно, точно или примерно 30 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней, и/или циклофосфамид в дозе точно или примерно 200-400 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно, точно или примерно

300 мг/м^2, ежедневно, в течение 2-4 дней.

92. Способ по любому из пп. 1-91, отличающийся тем, что указанный способ способен обеспечить определенный ответ или исход, необязательно, в указанный момент времени после начала введения, по меньшей мере у одного из или у по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ, где:

ответ или исход выбран из группы, состоящей из объективного ответа (OR), полного ответа (CR), строгого полного ответа (sCR), очень хорошего частичного ответа (VGPR), частичного ответа (PR) и минимального ответа (MR);

ответ или исход представляет собой или содержит OR; и/или

ответ или исход представляет собой или содержит CR.

93. Способ по п.92, отличающийся тем, что ответ или исход являются устойчивыми в течение более точно или примерно 3, 6, 9 или 12 месяцев.

94. Способ по п.92 или 93, отличающийся тем, что ответ или исход, определенный точно или примерно через 3, 6, 9 или 12 месяцев после указанного момента времени, равен или лучше по сравнению с ответом или результатом, определенным в указанный момент времени.

95. Способ по любому из пп.1-94, отличающийся тем, что указанный способ не вызывает какой-либо синдром высвобождения цитокинов (CRS), по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у 80%, по меньшей мере у 90%, или по меньшей мере у 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

96. Способ по любому из пп. 1-95, отличающийся тем, что указанный способ не вызывает тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS) у по меньшей мере по меньшей мере, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

97. Способ по любому из пп. 1-96, отличающийся тем, что способ не вызывает какую-либо нейротоксичность, по меньшей мере, у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у 80%, по меньшей мере у 90% или по меньшей мере у 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

98. Способ по любому из пп. 1-97, отличающийся тем, что указанный способ не вызывает тяжелую нейротоксичность у по меньшей мере, по меньшей мере, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

99. Способ по любому из пп. 1-98, отличающийся тем, что указанный способ не вызывает тяжелый CRS и тяжелую нейротоксичность у по меньшей мере, по меньшей мере, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

100. Способ по любому из пп. 1-99, отличающийся тем, что способ не вызывает тяжелый CRS и тяжелую нейротоксичность у по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% субъектов в когорте субъектов, имеющих ММ.

101. Способ по пп.96, 99 и 100, отличающийся тем, что тяжелый CRS представляет собой CRS 3 степени или выше, 4 степени или выше или CRS 5 степени.

102. Способ по пп.98, 99 или 100, отличающийся тем, что тяжелая нейротоксичность имеет 3 степень или выше, 4 степень или выше или CRS 5 степени.

103. Способ по любому из пп.1-102, отличающийся тем, что введение композиции осуществляют амбулаторно и/или без госпитализации субъекта в стационар и/или без круглосуточного пребывания в стационаре и/или без необходимости госпитализации или пребывания в круглосуточном стационаре, необязательно, если не или до тех пор, пока у субъекта не появится устойчивая лихорадка или лихорадка, которая не снижается или не будет снижаться или не снизилась более чем на 1°C после лечения жаропонижающим агентом.

104. Способ по любому из пп.1-103, отличающийся тем, что композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, вводят парентерально, необязательно внутривенно.

105. Способ по любому из пп.1-104, отличающийся тем, что субъектом является человек.

106. Способ по любому из пп. 1-105, отличающийся тем, что композицию, содержащую сконструированные Т-клетки, получают с помощью производственного процесса, включающего:

(i) воздействие на входную композицию, содержащую первичные Т-клетки, необязательно, входную композицию, содержащую аутологичные Т-клетки, селектированные у субъекта, стимулирующего реагента, содержащего реагент на основе олигомерных частиц, содержащий множество молекул мутеина стрептавидина, в условиях стимулирования Т-клеток, тем самым создавая стимулированную популяцию, где:

реагент в виде 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 направленно воздействует на BCMA, 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.

107. Способ по п.106, отличающийся тем, что анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, и анти-CD28 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

108. Способ по п. 106 или п. 107, отличающийся тем, что 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:266-270.

109. Способ по любому из пп. 106-108, отличающийся тем, что 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:257, 272, 275, 277, 279, 273 или 276.

110. Способ по любому из пп.106-109, отличающийся тем, что реагент на основе олигомерных частиц содержит от 1000 до 5000 тетрамеров мутеина стрептавидина, включительно.

111. Способ по любому из пп.106-110, дополнительно включающий, перед сбором клеток, добавление биотина или аналога биотина после или во время инкубации.

112. Способ по любому из пп.106-111, отличающийся тем, что сбор проводят в период между 48 и 120 часами, включительно, после начала воздействия стимулирующего реагента.

113. Способ по любому из пп.106-112, отличающийся тем, что сбор проводят во время обнаружения интегрированного вектора в геноме, но до достижения стабильного числа копий интегрированного вектора (iVCN) на диплоидный геном.

114. Способ по любому из пп. 106-113, отличающийся тем, что сбор проводят до того, как общее количество жизнеспособных клеток при сборе более или более примерно в три раза превысит общее количество жизнеспособных клеток стимулированной популяции.

115. Способ по любому из пп. 106-114, отличающийся тем, что сбор проводят в то

время, когда общее количество жизнеспособных клеток при сборе составляет точно или примерно трехкратное или точно или примерно двукратное, или такое же или примерно такое же, как общее количество жизнеспособных клеток стимулированной популяции.

116. Способ по любому из пп.106-115, отличающийся тем, что сбор проводят в то время, когда доля $CD27^+CCR7^+$ клеток больше или больше примерно 50% от 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 или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции трансформированных клеток.

117. Способ по любому из пп.106-116, отличающийся тем, что сбор проводят в то время, когда доля $CD45RA^+CCR7^+$ и $CD45RA^-CCR7^+$ клеток больше или больше примерно 60% от 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 или их CAR-экспрессирующих клеток в популяции трансформированных клеток.

118. Способ по любому из пп.1-117, отличающийся тем, что клетки входной композиции получают с помощью производственного процесса для получения выходной композиции, (i) включающей сконструированные CD4+ Т-клетки и сконструированные CD8+ Т-клетки и (ii) 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 B- 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+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+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%.

119. Способ по любому из пп. 1-118, отличающийся тем, что входная 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 он проводится среди множества различных отдельных субъектов.

120. Способ по любому из пп.1-119, отличающийся тем, что ММ представляет собой рецидивирующую и/или не поддающуюся лечению множественную миелому (r/r ММ).

121. Готовое изделие, содержащее композицию, содержащую генетически сконструированные клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленно воздействующий на BCMA, и инструкции по введению композиции клеток в

соответствии со способом по любому из пп.1-120.

%CD3+ из живых CD45+
100
98
96
94
92
90
QTPP
BCMA
ИМИТАЦИЯ
%NK-клеток из живых CD45+
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BCMA
ИМИТАЦИЯ
%CD19+ из живых CD45+
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
BCMA
ИМИТАЦИЯ
ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА
ПРОЦЕСС А
ПРОЦЕСС В
ТИП ДОНОРА
ЭТАЛОН
ПАЦИЕНТ

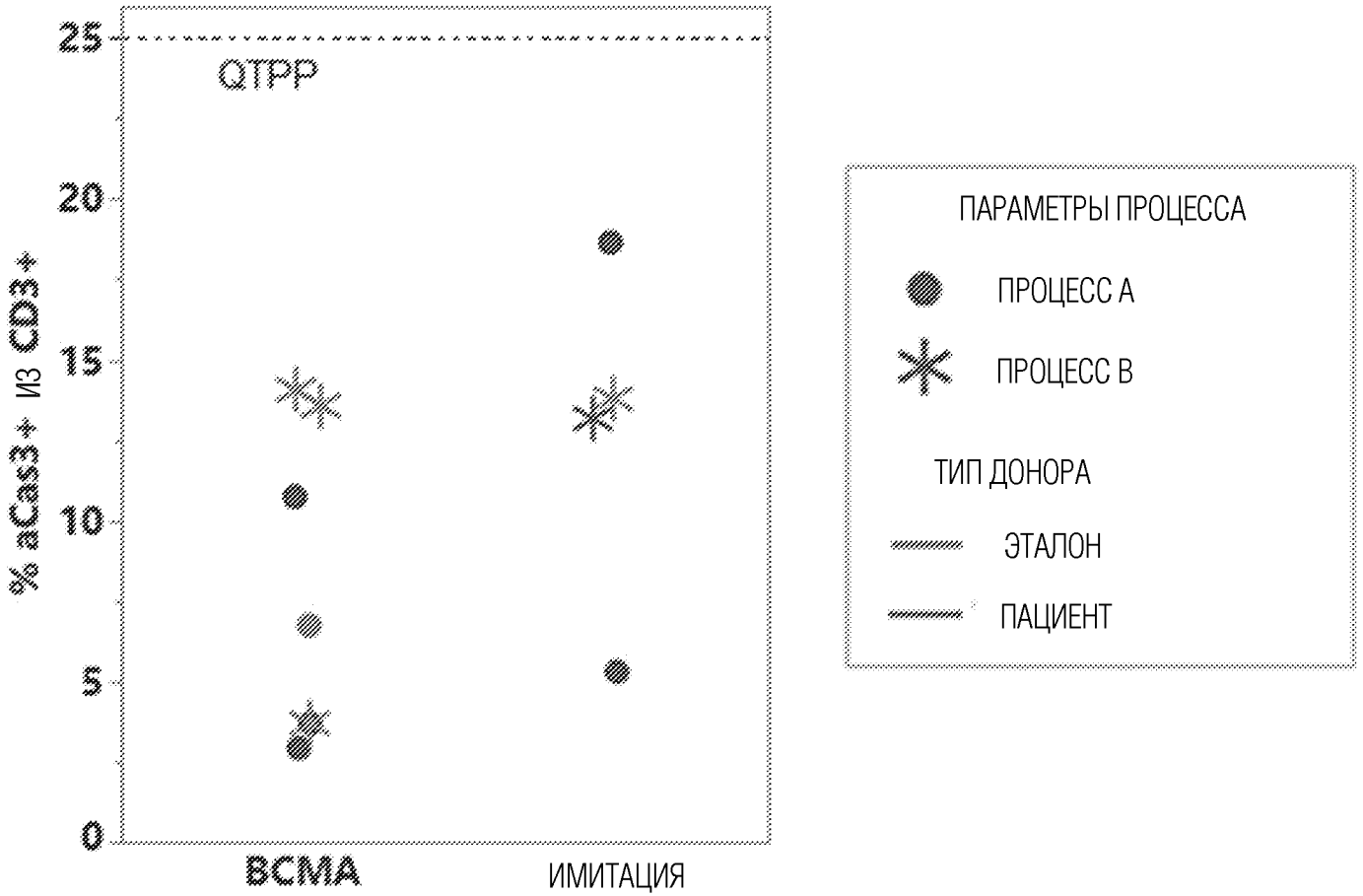
ФИГ. 1

%CD3+CD4+ из живых CD45+
%CD3+CD8+ из живых CD45+
%CD3+CAR+ из живых CD45+
%CD8+CAR+ из живых CD45+
ПРОЦЕСС С РАЗМНОЖЕНИЕМ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
BCMA
ИМИТАЦИЯ
ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА
ПРОЦЕСС А
ПРОЦЕСС В
ТИП ДОНОРА
ЭТАЛОН
ПАЦИЕНТ

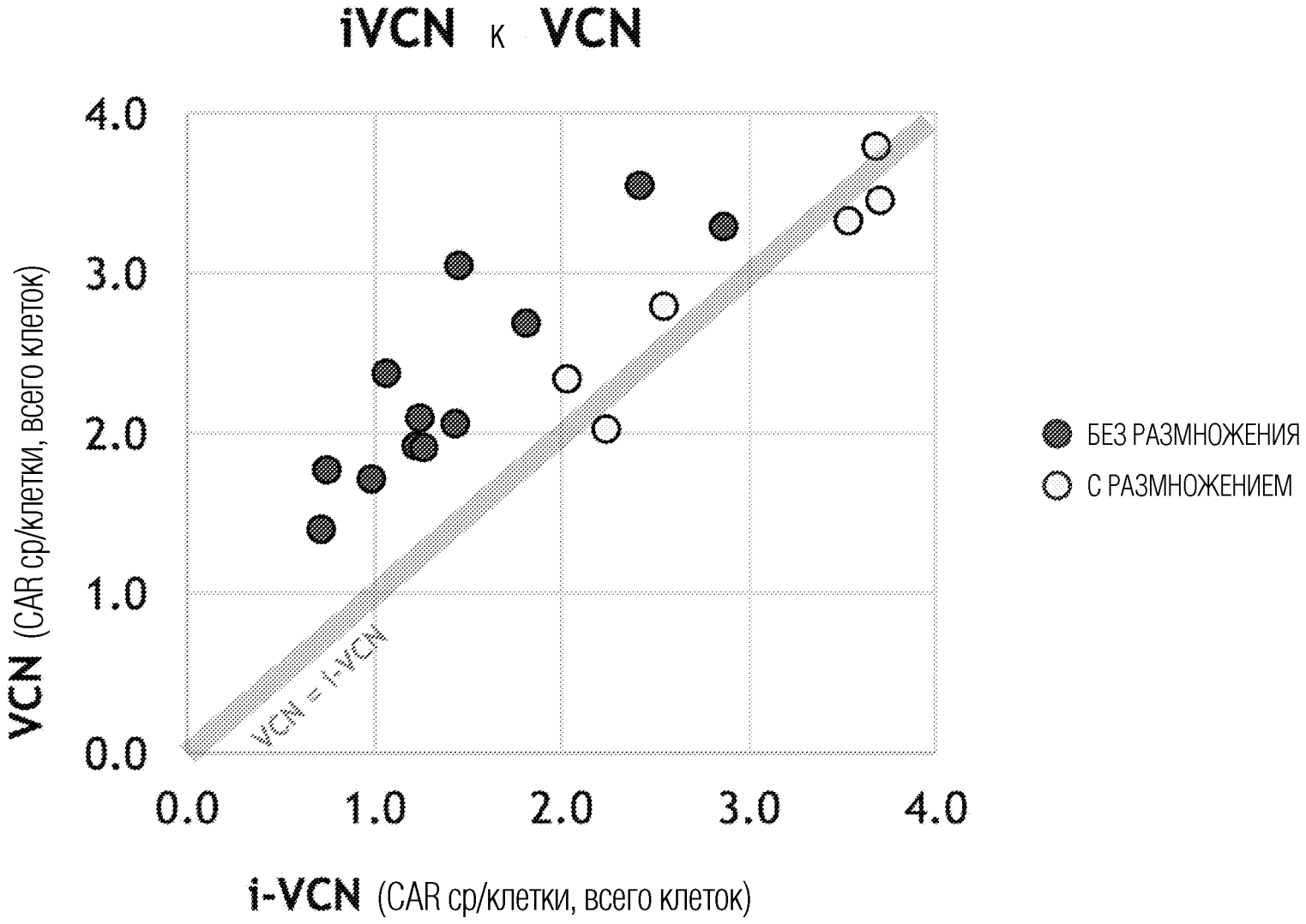
ФИГ. 2

CD4+CAR+/CD8+CAR+ CD4+/CD8+ Соотношение
0
1
2
3
4
5
6
ПРОЦЕСС С РАЗМНО-ЖЕНИЕМ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНО-ЖЕНИЯ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНО-ЖЕНИЯ
BCMA
ИМИТАЦИЯ
ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА
ПРОЦЕСС А
ПРОЦЕСС В
ТИП ДОНОРА
ЭТАЛОН
ПАЦИЕНТ

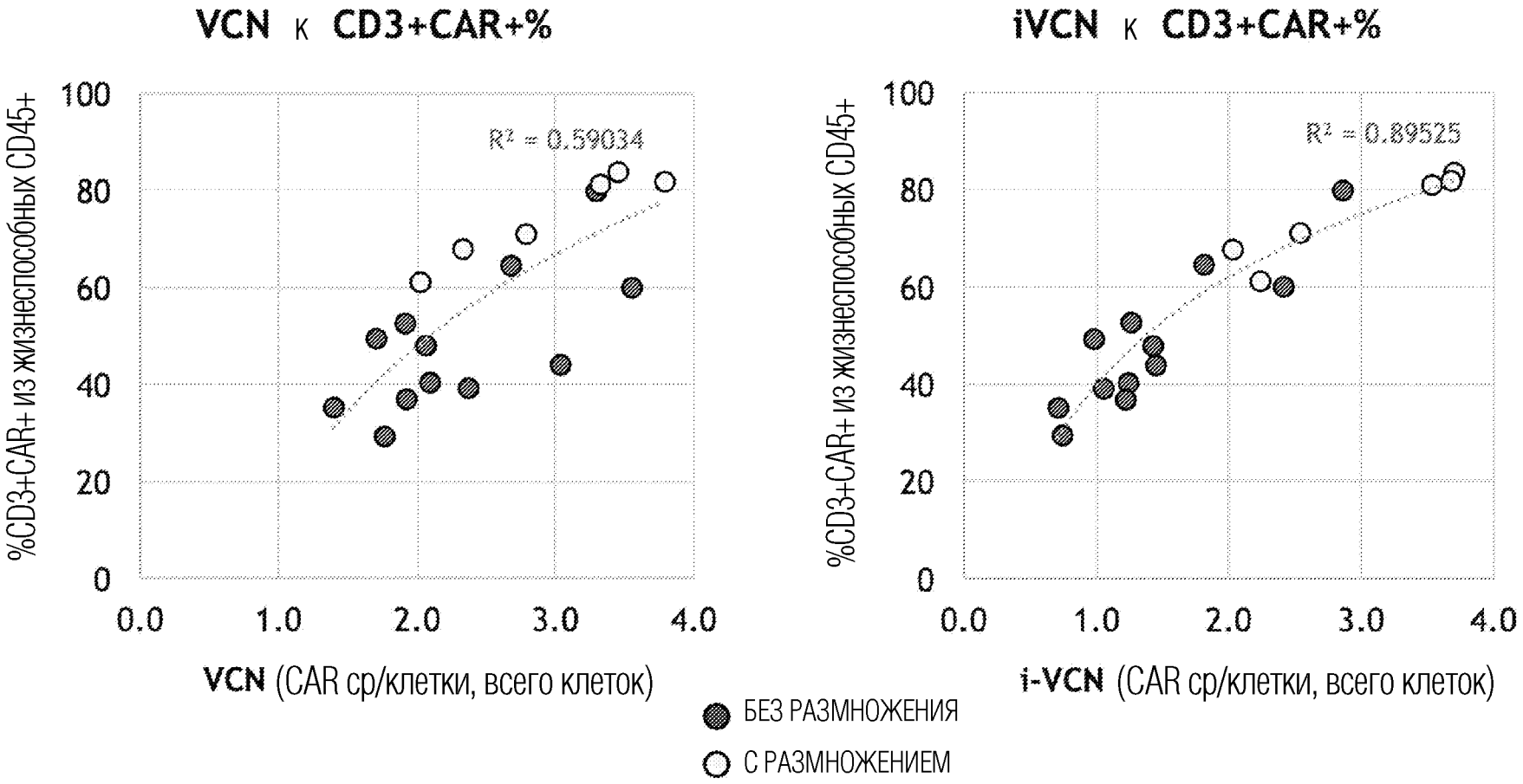
ФИГ. 3


25
20
15
10
5
0
% aCas3+ ИЗ CD3+
QTPP
BCMA
ИМИТАЦИЯ
ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА
ПРОЦЕСС А
ПРОЦЕСС В
ТИП ДОНОРА
ЭТАЛОН
ПАЦИЕНТ

ФИГ. 4


iVCN к VCN
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
VCN (CAR ср/клетки, всего клеток)
VCN = i-VCN
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
i-VCN (CAR ср/клетки, всего клеток)
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
С РАЗМНОЖЕНИЕМ

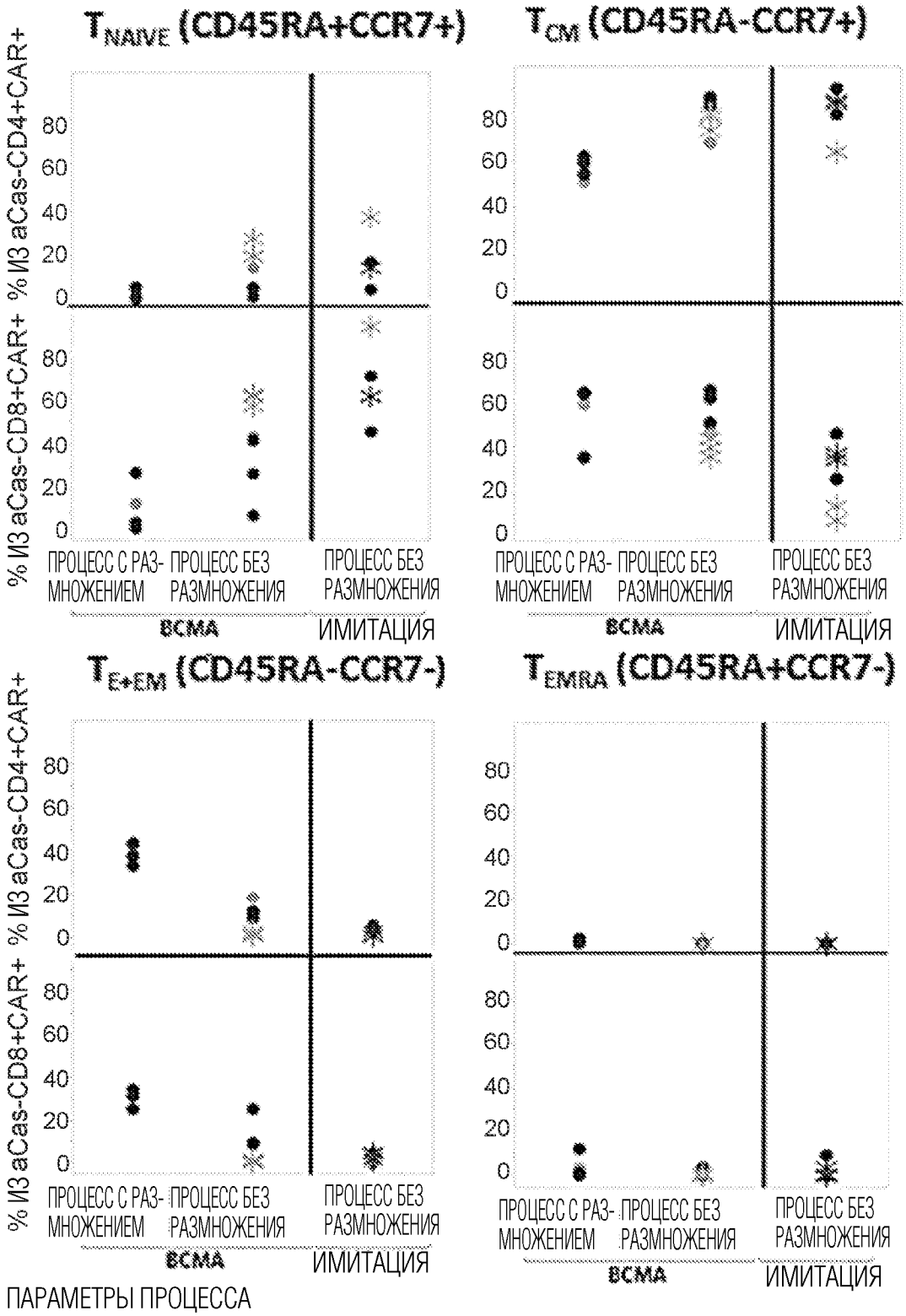
ФИГ. 5А


VCN к CD3+CAR+%
%CD3+CAR+ из жизнеспособных CD45+
100
80
60
40
20
0
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
R² = 0.59034
VCN (CAR ср/клетки, всего клеток)
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
С РАЗМНОЖЕНИЕМ

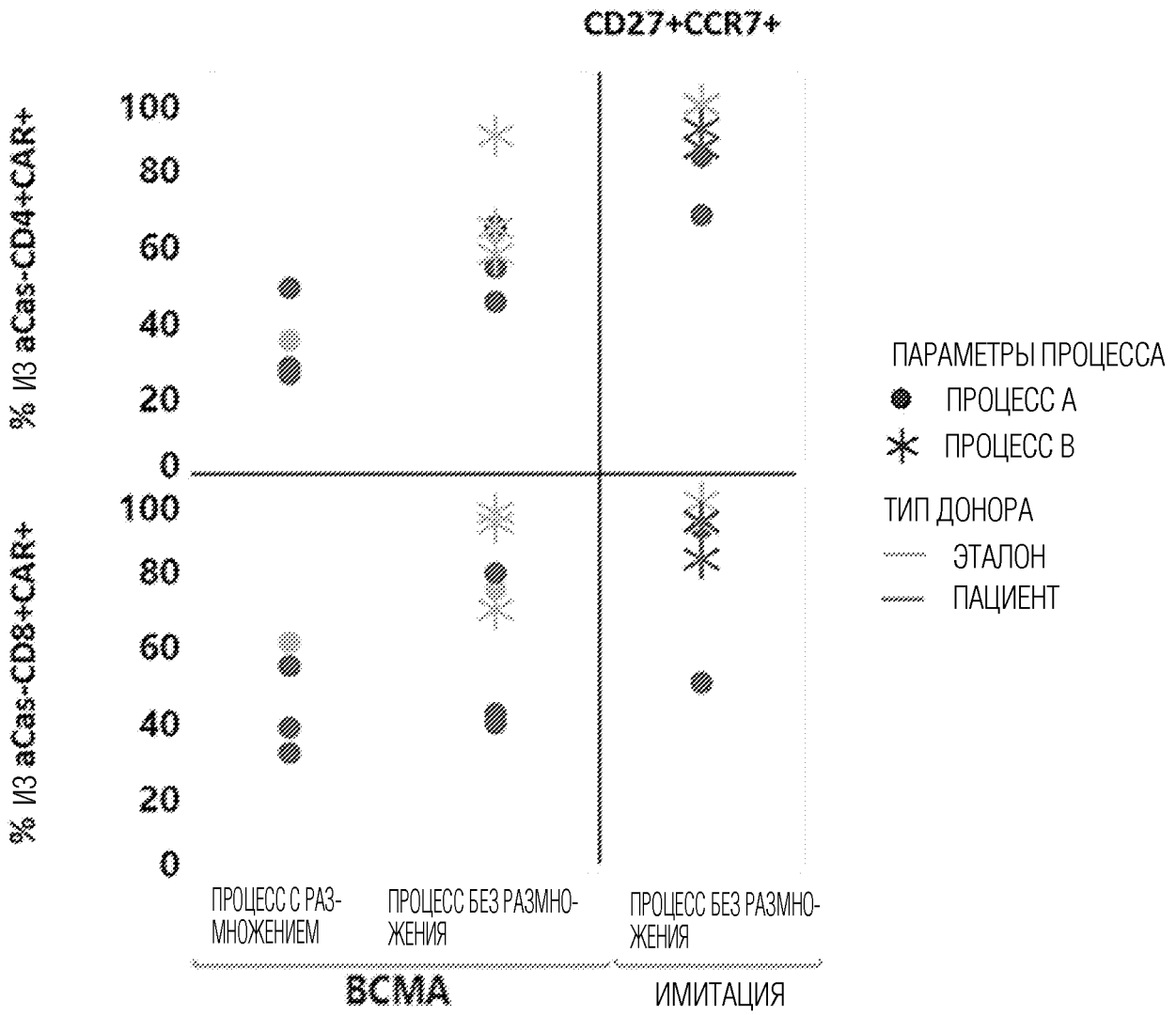
ФИГ. 5B

iVCN к CD3+CAR+%
%CD3+CAR+ из жизнеспособных CD45+
100
80
60
40
20
0
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
R² = 0.89525
i-VCN (CAR ср/клетки, всего клеток)

ФИГ. 5C


T NAIVE (CD45RA+CCR7+)
T CM (CD45RA-CCR7+)
T E+EM (CD45RA-CCR7-)
T EMRA (CD45RA+CCR7-)
% ИЗ aCas-CD4+CAR+
% ИЗ aCas-CD8+CAR+
0
20
40
60
80
ПРОЦЕСС С РАЗМНОЖЕНИЕМ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
BCMA
ИМИТАЦИЯ
ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА
ПРОЦЕСС А
ПРОЦЕСС В
ТИП ДОНОРА
ЭТАЛОН
ПАЦИЕНТ

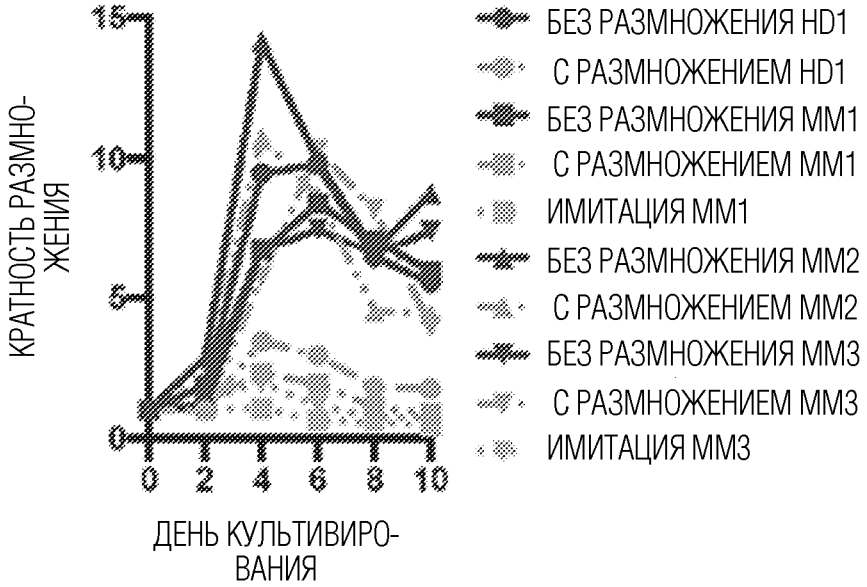
ФИГ. 6А


CD27+CCR7+
% ИЗ aCas-CD4+CAR+
% ИЗ aCas-CD8+CAR+
100
80
60
40
20
0
ПРОЦЕСС С РАЗМНОЖЕНИЕМ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
ПРОЦЕСС БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
BCMA
ИМИТАЦИЯ
ПАРАМЕТРЫ ПРОЦЕССА
ПРОЦЕСС А
ПРОЦЕСС В
ТИП ДОНОРА
ЭТАЛОН
ПАЦИЕНТ

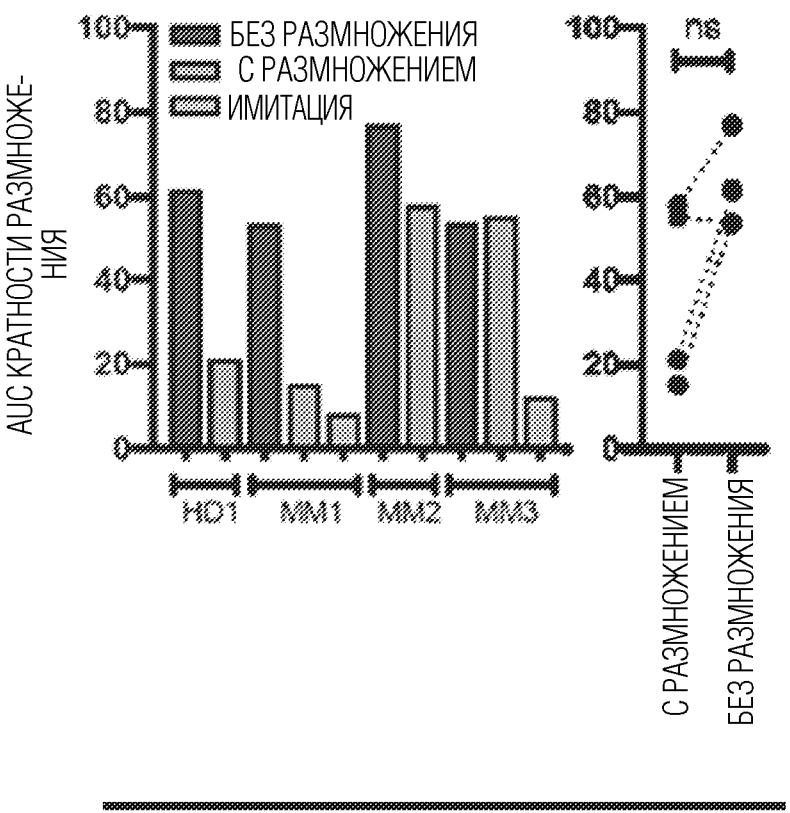
ФИГ. 6В

ФИГ. 7

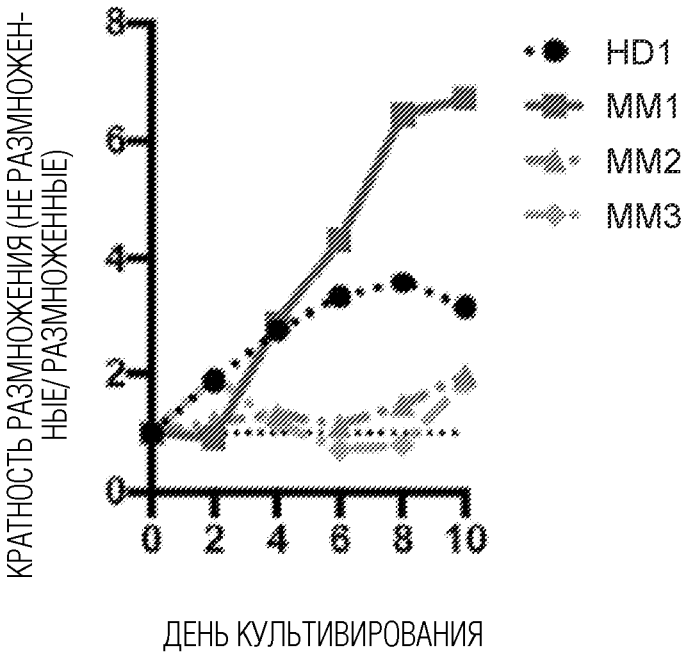
CD4+ Т-КЛЕТКИ
CD8+ Т-КЛЕТКИ
ПОДОБНЫЕ НАИВНЫМ
ЦЕНТРАЛЬНОЙ ПАМЯТИ
ЭФФЕКТОРНОЙ ПАМЯТИ
Temra
%CD4/CAR/CD45RA+CCR7+
%CD4/CAR/CD45RA-CCR7+
%CD4/CAR/CD45RA-CCR7-
%CD4/CAR/CD45RA+CCR7-
%CD8/CAR/CD45RA+CCR7+
%CD8/CAR/CD45RA-CCR7+
%CD8/CAR/CD45RA-CCR7-
%CD8/CAR/CD45RA+CCR7-
ns
*
HD1
MM1
MM3
MM2
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ


КРАТНОСТЬ РАЗМНО-
ЖЕНИЯ
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10
ДЕНЬ КУЛЬТИВИРО-
ВАНИЯ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ HD1
С РАЗМНОЖЕНИЕМ HD1
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ ММ1
С РАЗМНОЖЕНИЕМ ММ1
ИМИТАЦИЯ ММ1
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ ММ2
С РАЗМНОЖЕНИЕМ ММ2
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ ММ3
С РАЗМНОЖЕНИЕМ ММ3
ИМИТАЦИЯ ММ3

ФИГ. 8A


AUC КРАТНОСТИ РАЗМНОЖЕ-
НИЯ
100
80
60
40
20
0
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
ИМИТАЦИЯ
HD1
ММ1
ММ2
ММ3
ns
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ

ФИГ. 8B


КРАТНОСТЬ РАЗМНОЖЕНИЯ (НЕ РАЗМНОЖЕННЫЕ/ РАЗМНОЖЕННЫЕ)
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
ДЕНЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
HD1
MM1
MM2
MM3

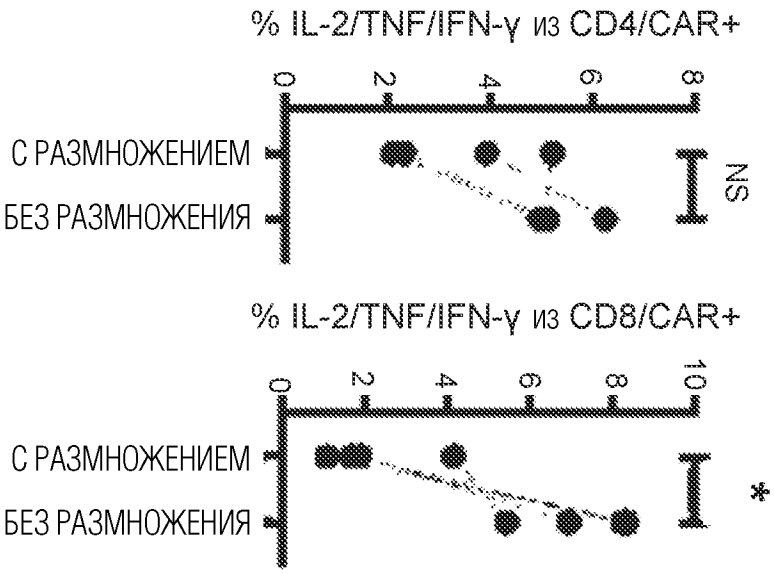
ФИГ. 8C

ФИГ. 9A

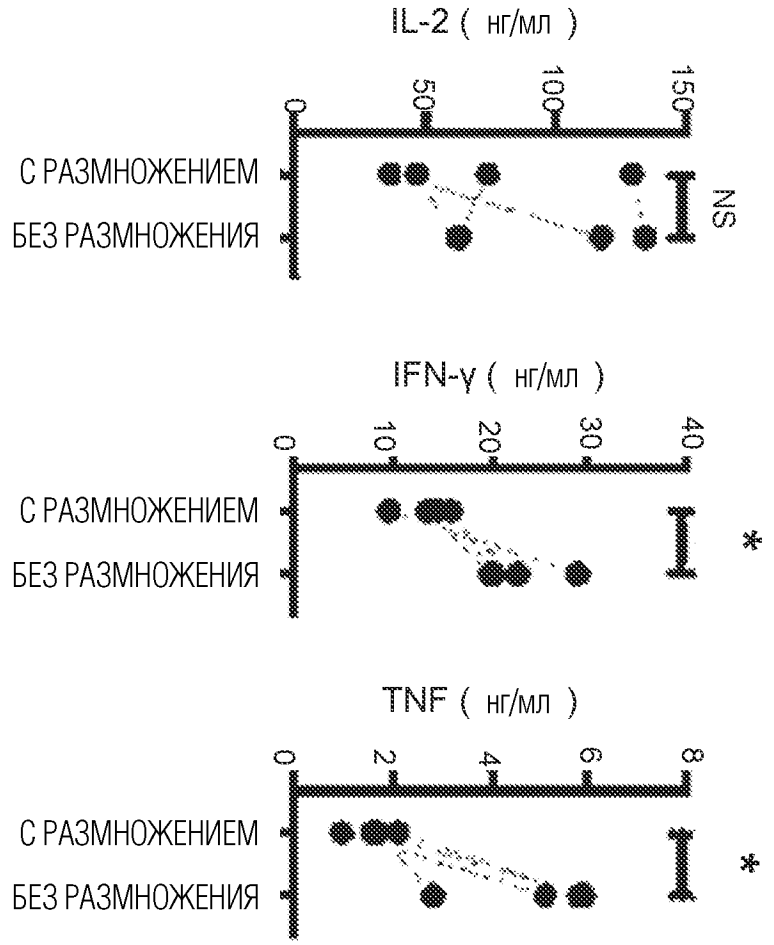
ФИГ. 9B

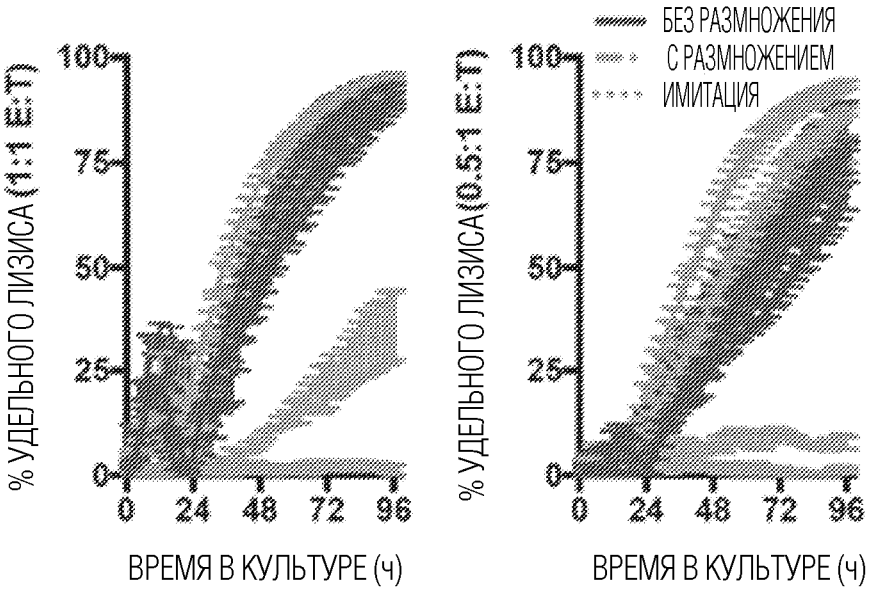
ФИГ. 9C

ФИГ. 9D

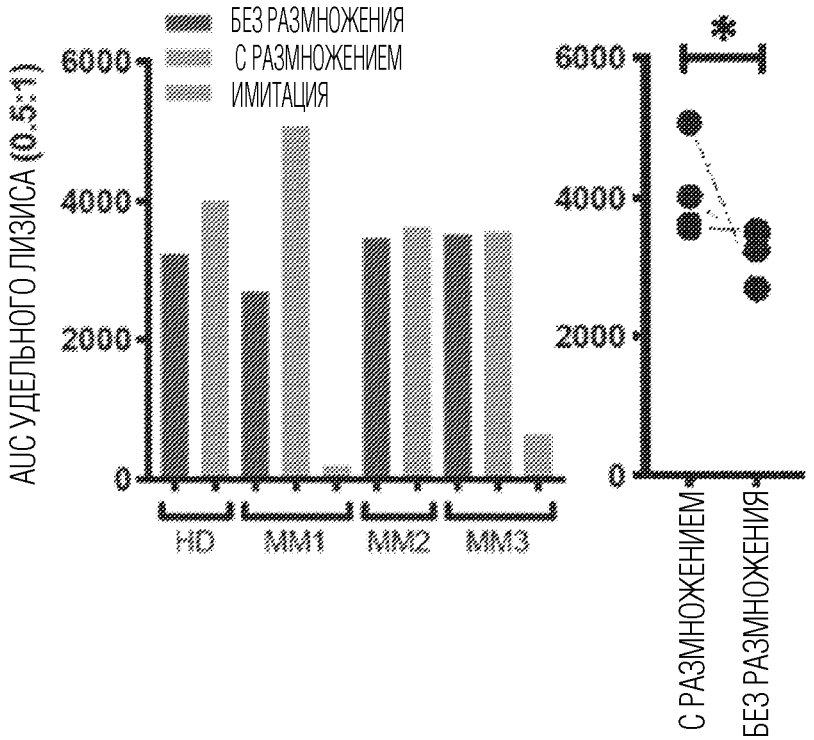

% IL-2/TNF/IFN-γ из CD4/CAR+
0
2
4
6
8
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
NS
% IL-2/TNF/IFN-γ из CD8/CAR+
0
2
4
6
8
10
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
*

ФИГ. 9E

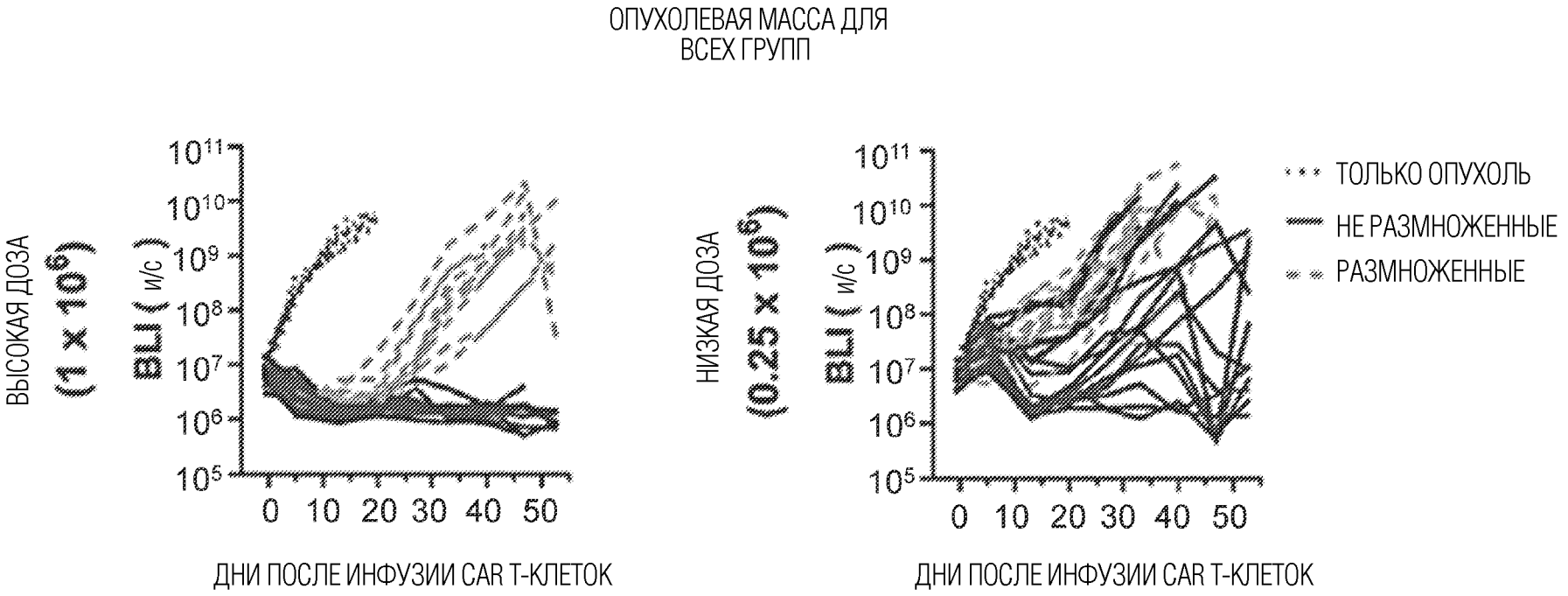

IL-2 (нг/мл)
0
50
100
150
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
NS
IFN-γ (нг/мл)
0
10
20
30
40
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
*
TNF (нг/мл)
0
2
4
6
8
С РАЗМНОЖЕНИЕМ
БЕЗ РАЗМНОЖЕНИЯ
*



ФИГ. 10A



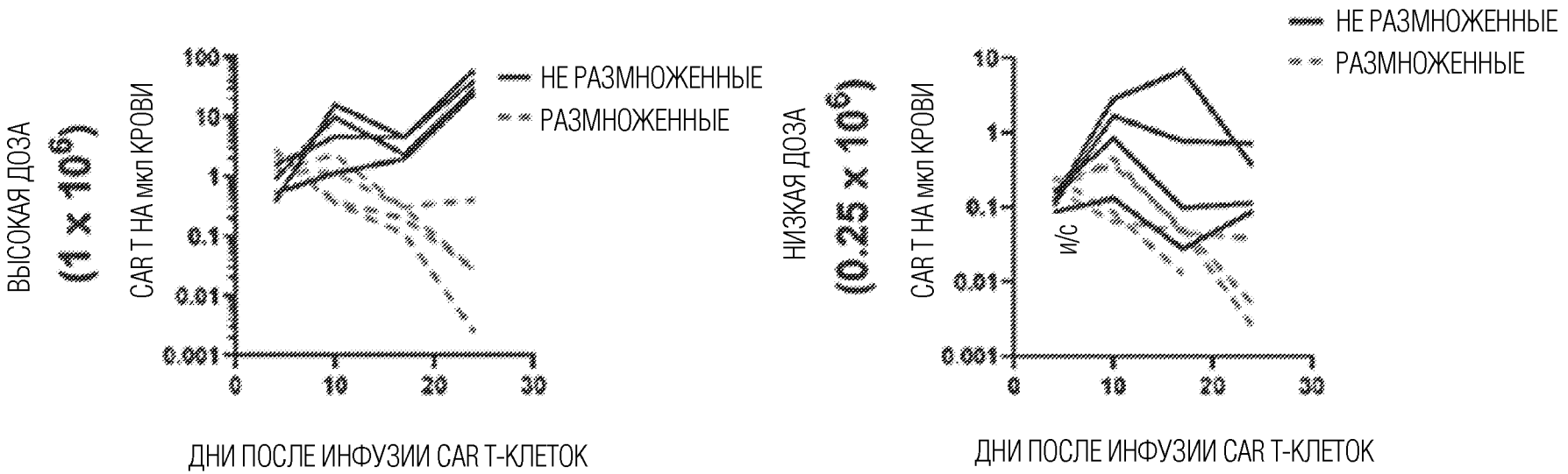
ФИГ. 10B


ОПУХОЛЕВАЯ МАССА ДЛЯ ВСЕХ ГРУПП
ВЫСОКАЯ ДОЗА
(1 x 10^6)
BLI (и/с)
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0 10 20 30 40 50
ДНИ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ CAR Т-КЛЕТОК
НИЗКАЯ ДОЗА
(0.25 x 10^6)
BLI (и/с)
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0 10 20 30 40 50
ДНИ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ CAR Т-КЛЕТОК
ТОЛЬКО ОПУХОЛЬ
НЕ РАЗМНОЖЕННЫЕ
РАЗМНОЖЕННЫЕ

ФИГ. 11А

ДНИ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ CAR T-КЛЕТОК
ВЫСОКАЯ ДОЗА
(1 x 10^6)
BLI AUC
10^12
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
*
MM1
HD1
MM3
MM2
НЕ РАЗМНОЖЕННЫЕ
РАЗМНОЖЕННЫЕ
НИЗКАЯ ДОЗА
(0.25 x 10^6)
BLI AUC
10^12
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
ns
MM1
HD1
MM3
MM2
НЕ РАЗМНОЖЕННЫЕ
РАЗМНОЖЕННЫЕ

ФИГ. 11B


КИНЕТИКА CAR T
ВЫСОКАЯ ДОЗА
(1 x 10^6)
CAR T НА мкл КРОВИ
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
10
20
30
НЕ РАЗМНОЖЕННЫЕ
РАЗМНОЖЕННЫЕ
ДНИ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ CAR T-КЛЕТОК
НИЗКАЯ ДОЗА
(0.25 x 10^6)
CAR T НА мкл КРОВИ
10
1
0.1
0.01
0.001
и/с
0
10
20
30
НЕ РАЗМНОЖЕННЫЕ
РАЗМНОЖЕННЫЕ
ДНИ ПОСЛЕ ИНФУЗИИ CAR T-КЛЕТОК

ФИГ. 12A

ФИГ. 12B

АБСОЛЮТНОЕ КОЛИЧЕСТВО CAR T
ДЕНЬ 4
ДЕНЬ 10
ДЕНЬ 17
ДЕНЬ 24
ВЫСОКАЯ ДОЗА
(1 x 10^6)
НИЗКАЯ ДОЗА
(0.25 x 10^6)
CAR T НА мкл КРОВИ
ns
*
NE
E