



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.14

(21) Номер заявки
202091912

(22) Дата подачи заявки
2019.02.08

(51) Int. Cl. **C12N 5/0783 (2010.01)**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ Т-КЛЕТОК

(31) 62/628,521; 10 2018 102 971.3;
62/633,113; 10 2018 104 628.6;
62/647,571; 10 2018 108 996.1;
62/726,350
(32) 2018.02.09; 2018.02.09; 2018.02.21;
2018.02.28; 2018.03.23; 2018.04.16;
2018.09.03
(33) US; DE; US; DE; US; DE; US
(43) 2021.04.22
(86) PCT/US2019/017237
(87) WO 2019/157298 2019.08.15
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИММАТИКС ЮС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Калра Мамта, Коуглин Зое, Алперт
Амир, Вальтер Штеффен, Мохамед
Али, Бургонь Агате (US)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Угрюмов В.М. (RU)**

(56) Christopher T Petersen ET AL.: "Improving T-cell expansion and function for adoptive T-cell therapy using ex vivo treatment with PI3Kd inhibitors and VIP antagonists", Blood Advances, 31 January 2018 (2018-01-31), XP055586570, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5812323/pdf/advances011254.pdf> [retrieved on 2019-05-08], the whole document, Materials and methods
WO-A1-2017176932

XIAO-YI TANG ET AL.: "Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol", BMJ OPEN, vol. 6, no. 12, 30 December 2016 (2016-12-30), page e013904, XP055449362, ISSN: 2044-6055, DOI: 10.1136/bmjopen-2016-013904, the whole document, Methods
WO-A1-2015164745
WO-A2-2016014789
WO-A1-2017211900

SARAH KUTSCHER ET AL.: "Overnight Resting of PBMC Changes Functional Signatures of Antigen Specific T-Cell Responses: Impact for Immune Monitoring within Clinical Trials", PLOS ONE, vol. 8, no. 10, 11 October 2013 (2013-10-11), page e76215, XP055586241, DOI: 10.1371/journal.pone.0076215, the whole document, Materials and methods

(57) Изобретение касается способов получения Т-клеток для адоптивной иммунотерапии. Согласно этому изобретению предлагаются также способы генной трансдукции Т-клеток, способы применения Т-клеток и полученные с их помощью популяции Т-клеток. В одном аспекте в данном изобретении предложены способы размораживания замороженных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), перевода размороженных МКПК в стадию покоя, активации Т-клетки в культивированных МКПК при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, иммобилизованных на твердой фазе, трансдукции активированной Т-клетки вектором, экспансии трансдуцированной Т-клетки и получения экспансированных Т-клеток.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на настоящий патент является предварительной заявкой на патент США, в которой испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/726350, поданной 3 сентября 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/647571, поданной 23 марта 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/633113, поданной 21 февраля 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/628521, поданной 9 февраля 2018 г., заявки на патент Германии № 10 2018 108 996.1, поданной 16 апреля 2018 г.; заявки на патент Германии № 10 10 2018 104 628.6, поданной 28 февраля 2018 г.; и заявки на патент Германии № 10 2018 102 971.3, поданной 9 февраля 2018 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение касается способов получения Т-клеток для адоптивной иммунотерапии. Данное изобретение касается способов получения Т-клеток для адоптивной иммунотерапии. Согласно этому изобретению, предлагаются также способы генной трансдукции Т-клеток, способы применения Т-клеток и полученные с их помощью популяции Т-клеток.

Уровень техники

В последнее время перенаправление специфичности Т-клеток на опухолеассоциированные антигены за счет усиленной генетическими методами экспрессии Т-клеточных рецепторов (ТКР) или химерных антигенных рецепторов (CAR) способствует развитию сферы адоптивного переноса Т-клеток. Использование CAR второго и третьего поколений помогает решить давнюю проблему недостаточной стойкости Т-клеток *in vivo* после переноса, что значительно снижало их эффективность. Тем не менее, всё ещё имеются большие препятствия к более широкому их применению, такие как необходимость получения персонализированных Т-клеточных продуктов, что вряд ли способствует экономической осуществимости этого перспективного подхода к лечению. Хотя и была показана перспективность использования Т-клеток, к примеру, аутологичных Т-клеток, может оказаться трудным получить достаточное количество аутологичных клеток у пациентов, прошедших интенсивное предшествующее лечение.

В патентных заявках США № 2003/0170238 и 2003/0175272 описаны способы адоптивной иммунотерапии, в которых Т-клеткам позволяли переходить в стадию покоя путем лишения активационных стимулов в течение по меньшей мере 48-72 часов, обычно по меньшей мере примерно 72-120 часов, а затем их реактивации перед инфузией путем мечения клеток, например, митогенными моноклональными антителами (mAb), такими как растворимые моноклональные антитела к CD3 и CD28, а затем смешивания меченых клеток с аутологичными моноклеарами, популяция которых опционально могла быть усилена моноцитами и гранулоцитами.

В патентной заявке США № 2017/0051252 описаны способы получения терапевтических средств на основе Т-клеток, которые включают стадии: получения популяции клеток, содержащей Т-клетки и антиген-презентирующие клетки (АПК); культивирования популяции клеток в среде для культивирования, содержащей (i) один или более цитокинов, (ii) антитело к CD3 или его фрагмент, связывающий CD3, и (iii) антитело к CD28 или его фрагмент, связывающий CD28, B7-1 или его фрагмент, связывающий CD28, B7-2 или его фрагмент, связывающий CD28, культивирование в которой активирует или стимулирует Т-клетки; трансдукции популяции активированных клеток вирусным вектором; и культивирования популяции клеток в питательной среде с целью экспансии трансдуцированных Т-клеток; таким образом получая терапевтические средства на основе Т-клеток.

Существует потребность в усовершенствованных стратегиях трансдукции клеточных популяций *in vitro*, которые смогут обеспечить получение достаточного количества Т-клеток для исследовательских, диагностических и терапевтических целей. Решение этой технической проблемы приводится в данном документе.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте данное раскрытие сущности изобретения касается способа трансдукции Т-клетки, включающего размораживание замороженных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), перевод размороженных МКПК в стадию покоя, активацию Т-клетки в культивированных МКПК при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, трансдукцию активированной Т-клетки вектором, экспансию трансдуцированной Т-клетки и получение экспансированных Т-клеток.

В одном аспекте Т-клетка активируется в культивированных МКПК посредством антитела к CD3 и антитела к CD28, иммобилизованных на твердофазной подложке.

В другом аспекте стадия покоя может длиться в течение не более чем примерно 1 часа, не более чем примерно 2 часов, не более чем примерно 3 часов, не более чем примерно 4 часов, не более чем примерно 5 часов, не более чем примерно 6 часов, не более чем примерно 7 часов, не более чем примерно 8 часов, не более чем примерно 9 часов, не более чем примерно 10 часов, не более чем примерно 11 часов, не более чем примерно 12 часов, не более чем примерно 18 часов, не более чем примерно 24 часов, не более чем примерно 48 часов, не более чем примерно 36 часов, не более чем примерно 48 часов, не более чем примерно 60 часов, не более чем примерно 72 часов, не более чем примерно 84 часов, не более чем примерно 96 часов, не более чем примерно 108 часов или не более чем примерно 120 часов.

В другом аспекте стадия покоя может длиться в течение периода времени от примерно 0,5 часа до

более чем примерно 28 часов, не более чем примерно 30 часов, не более чем примерно 36 часов, не более чем примерно 48 часов, не более чем примерно 60 часов, не более чем примерно 72 часа, не более чем примерно 84 часа, не более чем примерно 96 часов, не более чем примерно 108 часов или не более чем примерно 120 часов.

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

В одном аспекте Т-клетки, описанные в данном документе, являются аутологичными для пациента или индивида. В другом аспекте Т-клетки, описанные в данном документе, являются аллогенными для пациента или индивида.

В другом аспекте твердая фаза, описанная здесь, может быть поверхностью микрогранулы, планшета, флакона или мешка.

В еще одном аспекте описанный здесь планшет может быть 6-луночным, 12-луночным или 24-луночным планшетом.

В одном аспекте описанная здесь флакон имеет площадь засеваемой поверхности по меньшей мере примерно 25 см², примерно 75 см², примерно 92,6 см², примерно 100 см², примерно 150 см², примерно 162 см², примерно 175 см², примерно 225 см², примерно 235 см², примерно 300 см², примерно 1720 см², от примерно 25 см² до примерно 75 см², от примерно 25 см² до примерно 225 см² или от примерно 25 см² до примерно 1720 см².

В другом аспекте описанный здесь мешок может иметь объем от примерно 50 мл до примерно 100 литров, от примерно 100 мл от примерно 100 л, от примерно 150 мл до примерно 100 л, от примерно 200 мл до примерно 100 л, от примерно 250 мл до примерно 100 л, от примерно 500 мл до примерно 100 л, от примерно 1 л до примерно 100 л, от примерно 1 л до примерно 75 л, от примерно 1 л до примерно 50 л, от примерно 1 л до примерно 25 л, от примерно 1 л до примерно 20 л, от примерно 1 л до примерно 15 л, от примерно 1 л до примерно 10 л, от примерно 1 л до примерно 5 л, от примерно 1 л до примерно 2,5 л или от примерно 1 л до примерно 2 л.

В еще одном аспекте описанная здесь активация может проводиться в присутствии стимула активации Т-клеток.

В одном аспекте описанные здесь цитокины могут включать интерлейкин 2 (ИЛ-2), интерлейкин 7 (ИЛ-7), интерлейкин 15 (ИЛ-15) и (или) интерлейкин 21 (ИЛ-21).

В другом аспекте концентрация ИЛ-7 может составлять не более чем примерно 1 нг/мл, не более чем примерно 2 нг/мл, не более чем примерно 3 нг/мл, не более чем примерно 4 нг/мл, не более чем примерно 5 нг/мл, не более чем примерно 6 нг/мл, не более чем примерно 7 нг/мл, не более чем примерно 8 нг/мл, не более чем примерно 9 нг/мл, не более чем примерно 10 нг/мл, не более чем примерно 11 нг/мл, не более чем примерно 12 нг/мл, не более чем примерно 13 нг/мл, не более чем примерно 14 нг/мл, не более чем примерно 15 нг/мл, не более чем примерно 16 нг/мл, не более чем примерно 17 нг/мл, не более чем примерно 18 нг/мл, не более чем примерно 19 нг/мл, не более чем примерно 20 нг/мл, не более чем примерно 25 нг/мл, не более чем примерно 30 нг/мл, не более чем примерно 35 нг/мл, не более чем примерно 40 нг/мл, не более чем примерно 45 нг/мл, не более чем примерно 50 нг/мл, не более чем примерно 60 нг/мл, не более чем примерно 70 нг/мл, не более чем примерно 80 нг/мл, не более чем примерно 90 нг/мл или не более чем примерно 100 нг/мл.

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

В еще одном аспекте концентрация ИЛ-15 может быть не более чем примерно 5 нг/мл, не более чем примерно 10 нг/мл, не более чем примерно 15 нг/мл, не более чем примерно 20 нг/мл, не более чем примерно 25 нг/мл, не более чем примерно 30 нг/мл, не более чем примерно 35 нг/мл, не более чем примерно 40 нг/мл, не более чем примерно 45 нг/мл, не более чем примерно 50 нг/мл, не более чем примерно 60 нг/мл, не более чем примерно 70 нг/мл, не более чем примерно 80 нг/мл, не более чем примерно 90 нг/мл, не более чем примерно 100 нг/мл, не более чем примерно 110 нг/мл, не более чем примерно 120 нг/мл, не более чем примерно 130 нг/мл, не более чем примерно 140 нг/мл, не более чем примерно 150 нг/мл, 200

примерно 24 часов, от примерно 12 часов до примерно 24 часов, от примерно 12 часов до примерно 48 часов, от примерно 12 часов до примерно 72 часов, от примерно 24 часов до примерно 72 часов или от примерно 36 часов до примерно 72 часов.

В другом аспекте описанный здесь вирусный вектор может быть γ -ретровирусным вектором, экспрессирующим Т-клеточный рецептор (ТКР).

В еще одном аспекте описанный здесь вирусный вектор может быть γ -лентивирусным вектором, экспрессирующим ТКР.

В одном аспекте описанная здесь трансдукция может быть проведена в присутствии стимула активации Т-клеток.

В одном аспекте описанная здесь экспансия может быть проведена в присутствии стимула активации Т-клеток.

В одном аспекте описанная здесь экспансия может быть проведена в течение периода времени не более чем примерно 1 день, не более чем примерно 2 дня, не более чем примерно 3 дня, не более чем примерно 4 дня, не более чем примерно 5 дней, не более чем примерно 6 дней, не более чем примерно 7 дней, не более чем примерно 8 дней, не более чем примерно 9 дней, не более чем примерно 10 дней, не более чем примерно 15 дней, не более чем примерно 20 дней, не более чем примерно 25 дней или не более чем примерно 30 дней.

В другом аспекте описанная здесь экспансия может быть проведена в течение периода времени от примерно 1 дня до примерно 30 дней, от примерно 1 дня до примерно 25 дней, от примерно 1 дня до примерно 20 дней, от примерно 1 дня до примерно 15 дней, от примерно 1 дня до примерно 10 дней, от примерно 2 дней до примерно 10 дней, от примерно 3 дней до примерно 10 дней, от примерно 4 дней до примерно 10 дней, от примерно 4 дней до примерно 30 дней, от примерно 6 дней до примерно 25 дней, от примерно 10 дней до примерно 30 дней или от примерно 12 дней до примерно 30 дней.

В одном аспекте количество полученных Т-клеток может составлять по меньшей мере примерно 1×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 2×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 3×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 4×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 5×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 6×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 7×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 8×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 9×10^9 , может составлять по меньшей мере примерно 1×10^{10} , может составлять по меньшей мере примерно 5×10^{10} , может составлять по меньшей мере примерно 1×10^{11} , может составлять по меньшей мере примерно 5×10^{11} , может составлять по меньшей мере примерно 1×10^{12} , может составлять по меньшей мере примерно 5×10^{12} или может составлять по меньшей мере примерно 1×10^{13} клеток.

В другом аспекте количество полученных Т-клеток может составлять от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{13} , от примерно 1×10^9 до примерно 5×10^{12} , от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{12} , от примерно 1×10^9 до примерно 5×10^{11} , от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{11} , от примерно 1×10^9 до примерно 5×10^{10} , от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 2×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 3×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 4×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 5×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 6×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 7×10^9 до примерно 1×10^{10} , от примерно 8×10^9 до примерно 1×10^{10} или от примерно 9×10^9 до примерно 1×10^{10} клеток.

В одном аспекте полученные Т-клетки могут быть CD3+CD8+ Т-клеткой и/или CD3+CD4+ Т-клетками.

В другом аспекте МКПК могут быть получены у пациента.

В еще одном аспекте данное раскрытие сущности касается генетически трансдуцированных Т-клеток, полученных с помощью способа, описанного в данном документе.

В другом аспекте данное раскрытие касается фармацевтических композиций, содержащих генетически трансдуцированные Т-клетки, полученные с помощью способа, описанного в данном документе, и фармацевтически приемлемые носители.

В другом аспекте данное раскрытие касается способа получения популяции Т-клеток, включающего размораживание замороженных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), перевод размороженных МКПК в стадию покоя, активацию Т-клетки в МКПК в стадии покоя при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, иммобилизованных на твердой фазе, экспансию активированной Т-клетки и получение популяции Т-клеток, содержащей экспансированные Т-клетки.

В еще одном аспекте данное раскрытие касается популяции Т-клеток, полученной с помощью способа, описанного в данном документе.

В другом аспекте данное раскрытие касается способов лечения пациента или индивида, больного раком или нуждающегося в его лечении, включающем введение пациенту эффективного количества описанных здесь экспансированных Т-клеток. В одном аспекте пациент или индивид, нуждающийся в нем, является раковым больным. В одном аспекте рак, подлежащий лечению, выбран из одного или более из гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечно-клеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПРЖ),

рака предстательной железы (РПРЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (МРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и рака матки (РЭМ).

В другом аспекте экспансия может быть проведена в присутствии по меньшей мере одного цитокина, выбранного из группы, состоящей из ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-21. В одном аспекте экспансия происходит в присутствии комбинации ИЛ-7 и ИЛ-15.

В другом аспекте размораживание, пребывание в стадии покоя, активация, трансдукция, экспансия и/или получение могут проводиться в закрытой системе.

В другом аспекте данное изобретение касается способа получения популяции Т-клеток, включая получение свежих мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), т.е. МКПК не получают размораживанием подвергнутых криоконсервации МКПК, активацию Т-клеток в свежих МКПК при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, трансдукцию активированных Т-клеток вирусным вектором, экспансию трансдуцированной Т-клетки и сбор экспансированных Т-клеток.

В одном аспекте получение и активация могут проводиться в течение не более чем 1 дня.

В одном аспекте экспансия может проводиться в течение более чем 1 дня.

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

В другом аспекте сбор клеток после активации может быть проведен в течение периода времени от примерно 4 дней до примерно 12 дней, от примерно 4 дней до примерно 11 дней, от примерно 4 дней до примерно 10 дней, от примерно 4 дней до примерно 9 дней, от примерно 4 дней до примерно 8 дней, от примерно 4 дней до примерно 7 дней, от примерно 4 дней до примерно 6 дней, от примерно 4 дней до примерно 5 дней, от примерно 5 дней до примерно 12 дней, от примерно 5 дней до примерно 11 дней, от примерно 5 дней до примерно 10 дней, от примерно 5 дней до примерно 9 дней, от примерно 5 дней до примерно 8 дней, от примерно 5 дней до примерно 7 дней или от примерно 5 дней до примерно 6 дней.

В другом аспекте количество собранных Т-клеток может быть выбрано из группы, состоящей от примерно 2×10^9 до примерно 5×10^9 , от примерно 5×10^9 до примерно 10×10^9 , от примерно 10×10^9 до примерно 15×10^9 , от примерно 5×10^9 до примерно 35×10^9 , от примерно 5×10^9 до примерно 30×10^9 , от примерно 10×10^9 до примерно 30×10^9 , от примерно 15×10^9 до примерно 20×10^9 , от примерно 20×10^9 до примерно 35×10^9 , от примерно 24×10^9 до примерно 33×10^9 и от примерно $24,8 \times 10^9$ до примерно $32,2 \times 10^9$.

В другом аспекте активация, трансдукция, экспансия и сбор могут проводиться в закрытой или полужакрытой системе.

В другом аспекте закрытой системой могут являться биореакторы CliniMACS, Prodigy™, WAVE (XURI™), WAVE (XURI™) в сочетании с BioSafe Sepax™ II, закрытая система G-Rex/GatheRex™ или закрытая система G-Rex/GatheRex™ в сочетании с BioSafe Sepax™ II.

Краткое описание фигур

Для более глубокого понимания сущности, целей и преимуществ данного изобретения следует сослаться на последующее подробное описание изобретения, предоставленное в сочетании со следующими рисунками, на которых одинаковые ссылочные позиции относятся к одним и тем же или сходным элементам.

На фиг. 1А и 1В показана утрата фенотипов $T_{naive/scm}$ и T_{cm} за счет длительного культивирования ex vivo Т-клеток, полученных у разных доноров.

На фиг. 2 показано снижение секреции ИФН-гамма полученными у разных доноров клетками в день 15 роста в сравнении с клетками в день 10 роста.

На фиг. 3 показана экспериментальная разработка исследования влияния условий стадии покоя на активацию и экспансию Т-клеток.

На фиг. 4 показаны уровни экспрессии CD25, CD69 и hLDL-R в различных экспериментальных группах.

На фиг. 5А и 5В показана кратность экспансии и жизнеспособность клеток в разных экспериментальных группах в день 7 экспансии и в день 10 экспансии, соответственно.

На фиг. 6 показаны кратность экспансии и жизнеспособность активированных Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором в различных экспериментальных группах в день 9.

На фиг. 7 показаны кратность экспансии и жизнеспособность активированных Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором в различных экспериментальных группах в день 9.

На фиг. 8 показана трансгенная экспрессия в Т-клетках при разных значениях длительности стадии покоя и разных масштабах производства.

На фиг. 9 показана кратность экспансии в день 10 при разных значениях времени пребывания в стадии покоя и разных масштабах производства.

На фиг. 10 показана экспериментальная разработка исследования влияния концентрации антител к CD3 и к CD28 на активацию Т-клеток.

На фиг. 11 показаны уровни экспрессии CD25, CD69 и hLDL-R в Т-клетках, активированных различными концентрациями антител к CD3 и к CD28.

На фиг. 12 показаны результаты подсчета числа клеток для Т-клеток, активированных различными концентрациями антител к CD3 и к CD28 в присутствии различных концентраций ИЛ-15, полученные в день 10 экспансии.

На фиг. 13 показано окрашивание тетрамерами Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантным ТКР, активированных различными концентрациями антител к CD3 и к CD28 в присутствии различных концентраций ИЛ-15.

На фиг. 14А показана процентная доля CD3⁺CD8⁺тетрамер⁺ Т-клеток, полученная при различной длительности процесса активации.

На фиг. 14В показана трансгенная экспрессия, полученная при различной длительности процесса активации.

На фиг. 15 показаны уровни экспрессии CD25, CD69 и hLDL-R в Т-клетках, активированных антителами к CD3 и к CD28, связанными на планшете или связанными на поверхности флакона.

На фиг. 16А показаны уровни трансдукции в активированных Т-клетках, связанных с флаконом (FB) и связанных с планшетом (PB).

На фиг. 16В показана кратность экспансии в активированных Т-клетках, связанных с флаконом (FB) и связанных с планшетом (PB).

На фиг. 17 показаны уровни антиген-стимулированной продукции ИФН-гамма, вызванные активированными связанными с флаконом (FB), трансдуцированными LV-R73 (лентивирусным вектором, экспрессирующим Т-клеточный рецептор) Т-клетками и активированными связанными с планшетом (PB) трансдуцированными Т-клетками в ответ на опухолевые клетки, экспрессирующие опухолеассоциированный антиген (ТАА), у разных доноров.

На фиг. 18 показана экспериментальная разработка исследования влияния использования мешков и планшетов с нанесенными на их поверхность антителами к CD3 и к CD28 на активацию Т-клеток.

На фиг. 19 показаны уровни экспрессии CD25, CD69 и LDL-R в Т-клетках, активированных связанными с мешком или связанными с флаконом антителами к CD3 и к CD28.

На фиг. 20 показаны данные по экспансии клеток в день 6, полученные на Т-клетках, активированных нанесенными на поверхность мешков антителами при различных концентрациях, и аналогичные данные на Т-клетках, активированных в условиях FB.

На фиг. 21 показаны данные по экспансии клеток в день 10, полученные на Т-клетках, активированных нанесенными на поверхность мешков антителами при различных концентрациях, и аналогичные данные на Т-клетках, активированных в условиях FB.

На фиг. 22 показана схема способа производства Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления данного изобретения.

На фиг. 23А показана кратность экспансии-Т-клеток, полученных в соответствии с одним из вариантов осуществления данного изобретения.

На фиг. 23В показаны данные по экспрессии ТКР-трансдуцированных Т-клеток, полученных в соответствии с одним из вариантов осуществления данного изобретения.

На фиг. 23С показаны фенотипы Т-клеток, произведенных в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

На фиг. 23D показаны данные по ингибирующему действию Т-клеток, полученных в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения, на рост опухолевых клеток.

На фиг. 23Е показаны данные по ингибирующему действию Т-клеток, полученных в соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения, на рост опухолевых клеток.

На фиг. 23F показаны данные по ингибирующему действию Т-клеток, полученных в соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения, на рост опухолевых клеток.

На фиг. 23G показаны данные для активности Т-клеток, полученных в соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения, по уничтожению опухолевых клеток.

На фиг. 23H показаны данные для активности Т-клеток, полученных в соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения, по уничтожению опухолевых клеток.

На фиг. 24 показана схема способа производства Т-клеток с длительностью стадии покоя в течение

ночи (примерно 16 часов).

На фиг. 25А показана кратность экспансии Т-клеток, произведенных с длительностью стадии покоя в течение ночи (примерно 16 часов).

На фиг. 25В показана экспрессия ТКР-трансдуцированных Т-клеток, полученных в соответствии с одним из вариантов осуществления данного изобретения, произведенных с длительностью стадии покоя в течение ночи (примерно 16 часов).

На фиг. 25С показаны фенотипы Т-клеток, произведенных с длительностью стадии покоя в течение ночи (примерно 16 часов).

На фиг. 25D показаны данные по ингибирующему действию Т-клеток, произведенных с длительностью стадии покоя в течение ночи (примерно 16 часов), на рост опухолевых клеток.

На фиг. 25Е и 25F показана цитотоксическая активность Т-клеток, произведенных с длительностью стадии покоя в течение ночи (примерно 16 часов).

На фиг. 26 изображен протокол манипуляций *ex vivo* для открытых и закрытых систем.

На фиг. 27 изображен протокол манипуляций *ex vivo* для закрытой системы в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 28 изображен протокол манипуляций *ex vivo* для закрытой системы в соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 29 показано высвобождение ИФН-гамма из Т-клеток, полученных в открытых и закрытых системах.

На фиг. 30 показана схема способа производства Т-клеток в соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения.

На фиг. 31 показано типичное общее время производственного цикла от сбора клеток за одну процедуру лейкафереза до готовности к инфузии в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения. LP[#] - сбор клеток за одну процедуру лейкафереза, их обработка и замораживание (необязательное). CoA -дополнительное время, необходимое для выписки Сертификата анализа.

На фиг. 32 показана схема способа производства Т-клеток в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 33 показаны результаты фенотипирования Т-клеток памяти, полученных по способу производства в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 34 показано фенотипирование Т-клеток, полученных по способу производства в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения, при костимулирующем воздействии CD27 и CD28.

На фиг. 35 показан рост Т-клеток, индуцированный ИЛ-2, ИЛ-15 или ИЛ-2, снижающийся зависимым от времени экспансии образом, в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 36 показано снижение секреции ИФН-гамма зависимым от времени экспансии образом, в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 37 показано увеличение EC₅₀ зависимым от времени экспансии образом, в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 38 показана система показателей экспансии в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 39 показана поверхностная экспрессия ТКР в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 40 показаны результаты фенотипирования Т-клеток памяти конечных продуктов в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 41 показано высвобождение ИФН-гамма в ответ на воздействие клеток-мишеней в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 42 показано определение EC₅₀ в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 43 показан цитотоксический потенциал Т-клеток в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 44 приведено сравнение восстановления клеток для Т-клеточных продуктов, полученных у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 45 показано сравнение жизнеспособности клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 46 показано сравнение кратности экспансии между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 47 показано сравнение фенотипа клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 48 показано сравнение фенотипа клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у

здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 49 показана экспрессия ТКР Т-клеточными продуктами в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 50 показано сравнение экспрессии ТКР между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 51 показано сравнение экспрессии ТКР между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 52 показана схема гейтирования и популяции T_{memory} в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 53 показано сравнение фенотипа клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 54 показана экспрессия цитокинов Т-клеточными продуктами в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 55 показана экспрессия цитокинов Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 56 показано сравнение экспрессии цитокинов между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 57 показано высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточных продуктов, полученных у больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 58 показано высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточных продуктов, полученных у здоровых доноров, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 59 показано высвобождение ИФН- γ из Т-клеточных продуктов, полученных у здоровых доноров, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 60 показано высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточных продуктов, полученных у больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 61 показаны данные для активности Т-клеточных продуктов, полученных у здоровых доноров, по уничтожению опухолевых клеток, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 62 показаны данные для активности Т-клеточных продуктов, полученных у здоровых доноров, по уничтожению опухолевых клеток, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 63А показано сравнение данных по уничтожению клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 63В показано сравнение данных по уничтожению клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

На фиг. 63С показано сравнение данных по уничтожению клеток между Т-клеточными продуктами, полученными у здоровых доноров и больных раком, в соответствии с вариантом осуществления данного изобретения.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте в данном раскрытии предложены популяции Т-клеток, полученные с помощью способа, включающего размораживание замороженных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), перевод размороженных МКПК в стадию покоя, активацию Т-клетки в МКПК в стадии покоя при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, иммобилизованных на твердой фазе, экспансию активированной Т-клетки и получение популяции Т-клеток, содержащей экспансированные Т-клетки.

В одном аспекте в данном раскрытии предложены способы трансдукции Т-клетки, включающие размораживание замороженных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), перевод размороженных МКПК в стадию покоя, активацию Т-клетки в культивированных МКПК при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, трансдукцию активированной Т-клетки вектором, экспансию трансдуцированной Т-клетки и получение экспансированных Т-клеток; способ получения популяции Т-клеток, включающий размораживание замороженных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), перевод оттаявших МКПК в стадию покоя, активацию Т-клетки в МКПК в стадии покоя при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, иммобилизованных на твердой фазе, экспансию активированной Т-клетки и получение популяции Т-клеток, содержащей экспансированные Т-клетки; и способы лечения пациента или индивида, больного раком или нуждающегося в его лечении, включающем введение пациенту эффективного количества описанных здесь экспансированных Т-клеток. В одном аспекте пациент или индивид, нуждающийся в нем, является раковым больным. В одном аспекте рак, подлежащий лечению, выбран из одного или более из гепатоклеточной карциномы (ГКК), колоректальной карциномы (КРК), глиобластомы (ГБ), рака желудка (РЖ), рака пищевода, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака поджелудочной железы (РПЖ), почечно-клеточной карциномы (ПКК), доброкачественной гиперплазии

предстательной железы (ДГПрЖ), рака предстательной железы (РПрЖ), рака яичника (РЯ), меланомы, рака молочной железы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), карциномы клеток Меркеля (ККМ), мелкоклеточного рака легких (МРЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака желчного пузыря и холангиокарциномы (РЖП, ХК), рака мочевого пузыря (РМП), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и рака матки (РЭМ).

Мишенями иммунотерапии, основанной на Т-клетках, являются пептидные эпитопы, полученные из опухолеассоциированных или опухолеспецифических белков, которые презентуются молекулами главного комплекса гистосовместимости человека (МНС). Антигенами, которые распознаются опухолеспецифическими Т-лимфоцитами, то есть, их эпитопами, могут быть молекулы, образованные из любого класса белков, таких как ферменты, рецепторы, факторы транскрипции и т. д., которые экспрессируются и обычно имеют, по сравнению с неизмененными клетками того же происхождения, повышенный уровень в клетках соответствующей опухоли.

Существует два класса молекул МНС, молекулы МНС I класса и молекулы МНС II класса. Молекулы МНС I класса состоят из альфа-тяжелых цепей и бета-2-микроглобулина, молекулы МНС II класса - из альфа-цепи и бета-цепи. Их трехмерная конформация образует связывающую бороздку, которая используется для нековалентного взаимодействия с пептидами. Молекулы МНС I класса содержатся в большинстве клеток с ядром. Они презентуют пептиды, которые образуются в результате протеолитического расщепления преимущественно эндогенных белков, дефектных рибосомных продуктов (DRiP) и больших пептидов. Однако пептиды, полученные из эндосомальных компартментов или экзогенных источников, также часто обнаруживаются на молекулах МНС I класса. Этот неклассический способ презентации на молекулах I класса называется перекрестной презентацией. Молекулы МНС II класса могут встречаться преимущественно на профессиональных антигенпрезентирующих клетках (АПК) и, в первую очередь, презентировать пептиды экзогенных или трансмембранных белков, которые поглощаются АПК, например, во время эндоцитоза и впоследствии процессируются.

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

CD4-положительные хелперные Т-клетки играют важную роль в индуцировании и поддержании эффективных ответов CD8-положительных цитотоксических Т-клеток. Идентификация CD4-положительных Т-клеточных эпитопов, образованных из опухолеассоциированных антигенов (ТАА), имеет огромное значение для разработки фармацевтических препаратов для инициации противоопухолевых иммунных ответов. В месте локализации опухоли Т-хелперные клетки поддерживают благоприятное для ЦТЛ цитокиновое окружение и привлекают эффекторные клетки, к примеру, ЦТЛ, естественные киллерные клетки (НК), макрофаги и гранулоциты.

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

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

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

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

Поскольку оба вида ответов, зависящие от клеток CD8 и CD4, вносят свой вклад в противоопухоле-

вый эффект сообща и синергически, то идентификация и определение характеристик опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых как CD8+ Т-клетками (лиганд: молекула МНС I класса + пептидный эпитоп), так и CD4-положительными хелперными Т-клетками (лиганд: молекула МНС II класса + пептидный эпитоп) являются важными при разработке противоопухолевых вакцин.

Чтобы пептид в комплексе с МНС I класса инициировал (вызывал) клеточный иммунный ответ, он должен также связаться с молекулой МНС II класса. Этот процесс зависит от аллеля молекулы МНС и конкретных полиморфизмов аминокислотной последовательности пептида. Пептиды, связывающиеся с молекулами МНС I класса, обычно имеют длину 8-12 аминокислотных остатков и обычно содержат два консервативных остатка ("якоря") в своей последовательности, которые взаимодействуют с соответствующей связывающей бороздкой молекулы МНС. Таким образом, каждый аллель МНС имеет "связывающий мотив", определяющий, какие пептиды могут специфически связываться со связывающей бороздкой.

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

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

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

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

ТКР представляет собой молекулу, присутствующую на поверхности Т-лимфоцитов (или Т-клеток), которая, как правило, несет ответственность за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Он представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа- и бета-цепи в 95% Т-клеток, тогда как 5% Т-клеток имеют ТКР, состоящие из гамма- и дельта-цепей. Взаимодействие ТКР с антигеном и МНС приводит к активации Т-лимфоцита посредством ряда биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корцепторами и специализированными

вспомогательными молекулами. В иммунологии антиген CD3 (CD обозначает "кластер дифференциации") представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех различных цепей (CD3- γ , Cd3 δ и дважды Cd3 ϵ), у млекопитающих, который ассоциируется с молекулами, известными как Т-клеточный рецептор (ТКР) и ζ -цепь, для генерации сигнала активации в Т-лимфоцитах. ТКР, ζ -цепь и молекулы CD3 в совокупности составляют комплекс ТКР. Цепи CD3- γ , Cd3 δ и Cd3 ϵ являются белками клеточной поверхности с высокой степенью родства семейства иммуноглобулинов, содержащего уникальный внеклеточный домен иммуноглобулина. Трансмембранная область цепей CD3 несет отрицательный заряд, характеристику, которая позволяет этим цепям соединяться с положительно заряженными цепями ТКР (TCR α и TCR β). Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат одиночный консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив, или, сокращенно, ITAM, который имеет важное значение для сигнальной способности ТКР.

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

В одном аспекте экспансия и/или активация Т-клеток происходит в присутствии одного или более из ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21. В другом аспекте экспансия и/или активация Т-клеток происходит в ИЛ-2 в отдельности, ИЛ-7 в отдельности, ИЛ-15 в отдельности, в комбинации ИЛ-2 и ИЛ-15 или комбинации ИЛ-7 и ИЛ-15.

ТКР-структуры согласно данному изобретению могут применяться у субъектов, больных раком или с подозрением на это заболевание, уменьшая размер опухоли или предотвращая рост или повторный рост опухоли у этих субъектов. Соответственно, данное раскрытие сущности изобретения дополнительно касается способов снижения роста или предотвращения образования опухоли у субъекта за счет введения ТКР-структуры согласно данному раскрытию в выделенную Т-клетку субъекта и повторного введения субъекту трансформированной Т-клетки, тем самым осуществляя противоопухолевые ответы для снижения или устранения опухолей у субъекта. Подходящие Т-клетки, которые могут использоваться, включают цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ) или любую клетку, имеющую Т-клеточный рецептор, которая необходима для разрушения. Как хорошо известно специалисту в данной области, легко доступными являются различные способы выделения этих клеток из организма субъекта. Например, используя экспрессию маркеров клеточной поверхности или используя имеющиеся в продаже наборы (например, ISOCELL™ от Pierce, Рокфорд, Иллинойс, США).

Во внимание принимается тот факт, что ТКР-структуру можно ввести в собственные Т-клетки субъекта в виде обнаженной ДНК или в соответствующем векторе. Способы устойчивой трансфекции Т-клеток при помощи электропорации обнаженной ДНК, известные в данной области, см., например, в патенте США № 6 410 319, содержание которого в полном объеме включено путем ссылки. "Обнаженная ДНК" в целом относится к ДНК, кодирующей ТКР по данному изобретению, содержащейся в плазмидном векторе для экспрессии в подходящей для экспрессии ориентации. Положительным фактом является то, что использование обнаженной ДНК снижает время, необходимое для получения Т-клеток, экспрессирующих ТКР по данному изобретению.

Альтернативно, для введения ТКР-структуры в Т-клетки может использоваться вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный вектор). Подходящие векторы для использования в соответствии с данным способом согласно данному раскрытию не реплицируются в Т-клетках субъекта. Известно большое количество векторов на основе вирусов, для которых число копий вируса, поддерживаемое в клетке, является достаточно низким для поддержания жизнеспособности клетки. Иллюстративные векторы включают векторы pFB-neo (STRATAGENE®), а также векторы на основе ВИЧ, вируса SV40, вируса Эпштейна-Барр, вируса простого герпеса или бычьего парвовируса.

После установления того факта, что трансфицированная или трансдуцированная Т-клетка способна экспрессировать ТКР-структуру в виде трансмембранного белка на поверхности клеток с необходимой степенью регуляции и на надлежащем уровне, можно определить, является ли ТКР функционально активным в клетке-хозяине, чтобы обеспечить необходимую индукцию сигнала. После этого трансдуцированные Т-клетки повторно вводят или вводят субъекту с целью активации противоопухолевых ответов у субъекта.

Для облегчения введения трансдуцированные Т-клетки согласно данному раскрытию можно перевести в фармацевтическую композицию или перевести в имплантат, подходящий для введения *in vivo*, с соответствующими носителями или разбавителями, которые дополнительно могут быть фармацевтически приемлемыми. Средства для изготовления такой композиции или имплантата были описаны в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980, содержание

которого в полном объеме включено в данный документ путем ссылки)). В особых случаях трансдуцированные Т-клетки могут быть составлены в виде препарата в полутвердой или жидкой форме, такого как капсула, раствор, раствор для инъекций, ингалянт или аэрозоль, обычными способами для соответствующего способа введения. Для предотвращения или снижения до минимального уровня высвобождения или поглощения композиции до тех пор, пока она не достигнет целевой ткани или органа, или для обеспечения замедленного высвобождения композиции могут быть использованы известные в данной области средства. Однако желательно, чтобы применялась фармацевтически приемлемая форма, которая не препятствовала клеткам экспрессировать ТКР. Таким образом, желательно, чтобы трансдуцированные Т-клетки можно было перевести в фармацевтическую композицию, содержащую сбалансированный солевой раствор, предпочтительно сбалансированный солевой раствор Хэнкса, или физиологический раствор.

В некоторых аспектах изобретение включает способ получения и/или экспансии перенаправленных антиген-специфических Т-клеток, который включает трансфекцию Т-клеток вектором экспрессии, содержащим конструкцию ДНК, кодирующую ТКР, затем, факультативно, стимуляцию клеток при помощи антиген-положительных клеток, рекомбинантным антигеном или антителом к рецептору, чтобы стимулировать клетки пролиферировать.

В другом аспекте предлагается способ стабильной трансфекции и перенаправления Т-клеток путем электропорации или иного невирусного переноса генов (такого как, но без ограничения, сонопорация) при помощи обнаженной ДНК. Большинство исследователей использовали вирусные векторы для переноса гетерологичных генов в Т-клетки. При использовании обнаженной ДНК время, необходимое для получения перенаправленных Т-клеток, может быть уменьшено. Под "обнаженной ДНК" понимают ДНК, кодирующую ТКР, содержащуюся в экспрессионной кассете или векторе в надлежащей для экспрессии ориентации. Способ электропорации по этому раскрытию позволяет получить стабильные трансфектанты, экспрессирующие ТКР и переносящие их на своей поверхности.

В некоторых аспектах Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки человека, такие как Т-клетки, полученные из моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), причем МКПК собраны после стимуляции Г-КСФ, костным мозгом или пуповинной кровью. Условия включают использование мРНК, ДНК и электропорации. После трансфекции клетки могут быть незамедлительно введены инфузией или помещены на хранение. В некоторых аспектах после трансфекции клетки могут размножаться в течение дней, недель или месяцев *ex vivo* в виде общей популяции в период примерно 1, 2, 3, 4, 5 или более дней после переноса гена в клетки. В дополнительном аспекте трансфектанты после трансфекции клонируют, и клон, демонстрирующий присутствие единой интегрированной или способной к эпизодическому поддержанию экспрессионной кассеты или плазмиды, и экспрессию ТКР, подвергается экспансии *ex vivo*. Выбранный для экспансии клон демонстрирует способность специфически распознавать и лизировать клетки-мишени, экспрессирующие пептид. Можно провести экспансию рекомбинантных Т-клеток при помощи стимуляции ИЛ-2 или другими цитокинами, которые связываются с общей гамма-цепью (например, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21 и другими). Можно провести экспансию рекомбинантных Т-клеток при помощи стимуляции искусственными антигенпрезентирующими клетками. Можно провести экспансию рекомбинантных Т-клеток на искусственной антигенпрезентирующей клетке или при помощи антитела, такого как ОКТ3, которое образует поперечные сшивки с CD3 на поверхности Т-клетки. Популяции рекомбинантных Т-клеток можно удалить на искусственной антигенпрезентирующей клетке или при помощи антитела, такого как Campath, которое связывает CD52 на поверхности Т-клетки. В дополнительном аспекте генетически измененные клетки могут быть подвергнуты криоконсервации.

Композиция по настоящему изобретению может быть представлена в виде единичной лекарственной формы, где каждая единица дозирования, например, в виде инъекции, содержит установленное количество композиции, в отдельности или в соответствующей комбинации с другими активными веществами. В контексте настоящего описания понятие "единичная лекарственная форма" относится к физически обособленным единицам, подходящим как единичные дозы для субъектов человеческого или животного происхождения, причем каждая единица содержит установленное количество композиции по настоящему изобретению, в отдельности или в соответствующей комбинации с другими активными веществами, рассчитанное как количество, достаточное для достижения желаемого эффекта, в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или средством доставки, там, где это необходимо. Конкретное воплощение новых единичных лекарственных форм по данному изобретению зависит от конкретной фармакодинамики, связанной с фармацевтической композицией, у конкретного субъекта.

Желательно, чтобы в композиции присутствовало эффективное количество или достаточное число выделенных трансдуцированных Т-клеток, чтобы при введении субъекту возникали длительные, специфические противоопухолевые ответные реакции с целью уменьшения размера опухоли или предотвращения роста или повторного роста опухоли по сравнению с наблюдающимися в противном случае, в отсутствие такого лечения. Желательно, чтобы трансдуцированные Т-клетки, повторно введенные субъекту, вызывали уменьшение размера опухоли на примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 98% или примерно 99%, если сравнивать с в других отношениях такими же условиями, но при которых трансдуцированные Т-клетки не присутствуют.

Соответственно, количество введенных трансдуцированных Т-клеток должно оцениваться с учетом способа введения и должно быть таким, чтобы было введено число трансдуцированных Т-клеток, достаточное для достижения желательного терапевтического ответа. Кроме того, количество каждого активного вещества, включенного в композиции, описанные в данном документе (например, количество на одну клетку, с которой должен происходить контакт, или количество на определенный вес тела), может изменяться в различных применениях. В целом, желательно, чтобы концентрация трансдуцированных Т-клеток была достаточной, чтобы обеспечить подвергающегося лечению субъекта Т-клетками в количестве по меньшей мере от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^9 трансдуцированных Т-клеток/м² (или кг) тела пациента, даже более желательно, от примерно 1×10^7 до примерно 5×10^8 трансдуцированных Т-клеток/м² (или кг) тела пациента, хотя и любое подходящее количество может быть использовано, либо выше, например, больше чем 5×10^8 клеток/м² (или кг) тела пациента, либо ниже, например, меньше чем 1×10^7 клеток/м² (или кг) тела пациента. Режим дозирования может основываться на хорошо известных методах лечения (см., например, в патенте США № 4 690 915, содержание которого в полном объеме включено в данный документ путем ссылки), или может использоваться альтернативный подход с непрерывной инфузией.

Эти значения являются общим руководством к выбору диапазона количества трансдуцированных Т-клеток, подлежащих применению специалистом данной области после оптимизации способа по данному изобретению для практического воплощения изобретения. Приведение в данном документе таких диапазонов ни в коем случае не препятствует применению более высокого или низкого количества компонента, которое может быть оправданным в конкретном применении. Например, реальная доза и режим может изменяться в зависимости от того, вводятся ли композиции в сочетании с другими фармацевтическими композициями, или в зависимости от индивидуальных особенностей в фармакокинетике, распределении лекарственного препарата и его метаболизме. Специалист данной области легко сможет сделать необходимую корректировку в соответствии с требованиями конкретной ситуации.

Термины "Т-клетка" и "Т-лимфоцит" известны в этой области и подразумевается, что они включают тимоциты, наивные Т-лимфоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, Т-лимфоциты в стадии покоя или активированные Т-лимфоциты. Иллюстративные популяции Т-клеток, пригодных для использования в конкретных вариантах воплощения, включают, но без ограничения, хелперные Т-клетки (ХТЛ; CD4+ Т-клетку), цитотоксическую Т-клетку (ЦТЛ; CD8+ Т-клетку), CD4+CD8+ Т-клетку, CD4-CD8- Т-клетку или любой другой подвид Т-клеток. Другими иллюстративными популяциями Т-клеток, подходящими для использования в конкретных вариантах воплощения, включают, но без ограничения, Т-клетки, экспрессирующие один или более из следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197 и HLA-DR и при необходимости могут быть далее очищены при помощи методик положительного и отрицательного отбора.

Мононуклеарная клетка периферической крови (МПКП) определяется как любая клетка крови с круглым ядром (т. е. лимфоцит, моноцит или макрофаг). Эти клетки крови являются ключевым компонентом иммунной системы в борьбе с инфекцией и адаптации к чужеродным агентам. Популяция лимфоцитов состоит из CD4+ и CD8+ Т-клеток, В-клеток и естественных киллерных клеток, CD14+ моноцитов и базофильных/нейтрофильных/эозинофильных/дендритных клеток. Эти клетки часто выделяют из цельной крови или из продуктов лейкофереза при помощи FICOLL™, гидрофильного полисахарида, который разделяет кровь на слои, причем моноциты и лимфоциты образуют лейкоцитарную пленку под слоем плазмы. В одном варианте осуществления МПКП обозначают популяцию клеток, содержащую по меньшей мере Т-клетки и необязательно Nk-клетки и антигенпрезентирующие клетки.

Понятие "активация" относится к состоянию Т-клетки, при котором она стимулирована в достаточной мере для того, чтобы индуцировать обнаруживаемую пролиферацию клеток. В конкретных вариантах осуществления активация также может быть связана с индуцированной выработкой цитокинов и поддающимися обнаружению эффекторными функциями. Понятие "активированная Т-клетка" относится, помимо прочего, к пролиферирующим Т-клеткам. Сигналы, генерируемые только лишь при помощи ТКР, являются недостаточными для полной активации Т-клетки, и существует также потребность в одном или более вторичных или костимулирующих сигналах. Таким образом, активация Т-клетки включает первичный сигнал стимуляции через комплекс ТКР/CD3 и один или более вторичных костимулирующих сигналов. О костимуляции может свидетельствовать пролиферация и/или выработка цитокинов Т-клетками, которые получили первичный сигнал активации, такой как стимуляция через комплекс ТКР/CD3 или через CD2.

В контексте настоящего описания понятие "Т-клетка в стадии покоя" относится к Т-клетке, которая не делится или вырабатывает цитокины. Т-клетки в стадии покоя невелики (приблизительно 6-8 мкм) по размеру в сравнении с активированными Т-клетками (приблизительно 12-15 мкм).

В контексте настоящего описания понятие "примированная Т-клетка" относится к Т-клетке в стадии покоя, которая была предварительно активирована по меньшей мере один раз и была удалена от стимула активации в течение по меньшей мере примерно 1 часа, по меньшей мере примерно 2 часов, по меньшей мере примерно 3 часов, по меньшей мере примерно 4 часов, по меньшей мере примерно 5 ча-

сов, по меньшей мере примерно 6 часов, по меньшей мере примерно 12 часов, по меньшей мере примерно 24 часов, по меньшей мере примерно 48 часов, по меньшей мере примерно 72 часов, по меньшей мере примерно 84 часов, по меньшей мере примерно 96 часов, по меньшей мере примерно 108 часов или по меньшей мере примерно 120 часов. Альтернативно, стадия покоя может длиться в течение периода времени от примерно 0,5 часа до примерно 120 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 108 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 96 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 84 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 72 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 60 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 48 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 36 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 24 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 18 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 12 часов, от примерно 0,5 часа до примерно 6 часов, от примерно 1 часа до примерно 6 часов, от примерно 2 часов до примерно 5 часов, от примерно 3 часов до примерно 5 часов или от примерно 4 часов до примерно 5 часов. Примирированные Т-клетки обычно имеют фенотип клеток памяти.

Популяцию Т-клеток можно индуцировать для пролиферации при помощи активации Т-клеток и стимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток при помощи лиганда, который связывает вспомогательную молекулу. Активацию популяции Т-клеток можно осуществить путем приведения в контакт Т-клеток с первым средством, которое стимулирует в Т-клетках сигнал, ассоциированный с комплексом ТКР/CD3. Стимуляция в Т-клетках сигнала, ассоциированного с комплексом ТКР/CD3, может быть выполнена либо путем лигирования комплекса Т-клеточный рецептор (ТКР)/CD3, либо поверхностным белком CD2, либо непосредственно стимуляцией связанных с рецепторами сигнальных путей. Таким образом, для активации популяции Т-клеток могут использоваться антитело к CD3, антитело к CD2 или активатор протеинкиназы С в сочетании с кальциевым ионофором.

Для индукции пролиферации популяция активированных Т-клеток может быть приведена в контакт со вторым веществом, что стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности Т-клеток. Например, популяция CD4⁺ Т-клеток может подвергнуться стимуляции для пролиферации при помощи антитела к CD28, направленного на молекулу CD28 на поверхности Т-клеток. Альтернативно, CD4⁺ Т-клетки можно стимулировать природным лигандом для CD28, таким как B7-1 и B7-2. Природный лиганд может быть растворимым, или на клеточной мембране, или прикреплен к поверхности твердой фазы. Пролиферацию популяции CD8⁺ Т-клеток можно осуществить при помощи использования моноклонального антитела ES5.2D8, которое связывается с CD9, вспомогательной молекулой, имеющей молекулярную массу примерно 27 кДа, которая присутствует на активированных Т-клетках. Альтернативно, пролиферацию популяции активированных Т-клеток можно индуцировать путем стимуляции одного или более внутриклеточных сигналов, возникших в результате лигирования вспомогательной молекулы, например, CD28.

Средство, обеспечивающее первичный сигнал активации и средство, обеспечивающее костимуляторную молекулу, могут быть добавлены либо в растворимой форме, либо прикрепленным к поверхности твердой фазы. В предпочтительном варианте осуществления оба средства прикреплены к одной и той же поверхности твердой фазы.

После активации и стимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток может отслеживаться течение пролиферации Т-клеток в ответ на продолжающееся воздействие лиганда или другого средства, которое действует внутриклеточно, стимулируя путь, опосредованный вспомогательной молекулой. Когда скорость пролиферации Т-клеток возрастает, возникает возможность повторно активировать и повторно стимулировать Т-клетки, например, дополнительным антителом к CD3 и костимуляторным лигандом с целью вызвать дальнейшую пролиферацию. В одном варианте осуществления скорость пролиферации Т-клеток можно отслеживать, анализируя размер клеток. Альтернативно, пролиферацию Т-клеток можно отслеживать, анализируя экспрессию молекул на клеточной поверхности в ответ на воздействие лиганда или другого вещества, например, B7-1 или B7-2. Мониторинг и стимуляцию Т-клеток можно повторять в случае устойчивой пролиферации с целью получения популяции Т-клеток с увеличенным числом клеток от примерно 100 раз до примерно 100000 раз в сравнении с исходной популяцией Т-клеток.

Способ согласно данному раскрытию может использоваться для экспансии определенных популяций Т-клеток с целью применения при лечении инфекционных заболеваний или рака. Полученная в результате этого популяция Т-клеток может быть подвергнута генетической трансдукции и использована при иммунотерапии или может использоваться для анализа возбудителей инфекций *in vitro*. После экспансии популяции Т-клеток до достаточного их количества экспансированные Т-клетки можно повторно ввести индивиду. Способ по данному изобретению может также обеспечить возобновляемый источник Т-клеток. Таким образом, Т-клетки от индивида можно подвергнуть процедуре экспансии *ex vivo*, часть подвергшейся экспансии популяции может быть повторно введена индивиду, а другая часть может быть заморожена в виде аликвот для длительного консервирования и последующей экспансии и введения индивиду. Аналогично, популяцию опухоль-инфильтрующих лимфоцитов можно получить от больного раком индивида, а Т-клетки стимулировать для пролиферации до достаточного количества и повторно ввести индивиду.

Данное раскрытие сущности изобретения может также касаться композиций, содержащих средство, обеспечивающее передачу костимуляторного сигнала Т-клеткам для экспансии Т-клеток (например, ан-

титело к CD28, лиганд В7-1 или В7-2), прикрепленное к поверхности твердой фазы, которые могут дополнительно содержать средство, обеспечивающее первичный сигнал активации для Т-клеток (например, антитело к CD3), прикрепленное к той же поверхности твердой фазы. Эти средства могут быть предпочтительно прикреплены к микрогранулам, флаконам или мешкам. В объем данного изобретения могут также входить композиции, включающие каждое средство, прикрепленное к различным поверхностям твердой фазы (т. е., средство, обеспечивающее первичный сигнал активации Т-клеток, прикрепленное к поверхности первой твердой фазы, и средство, обеспечивающее передачу костимуляторного сигнала, прикрепленное к поверхности второй твердой фазы).

В одном аспекте, ТАА-пептиды, которые применимы в совокупности со способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают, например, те ТАА-пептиды, которые описаны в патентной заявке США 20160187351, патентной заявке США 20170165335, патентной заявке США 20170035807, патентной заявке США 20160280759, патентной заявке США 20160287687, патентной заявке США 20160346371, патентной заявке США 20160368965, патентной заявке США 20170022251, патентной заявке США 20170002055, патентной заявке США 20170029486, патентной заявке США 20170037089, патентной заявке США 20170136108, патентной заявке США 20170101473, патентной заявке США 20170096461, патентной заявке США 20170165337, патентной заявке США 20170189505, патентной заявке США 20170173132, патентной заявке США 20170296640, патентной заявке США 20170253633 и в патентной заявке США 20170260249, патентной заявке США 20180051080 и патентной заявке США № 20180164315, содержание каждой из этих публикаций и списков последовательностей, описанных в них, включено в данное описание во всей полноте путем ссылки.

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

В другом аспекте ТАА, которые применимы в совокупности со способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают по меньшей мере одну из последовательностей с SEQ ID NO: 1 по SEQ ID NO: 157.

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
1	YLYDSETKNA	54	LLWGHPRVALA	106	VLLNEILEQV
2	HLMDQPLSV	55	VLDGKVAVV	107	SLLNQPKAV
3	GLLKINSV	56	GLLGKVTSV	108	KMSELQTYV
4	FLVDGSSAL	57	KMISAIPTL	109	ALLEQTGDMSL
5	FLFDGSANLV	58	GLLETTGLLAT	110	VIKGLEEITV
6	FLYKIIDEL	59	TLNTLDINL	111	KQFEGTVEI
7	FILDSAETTTL	60	VIKGLEEI	112	KLQEEIPVL
8	SVDVSPPKV	61	YLEDGFAYV	113	GLAEFQENV
9	VADKIHVS	62	KIWEELSVLEV	114	NVAEIVIH
10	IVDDLITNL	63	LLIPFTIFM	115	ALAGIVTNV
11	GLLEELVTV	64	ISLDEVAVSL	116	NLLIDDKGTIKL
12	TLDGAAVNQV	65	KISDFGLATV	117	VLMQDSRLYL
13	SVLEKEIYSI	66	KLIGNIHGNEV	118	KVLEHVVRV
14	LLDPKTIFL	67	ILLSVLHQL	119	LLWGNLPEI
15	YTFSGDVQL	68	LDSEALLTL	120	SLMEKNQSL
16	YLMDDFSSL	69	VLQENSSDYQSNL	121	KLLAVIHEL
17	KVWSDVTPL	70	HLLGEGAFAQV	122	ALGDKFLLRV

18	LLWGHPRVALA	71	SLVENIHVL	123	FLMKNSDLYGA
19	KIWEELSVLEV	72	YTFSGDVQL	124	KLIDHQGLYL
20	LLIPFTIFM	73	SLSEKSPEV	125	GPGIFPPPPQP
21	FLIENLLAA	74	AMFPDTIPRV	126	ALNESLVEC
22	LLWGHPRVALA	75	FLIENLLAA	127	GLAALAVHL
23	FLLEREQLL	76	FTAEFLEKV	128	LLLEAVWHL
24	SLAETIFIV	77	ALYGNVQQV	129	SIIEYLPTL
25	TLLEGISRA	78	LFQSRIAGV	130	TLHDQVHLL
26	ILQDGQFLV	79	ILAEPIYIRV	131	SLLMWITQC
27	VIFEGEPMYL	80	FLLEREQLL	132	FLLDKPQDLSI
28	SLFESLEYL	81	LLLPLELSLA	133	YLLDMPLWYL
29	SLLNQPKAV	82	SLAETIFIV	134	GLLDCPIFL
30	GLAEFQENV	83	AILNVDEKNQV	135	VLIEYNFSI
31	KLLAVIHEL	84	RLFEEVLGV	136	TLYNPERTITV
32	TLHDQVHLL	85	YLDEVAFML	137	AVPPPPSSV
33	TLYNPERTITV	86	KLIDEDEPLFL	138	KLQEELNKV
34	KLQEKIQEL	87	KLFEKSTGL	139	KLMDPGSLPPL
35	SVLEKEIYSI	88	SLLEVNEASSV	140	ALIVSLPYL
36	RVIDDSLTVGV	89	GVYDGREHTV	141	FLLDGSANV
37	VLFGELPAL	90	GLYPVTLVGV	142	ALDPSGNQLI
38	GLVDIMVHL	91	ALLSSVAEA	143	ILIKHLVKV
39	FLNAIETAL	92	TLLEGISRA	144	VLLDTILQL
40	ALLQALMEL	93	SLIEESEEL	145	HLIAEIHATA
41	ALSSSQAEV	94	ALYVQAPTV	146	SMNGGVFAV
42	SLITGQDLSV	95	KLIYKDLVSV	147	MLAEKLLQA
43	QLIEKNWLL	96	ILQDGQFLV	148	YMLDIFHEV
44	LLDPKTIFL	97	SLLDYEVS	149	ALWLPTDSATV
45	RLHDENILL	98	LLGDSSFFL	150	GLASRILDA
46	YTFSGDVQL	99	VIFEGEPMYL	151	SYVKVLHHL
47	GLPSATTTV	100	ALSYILPYL	152	VYLPKIPSW
48	GLLPSAESIKL	101	FLFVDPELV	153	NYEDHFPLL
49	KTASINQNV	102	SEWGSPHAAVP	154	VYIAELEKI
50	SLLQHLIGL	103	ALSELERVL	155	VHFEDTGKTLF
51	YLMDDFSSL	104	SLFESLEYL	156	VLSPFILTL
52	LMYPYIYHV	105	KVLEYVIKV	157	HLLEGVGV
53	KVWSDVTPL				

Примеры

Пример 1.

Способ производства аутологичных Т-клеток.

Адоптивный клеточный перенос таких популяций Т-клеток, как очищенные наивные (T_n), стволовые клетки памяти (T_{scm}), и центральные клетки памяти (T_{cm}), вызывают повышенную регрессию опухоли в сравнении с переносом более дифференцированных эффекторных клеток памяти (T_{em}) и эффекторных (T_{eff}) Т-клеток. Традиционный способ производства генетически модифицированного Т-клеточного продукта может занять 10-15 дней. Однако процесс, длительность которого превышает примерно 12 дней, например 14 дней, может привести к пониженной эффективности клеток, например, к меньшему количеству более эффективных популяций Т-клеток, таких как T_n , T_{scm} и T_{cm} , и большему количеству менее эффективных популяций Т-клеток, таких как T_{em} и T_{eff} . Например, на фиг. 1А показано, что увеличение, например, до 14 дней времени культивирования Т-клеток двух здоровых доноров, например, донора 6 и донора 8, вызывает снижение уровня желательных популяций Т-клеток T_{cm} по сравнению с культивированными в течение 0, 6 или 10 дней. С другой стороны, уровни более дифференцированных и менее стойких популяций Т-клеток T_{em} увеличивались по сравнению с культивированными в течение 0, 6 или 10 дней. На фиг. 1В показано, что увеличение, например, до 14 дней времени культивирования Т-клеток трех пациентов, например, пациента 864, пациента 453 и пациента 265, вызывает снижение уровня желательных популяций Т-клеток T_{cm} по сравнению с культивированными в течение 0, 6 или 10 дней. С другой стороны, уровни более дифференцированных и менее стойких популяций Т-клеток T_{em} увеличивались по сравнению с культивированными в течение 0, 6 или 10 дней.

Меньшее количество более эффективных популяций Т-клеток T_n , T_{scm} и T_{cm} может привести к меньшему количеству эффективно активированных Т-клеток, секретирующих цитокины, например, интерферон-гамма (ИФН-гамма). На фиг. 2 показаны сниженные уровни секреции ИФН-гамма мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК), полученными у трех здоровых доноров, например, донора 6 (D6), донора 7 (D7) и донора 8 (D8), активированными и культивированными в течение 15 дней, по сравнению с клетками, культивированными в течение 10 дней.

Для сокращения времени осуществления способа производства варианты осуществления данного изобретения включают способ длительностью от примерно 7 до примерно 10 дней, приводящий к производству свыше 10 миллиардов (10×10^9) клеток без потери эффективности. Кроме того, концентрации ряда исходных материалов можно оптимизировать для снижения цены товара на 30%.

Влияние исключения стадии покоя из способа производства или изменения условий стадии покоя в способе производства аутологичных Т-клеток на активацию Т-клеток.

На фиг. 3 показана экспериментальная разработка исследования влияния условий стадии покоя на активацию и экспансию Т-клеток. Вкратце, группа А изображает первую серию МКПК, которые были разморожены в день 0, что сопровождалось стадией покоя без цитокинов в течение ночи (O/N), т.е. 24 часов, с последующей активацией МКПК, находящиеся в стадии покоя, антителами к CD3 и CD28, иммобилизованными на обработанных нетканевой культурой планшетах. ИЛ-7 представляет собой цитокин, способствующий выживанию Т-клеток за счет предотвращения апоптоза. ИЛ-7 может быть добавлен к МКПК в состоянии покоя. Группы В1-В3 представляют собой вторую серию МКПК, которые были разморожены в день 1, после чего они находились в состоянии покоя в присутствии ИЛ-7 (группа В1) или в присутствии ИЛ-7 + ИЛ-15 (группа В2) либо в отсутствии цитокинов (группа В3) в течение 4-6 часов, с последующей активацией МКПК, находящихся в состоянии покоя, антителами к CD3 и CD28, иммобилизованными на обработанных нетканевой культурой планшетах, группа С изображает третью серию МКПК, которые были разморожены в день 1 (без стадии покоя и без цитокинов), с последующей активацией размороженных МКПК антителами к CD3 и CD28, иммобилизованными на обработанных тканевой культурой планшетах. Клетки можно собрать и подсчитать в дни 8-10 с последующим анализом с использованием активационной панели.

CD25 и CD69 являются маркерами активации на поверхности цитокин- или антиген-активированных лимфоцитов. Как было показано, связывание и введение лентивирусных векторов, псевдотипированных VSV-G, такого как LV-R73, опосредуется взаимодействием оболочечного белка VSV-G с рецептором липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-рецептором) на клетке-хозяине. Т-клетки в стадии покоя не экспрессируют ЛПНП-рецептор, однако активация антителами к CD3 и CD28 вызывает экспрессию ЛПНП-рецептора на Т-клетках и обеспечивает эффективную лентивирусную трансдукцию. Это позволяет предположить, что кинетика экспрессии ЛПНП-рецептора, регулируемая уровнем активации, может влиять на эффективность трансдукции лентивирусным вектором, псевдотипированным VSV-G.

На фиг. 4 свидетельствует о том, что уровни экспрессии CD25, CD69 и hLDL-R среди групп А, В1-В3 и С сопоставимы, что указывает на то, что продолжительность стадии покоя может быть сокращена, например, с 24 часов до 4-6 часов без существенного снижения уровня активации Т-клеток.

Влияние исключения стадии покоя из способа производства или изменения условий стадии покоя в способе производства аутологичных Т-клеток на экспансию Т-клеток.

На фиг. 5А и 5В показана кратность экспансии и жизнеспособность клеток в группах А и В1-В3 в

день 7 экспансии и в день 10 экспансии, соответственно. Группа С, для которой стадия покоя не используется, имела наименьшую кратность экспансии в день 7 экспансии (в 5 раз) (фиг. 5А) и в день 10 экспансии (в 16 раз) (фиг. 5В). Эти результаты позволяют предположить, что продолжительность стадии покоя может быть сокращена, например, с 24 часов до 4-6 часов без существенного снижения уровня экспансии Т-клеток.

На фиг. 6 и 7 показаны кратность экспансии и жизнеспособность активированных Т-клеток, трансдуцированных вирусным вектором, экспрессирующим ТКР, например, LV-R73, у 2 доноров, т.е. донора 1 (фиг. 6) или донора 2 (фиг. 7) в группах А, В1-В3 и С в день 9 экспансии. Группы В1 и В2 обнаружили более высокий уровень экспансии клеток, чем группы А, В3 и С, что свидетельствует о том, что короткая продолжительность стадии покоя, например, 5 часов, в присутствии цитокинов, например, ИЛ-7 или ИЛ-7 + ИЛ-15, может увеличить экспансию трансдуцированных Т-клеток. Rep1 и Rep2 отражают два повторных измерения. Эти результаты поддерживают идею сокращения продолжительности стадии покоя, например, с 24 часов до 4-6 часов, в способе производства аутологичных Т-клеток в присутствии цитокинов, например, ИЛ-7 и/или ИЛ-15, без существенного снижения уровня экспансии Т-клеток.

Влияние исключения стадии покоя из способа производства или изменения условий стадии покоя в способе производства аутологичных Т-клеток на транскрипционную экспрессию в Т-клетках.

Использование тетрамеров, нагруженных комплексом пептид/МНС, для обнаружения Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, который специфически связывает комплекс пептид/МНС, фиг. 8, показывает сопоставимую транскрипционную экспрессию, например, экспрессию рекомбинантного ТКР, в Т-клетках, находящихся в состоянии покоя в течение 4 часов (с ИЛ-7) и 24 часов (без цитокинов) во флаконе для культивирования тканей Т75 или 4 часов (с ИЛ-7) во флаконе G-Rex 100 в цикле крупномасштабного производства для донора 13, донора 14 и донора 16. Эти результаты указывают на то, что продолжительность стадии покоя может быть сокращена, например, с 24 часов до 4-6 часов, в способе производства в увеличенном масштабе, без существенного снижения уровня транскрипционной экспрессии трансдуцированных Т-клеток. Кроме того, использование одного флакона G-Rex 100 дополнительно упрощает проведение стадии покоя, заменяя несколько флаконов Т75.

На фиг. 9 показана сопоставимая кратность экспансии в день 10 экспансии в Т-клетках, находящихся в стадии покоя в течение 4-6 часов, 6 часов или 24 часов в маломасштабном или крупномасштабном производстве для донора 13, донора 14 и донора 16. Эти результаты указывают на то, что продолжительность стадии покоя может быть сокращена, например, с 24 часов до 4-6 часов, в способе производства в увеличенном масштабе, без существенного снижения уровня экспансии трансдуцированных Т-клеток.

Влияние концентрации антител к CD3 и к CD28 в способе производства аутологичных Т-клеток на активацию Т-клеток.

Активация представляет собой важную стадию способа производства аутологичных Т-клеток, поскольку как эффективность трансдукции, так и скорость экспансии зависят от активации Т-клеток. Стимуляция Т-клеток за счет связывания с рецептором CD3 и корецептором, таким как CD28, с использованием антител является обычным методом активации Т-клеток. Активация Т-клеток служит подготовительной стадией трансдукции вирусными векторами, такими как лентивирусный вектор.

На фиг. 10 показана экспериментальная разработка, использованная для исследования влияния концентрации антител к CD3 и к CD28 на активацию Т-клеток. Вкратце, в день 0 МКПК были разморожены и культивированы или переведены в стадию покоя без активирующих цитокинов на всю ночь или на 24 часа. В день 1 МКПК, находящиеся в стадии покоя, были активированы путем их инкубации в двух 24-луночных планшетах, покрытых различными концентрациями, например, 0,1 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, антител к CD3 и антител к CD28 в присутствии ИЛ-7 + ИЛ-15. В день 2 активированные Т-клетки анализировали на экспрессию CD25, CD69 и hLDL-R и трансдуцировали VSV-G-псевдотипированными лентивирусными векторами, например, 1xEng LV-R73. В день 6/7 и 9 проводили анализы, такие как подсчет клеток, жизнеспособности, методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) с помощью декстримеров (Dex), представляющих собой многочисленные комплексы пептид-МНС и флуоресцеиновые метки, связанные с молекулой декстрана, для обнаружения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный ТКР.

На фиг. 11 показано, что перед вирусной трансдукцией Т-клетки, активированные антителами к CD3 и к CD28 в концентрациях 0,5 мкг/мл и 1,0 мкг/мл, имеют сопоставимые уровни экспрессии CD25, CD69 и hLDL-R для каждого из доноров 16 и 14. Однако эти уровни экспрессии значительно выше, чем уровни для Т-клеток, активированных более низкими концентрациями, например, 0,1 мкг/мл и 0,25 мкг/мл, антител к CD3 и к CD28. Эти результаты позволяют предположить, что концентрация антител к CD3 и к CD28 может быть снижена, например, с 1,0 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, без существенного снижения уровня активации Т-клеток.

Влияние концентрации антител к CD3 и к CD28 и цитокинов при производстве аутологичных Т-клеток на экспансию Т-клеток.

На фиг. 12 показано, что в день 10 экспансия, число клеток для Т-клеток, активированных антителами к CD3 и к CD28 в концентрациях 0,5 мкг/мл и 1,0 мкг/мл в присутствии различных концентраций ИЛ-15, например, 25 нг/мл, 50 нг/мл или 100 нг/мл, сравнимы для каждого из доноров 16, 13 и 14. Эти

результаты позволяют предположить, что концентрация антител к CD3 и к CD28 может быть снижена, например, с 1,0 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, а концентрация ИЛ-15 может быть снижена, например, со 100 нг/мл до 25 нг/мл, без существенного снижения уровня экспансии Т-клеток.

На фиг. 13 показано, что окрашивание тетрамерами Т-клеток, трансдуцированных рекомбинантным ТКР, активированных 0,5 мкг/мл и 1,0 мкг/мл антител к CD3 и к CD28 в присутствии различных концентраций ИЛ-15, например, 25 нг/мл, 50 нг/мл или 100 нг/мл, сравнимы для каждого из доноров 16, 13 и 14. Эти результаты позволяют предположить, что концентрация антител к CD3 и к CD28 может быть снижена, например, с 1,0 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, а концентрация ИЛ-15 может быть снижена, например, со 100 нг/мл до 25 нг/мл, без существенного снижения уровня вирусной трансдукции Т-клеток.

В совокупности эти результаты позволяют предположить, что (1) продолжительность стадии покоя после размораживания МКПК может быть сокращена, например, с 24 часов до 4-6 часов без существенного снижения уровня активации Т-клеток, трансгенной экспрессии и экспансии Т-клеток; и (2) концентрации антител к CD3 и к CD28 могут быть снижены, например, с 1,0 мкг/мл до 0,5 мкг/мл, а концентрации цитокинов могут быть снижены, например, для такого цитокина, как ИЛ-15, например, со 100 нг/мл до 25 нг/мл, без существенного снижения уровня активации Т-клеток, трансгенной экспрессии и экспансии Т-клеток.

Влияние длительности процесса активации в способе производства аутологических Т-клеток на эффективность трансдукции лентивирусным вектором.

Одной из основных целей разработки способа производства аутологических Т-клеток является повышение уровня трансдукции, достигаемого в первичных Т-клетках человека в случае лентивирусных конструкций, кодирующих ТКР. В отличие от гамма-ретровирусов, которые способны трансдуцировать только делящиеся клетки, лентивирусы, теоретически, способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Однако трансдукция лентивирусами Т-клеток в стадии покоя обеспечивает слабую эффективность. Было показано, что активация Т-клеток способствует их трансдукции лентивирусом. Таким образом, стимуляция Т-клеток антителами к CD3 и к CD28 в иммобилизованной, на микрогранулах, или в растворимой форме стала необходимым условием для проведения лентивирусной трансдукции и является стандартным этапом при производстве генетически модифицированных Т-клеток для адоптивной клеточной терапии.

Поскольку стадия активации Т-клеток играет решающую роль в подготовке Т-клеток к трансдукции, для получения эффективной продолжительности процесса активации антителами к CD3 и к CD28 может потребоваться оптимизация.

Для определения оптимальной продолжительности процесса активации было проведено его исследование во времени для оценки влияния различной продолжительности процесса активации на эффективность трансдукции. Результаты показывают, что оптимальным временным окном для трансдукции Т-клеток может быть период после 16-24 часов активации антителами к CD3 и к CD28. Таким образом, время активации Т-клеток перед трансдукцией может быть снижено с 48 ч до 16-24 ч для всей последующей разработки способа и производства для применения в клинике.

В другом варианте осуществления данного изобретения для свежих МКПК, т.е. не подвергшихся заморозке, стадия покоя может не понадобиться. Итак, свежие МКПК, не подвергшихся заморозке, могут быть активированы антителами к CD3 и к CD28 с последующей трансдукцией вирусным вектором для получения трансдуцированных Т-клеток.

Хотя способы трансдукции Т-клеток могут включать последовательные стадии активации Т-клеток в тканевой культуре с дальнейшим переносом активированных Т-клеток в различные тканевые культуры, в которых, однако, стадии трансдукции активированных Т-клеток вирусными векторами, активации и трансдукции могут осуществляться одновременно. Например, в то время как Т-клетки активируются антителами к CD3 и к CD28, трансдукция активированных Т-клеток может выполняться одновременно в той же культуре. Благодаря этому весь процесс трансдукции Т-клеток, т.е. от выделения МКПК до получения трансдуцированных Т-клеток может быть сокращен до, например, 3-4 дней.

Пример 2.

Определение оптимальной продолжительности процесса активации Т-клеток для повышения эффективности трансдукции лентивирусным вектором.

МКПК от здоровых доноров активировали при помощи антител к CD3 и к CD28 при различных интервалах времени при подготовке к трансдукции. Активированные Т-клетки из МКПК обрабатывали концентрированными супернатантами, полученными при помощи различных лентивирусных конструкций, экспрессирующих нацеленные на ТАА ТКР R7P1D5. Трансдуцированные клетки были подвергнуты экспансии в присутствии ИЛ-7 и ИЛ-15. Продукты сравнивали на основе трансгенной экспрессии ТКР R7P1D5, определенной методом проточной цитометрии с использованием специфического декстрамера/тетрамера.

Репрезентативные материалы и способы.

Поставляемые материалы	Изготовитель	Номер по каталогу
TexMACS media	Miltenyi Biotec	130-097-196
Человеческая сыворотка AB	Gemini	100-512
PBS/EDTA	Lonza	BE02-017F
ИЛ-7	Peprotech	200-07
ИЛ-15	Peprotech	200-15
Антитело к CD3	Ebioscience	16-0037-85
Антитело к CD28	Ebioscience	16-0289-85
24-луночные обработанные нетканевой культурой планшеты	Co-star	3738
24-луночные планшеты G-Rex	Wilson Wolf	80192M
Коническая пробирка, 15 мл	Falcon	352097
Коническая пробирка, 50 мл	Corning	430290
Серологическая пипетка на 5 мл	BD	53300-421
Серологическая пипетка на 10 мл	BD	53300-523
Серологическая пипетка на 25 мл	BD	53300-567
Наконечники для пипеток, 1000 мкл	Rainin	17007954
Наконечники для пипеток, 200 мкл	Rainin	17007961
Наконечники для пипеток, 20 мкл	Rainin	17007957
Микроцентрифужная пробирка, 1,5 мл	Fisher	02-681-5
Окрашивающий раствор AOP1	Nexcelom	CS2-0106
PBS без Mg и Ca	Lonza	17-516F/24
96-луночный планшет	Corning	3799
Пипеточный дозатор P-20	Rainin	17014382
Пипеточный дозатор P-200	Rainin	17014391
Пипеточный дозатор P-1000	Rainin	17017382
Pipetaid	Drummond	193970L
Флаконы T75	BD Falcon	BD353136
Флакон T25	Corning	430372
Бензоназа	Sigma	E1014
Протаминсульфат	McKesson	804514
Лентивирус	Lentigen	LV-R73, R78, R72, R22
Водный краситель Live/Dead	Thermo Fisher	L-34966
Микрогранулы ABC Comp	Thermo Fisher	A10497
CD3-BV421	BD	562426
CD8-APC	Biolegend	301014
Тетрамер TAA-ФЗ	Immatics	н/п

Репрезентативные способы.

Для сравнения различной продолжительности процесса активации Т-клеток, были проведены репрезентативные эксперименты, описанные в данном документе, после стандартного маломасштабного способа получения Т-клеток, включающего, например, 4 стадии: размораживание/стадия покоя, активация, трансдукция и экспансия.

Размораживание и стадия покоя.

Замороженные МКПК от здоровых доноров (n=3, D3, D4, D9) размораживали в теплой среде TexMACS, дополненной 5% человеческой сывороткой AB. Клетки обрабатывали нуклеазой бензоназой (50 Ед/мл) в течение 15 минут при 37°C, промывали, подсчитывали и выдерживали в стадии покоя в течение ночи в полной среде TexMACS.

Активация.

В день размораживания клеток 24-луночные обработанные нетканевой культурой планшеты покрывали антителами к CD3 и к CD28, разведенными PBS (1 мкг/мл), запечатывали и инкубировали в те-

чение ночи при 4°C. На следующий день МКПК, находящиеся в стадии покоя, собирали, подсчитывали, промывали и ресуспендировали при концентрации 1×10^6 /мл. Раствор антител аспирировали, а лунки промывали полной средой с последующим добавлением 2×10^6 клеток в каждую лунку. Активацию проводили при 37°C в течение определенных промежутков времени.

Трансдукция.

Активированные клетки собирали, промывали и подсчитывали. Готовили трансдукционные смеси, содержащие концентрированные вирусные супернатанты, протаминсульфат (10 мкг/мл), ИЛ-7 (10 нг/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). Для каждой трансдукции в стерильную микроцентрифужную пробирку отбирали $1,0 \times 10^6$ клеток и центрифугировали 5 минут при 400 g. Каждый клеточный осадок ресуспендировали в 0,5 мл трансдукционной смеси, соответствующей конкретным значениям MOI. Клеточную суспензию помещали в надлежащим образом маркированную лунку 24-луночного планшета G-Rex. После 24 часов инкубации при 37°C и 5% CO₂ в каждую лунку добавляли 1,5 мл среды, дополненной ИЛ-7 (10 нг/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). Через 96 часов после трансдукции методом проточной цитометрии определяли уровень трансгенной экспрессии. Для отслеживания поверхностной экспрессии ТКР методом FACS использовали мультимерные комплексы пептида и молекулы МНС (декстрамер или тетрамер).

Проточная цитометрия.

Вкратце, согласно рабочим инструкциям окрашивали $1,0 \times 10^6$ клеток, трансдуцированных при данном значении множественности инфицирования (MOI) лентивирусом. Для окрашивания тетрамером клетки инкубировали 15 минут с 1 мкл тетрамера ТАА в 50 мкл проточного буфера при КТ в темноте. После окрашивания тетрамером проводили окрашивание антителами к поверхностным маркерам Т-клеток (например, CD3, CD4, CD8 и т. д.). Образцы были получены при помощи автоматической компенсационной матрицы на основе компенсационных микрогранул.

Результаты.

МКПК, полученные от 2 доноров (D3 и D4), активировали в течение 16, 24 и 48 часов с использованием связанных с планшетом антител к CD3 и к CD28. Клетки трансдуцировали тремя различными лентивирусными конструкциями (R72, R21 и R22).

На фиг. 14А показано, как процентная доля CD⁺CD8⁺тетрамер⁺ Т-клеток постепенно уменьшается с увеличением продолжительности процесса активации в ряду 16 ч > 24 ч > 48 ч. Этот порядок устойчиво наблюдался как для исследуемых конструкций, так и для доноров.

Для определения оптимальной продолжительности процесса активации вирусной трансдукции, которая может привести к высокому уровню экспрессии трансгена, проводили исследование во времени. МКПК от одного донора (D9) активировали нанесенными на планшет антителами к CD3 и к CD28 при определенной продолжительности процесса активации, например, от 0 до 48 часов, и трансдуцировали каждой из двух разных лентивирусных конструкций, кодирующих ТКР 7P1D5, т.е. LV-R73 и LV-R78.

Фиг. 14В свидетельствует о том, что трансгенная экспрессия наиболее высока в клетках, активированных в течение 16-20 часов. Результаты представляют уровень трансгенной экспрессии, измеренный в виде процентной доли CD⁺CD8⁺тетрамер⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии через 96 часов после трансдукции. Было определено, что период оптимальной активации составляет от примерно 16 до примерно 20 часов и может быть расширен не более чем до 24 часов для придания гибкости способу производства по правилам GMP.

В целом, эти результаты могут объяснить одну из причин низких скоростей трансдукции, наблюдавшихся для Т-клеток, активированных в течение 48 часов, и продемонстрировать, что меньшая продолжительность процесса активации в течение 16-24 часов может оказаться оптимальной для проведения лентивирусной трансдукции. Хотя на устойчивую экспансию, которой удается достичь в результате 48-часовой активации, может повлиять ограничение времени активации до 16-24 часов, это изменение можно считать очень полезным для продукта и внедренным в практику в случае всей последующей разработки способа и производства для применения в клинике.

Пример 3.

Как и в случае всех биотехнологических процессов, масштабирование производства Т-клеток является сложной частью разработки способа. Сохранение функции и качества Т-клеток с целью сохранения эффективности продукта является вопросом первостепенной важности для всех стадий масштабирования. Для способа производства аутологичных Т-клеток авторы данного изобретения идентифицировали критические стадии и разделили масштабирование на две части: масштабирование активации может быть выполнено на поверхности нетканевой культуры, а масштабирование трансдукции и экспансии может быть проведено в устройстве G-Rex.

Хотя микрогранулы или растворимые антитела представляют собой более простые способы активации клеток, которые легко поддаются масштабированию, способы производства аутологичных Т-клеток, в которых для активации используются иммобилизованные антитела на поверхности нетканевой культуры (24-луночный планшет), дают большую скорость трансдукции и большее увеличение количества при использовании лентивируса. Однако сбор активированных клеток с многочисленных лунок 24-луночных обработанных нетканевой культурой планшетов представляет собой трудоемкую и отнимающую много

времени стадию, которая усложняет простой в иных условиях процесс. Рассматривая активацию, например, до 1×10^9 МКПК, для сбора активированных клеток в каждом производственном цикле может потребоваться 20 планшетов и 480 манипуляций.

Традиционные способы активации Т-клеток могут включать трудоемкий процесс в открытой системе с использованием либо имеющихся в продаже микрогранул, либо обработанных нетканевой культурой 24-луночных планшетов, либо 6-луночных планшетов, покрытых антителами к CD3 и к CD28 ("нанесенных на планшет") при концентрации каждой, равной 1 мкг/мл. Способы, осуществляемые в открытой системе, тем не менее, могут занять относительно продолжительное время, например, примерно 8 часов, для их завершения. С целью упрощения трудоемкого процесса в открытой системе варианты осуществления данного раскрытия сущности изобретения могут включать простой процесс, приспособленный к закрытой системе, который может быть скомбинирован с контейнерами, например, мешками, имеющейся в продаже закрытой системы, например, системы G-Rex™ и системы культивирования клеток Xuri™, что приводит к получению профиля активации Т-клеток, обеспечению возможности использования для трансдукции Т-клеток и функциональности конечного продукта, сопоставимых с этими показателями для Т-клеток, активированных с использованием традиционных способов. В дополнение к вышесказанному, способы по этому раскрытию, например, способ с нанесением на поверхность флакона, могут потребовать относительно небольшого времени, например, примерно 1 часа, для завершения, что примерно в 8 раз меньше, чем традиционные способы.

Оптимизация разработки способа производства аутологичных Т-клеток была осуществлена в малом масштабе с использованием 24-луночных обработанных нетканевой культурой планшетов для активации и 24-луночных планшетов G-Rex для трансдукции и экспансии. В этом масштабе 1-2 миллиона Т-клеток, трансдуцированных в день 2, подверглись от 30-кратной до 40-кратной экспансии вплоть до дня 10, с получением 30-80 миллионов клеток во время сбора. Однако конечной целью способа может оказаться трансдукция 250-400 миллионов активированных клеток и их экспансия до более чем 10 миллиардов жизнеспособных CD3⁺ Т-клеток, ограничив продолжительность цикла производства десятью днями. Вследствие этого в одном аспекте в данном документе предлагается увеличение масштаба всего способа.

Для вариантов осуществления данного раскрытия, включая способы активации большего числа клеток, использование нетканевой культуры, обработанной во флаконах T175 см², обеспечивает увеличенную площадь поверхности и более простую платформу, требующую очень небольшого числа рабочих операций. После оптимизации использование нанесенных на поверхность флаконов антител для активации Т-клеток привело к степени экспансии и трансдукции, сопоставимой с антителами, нанесенными на планшет. Таким образом, увеличение масштаба стадии активации было главным усовершенствованием в упрощении способа производства аутологичных Т-клеток для применения в клинике. Исходя из большего числа клеток, трансдукцию и экспансию увеличили в масштабе за счет перехода от 24-луночных планшетов G-Rex к устройствам G-Rex 100. Использование устройств G-Rex может способствовать почти линейному увеличению масштаба послеактивационных стадий, особенно с точки зрения плотности посева. Другие параметры, такие как количество циклов кормления и посева, может быть стандартизовано для достижения максимальных скоростей экспансии и жизнеспособности. Валидация всего масштабированного способа в полномасштабных циклах PD обеспечивает успешный перенос технологии способа получения Т-клеточного продукта № 1 в рамках правил GMP.

Связанные с планшетом в сравнении со связанными с поверхностью флаконов.

Активация Т-клеток с последующей их трансдукцией и экспансией являются ключевыми стадиями способа производства Т-клеток. Для оптимизации условий масштабирования этих стадий использование флаконов T175 см² представляет собой удобную платформу для активации с большей площадью поверхности и меньшим числом манипуляций для замены 24-луночных планшетов, покрытых антителами к CD3 и к CD28. В сравнительном исследовании после оптимизации критических параметров во флаконах T175 см² клетки, активированные при помощи антител, покрывающих поверхность флакона, показали сопоставимые уровни активации, трансдукции и экспансии с клетками, активированными при помощи антител, нанесенных на 24-луночные планшеты (связанные с планшетом), у многих доноров.

Далее, стадии трансдукции и экспансии были масштабированы с малого масштаба (24-луночный планшет G-Rex) через средний масштаб (2-6 G-Rex10 или 1 G-Rex100) до полного масштаба (5-8 G-Rex100). Весь масштабированный способ может быть валидирован в 2-х циклах полномасштабного производства программы разработки процесса (PD). Все продукты, полученные при использовании конечного способа, отвечают критериям выпуска клинической продукции в отношении процентной доли Dex⁺ CD3⁺CD8⁺ клеток и полученного числа клеток, чтобы соответствовать требованиям получения клинических доз.

Сравнение Т-клеток, активированных методом связывания с планшетом и методом связывания с флаконом (обработанная нетканевой культурой флакон покрыт антителами к CD3 и к CD28) в отношении уровня активации (проточная цитометрия), возможности использования для трансдукции (окрашивание декстрамерами, FACS), экспансии (подсчет клеток) и функциональности (ИФН-гамма по методу ELISA).

МКПК от здоровых доноров активировали при помощи антител к CD3 и к CD28 с использованием обработанных нетканевой культурой флаконов T175 cm² или 24-луночных планшетов при подготовке к трансдукции. Активированные Т-клетки трансдуцировали лентивирусной конструкцией, кодирующей ТКР R7P1D5, и высевали в 24-луночные планшеты G-Rex или во флаконы G-Rex10/G-Rex100. Трансдуцированные Т-клетки были подвергнуты экспансии в присутствии ИЛ-7 и ИЛ-15 и собраны в день 10 процесса. Контроль в процессе производства и заключительный контроль проводили на продуктах с целью определения числа клеток, жизнеспособности и процентной доли трансдуцированных CD8⁺ Т-клеток.

Репрезентативные материалы и способы.

Поставляемые материалы	Изготовитель	Номер по каталогу
TexMACS media	Miltenyi Biotec	130-097-196
Человеческая сыворотка АВ	Gemini	100-512
ИЛ-7	Peprotech	200-07
ИЛ-15	Peprotech	200-15
Антитело к CD3	Ebioscience	16-0037-85
Антитело к CD28	Ebioscience	16-0289-85
24-луночные обработанные нетканевой культурой планшеты	Co-star	3738
Обработанные нетканевой культурой планшеты T175cm ²	Corning	431466
24-луночные планшеты G-Rex	Wilson Wolf	80192M
G-Rex10	Wilson Wolf	80040S
G-Rex100	Wilson Wolf	80500S
Коническая пробирка, 15 мл	Falcon	352097
Коническая пробирка, 50 мл	Corning	430290
Серологическая пипетка на 5 мл	BD	53300-421
Серологическая пипетка на 10 мл	BD	53300-523
Серологическая пипетка на 25 мл	BD	53300-567
Наконечники для пипеток, 1000 мкл	Rainin	17007954
Наконечники для пипеток, 200 мкл	Rainin	17007961
Наконечники для пипеток, 20 мкл	Rainin	17007957
Микроцентрифужная пробирка, 1,5 мл	Fisher	02-681-5
Окрашивающий раствор AORI	Nexcelom	CS2-0106
PBS без Mg и Ca	Lonza	17-516F/24
96-луночный планшет	Corning	3799
Пипеточный дозатор P-20	Rainin	17014382
Пипеточный дозатор P-200	Rainin	17014391
Пипеточный дозатор P-1000	Rainin	17017382
Pipetaid	Drummond	193970L
Флаконы T75	BD Falcon	BD353136
Бензоназа	Sigma	E1014
Протаминсульфат	McKesson	804514
Лентивирус	Lentigen	LV-R73, R78
Водный краситель Live/Dead	Thermo Fisher	L-34966
Микрогранулы ABC Comp	Thermo Fisher	A10497
CD3-BV421	BD	562426
CD8-APC	Biolegend	301014
CD4-PerCPy5.5	BD	560650
Декстрамер TAA-ФЗ	Immudex	н/п

Способы.

Эксперименты проводили после окончания стандартного способа производства аутологических Т-клеток, включающего 4 стадии: размораживание/стадия покоя, активация, трансдукция и экспансия, однако в разных масштабах.

Размораживание и стадия покоя.

Замороженные МКПК от здоровых доноров размораживали в теплой среде TexMACS, дополненной

5% человеческой сывороткой АВ (полной средой). Клетки обрабатывали нуклеазой бензоназой (50 Ед/мл) в течение 15 минут при 37°C, промывали, подсчитывали и выдерживали в стадии покоя в течение ночи в полной среде ТехMACS.

Активация.

В день, когда клетки размораживают, 24-луночные обработанные нетканевой культурой планшеты или флаконы T175 см² покрывали антителами к CD3 и к CD28, разведенными PBS (1 мкг/мл), запечатывали и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день МКПК, находящиеся в стадии покоя, собирали, подсчитывали, промывали и ресуспендировали при концентрации 1×10^6 /мл. Раствор антител аспирировали, а лунки промывали полной средой с последующим добавлением 2×10^6 клеток в каждую лунку. Активацию проводили при 37°C в течение определенных промежутков времени.

Трансдукция.

Активированные клетки собирали, промывали и подсчитывали. Смеси для трансдукции, содержащие доклинические лентивирусные супернатанты (из расчета на основе конкретных значений MOI), протаминсульфат (10 мкг/мл), ИЛ-7 (10 нг/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). Для каждой трансдукции отделяли активированные клетки и центрифугировали 5 минут при 400 д. Каждый клеточный осадок ресуспендировали в трансдукционной смеси (1 мл на 2×10^6 клеток) и высевали во флакон G-Rex соответствующего размера. После 24 часов инкубации при 37°C и 5% CO₂ объем культуры в каждом флаконе G-Rex доводили до половины или полной ее вместимости, как оговорено, при помощи среды, дополненной ИЛ-7 (10 нг/мл) и ИЛ-15 (100 нг/мл). Регулярно отслеживали число частиц и жизнеспособность вплоть до дня 10 способа. Для отслеживания поверхностной экспрессии ТКР методом FACS использовались мультимерные комплексы пептида и молекулы МНС (декстрамер или тетрамер).

Проточная цитометрия.

Вкратце, согласно рабочим инструкциям окрашивали $1,0 \times 10^6$ трансдуцированных клеток. После окрашивания тетрамером последовало окрашивание антителами к поверхностным маркерам Т-клеток (например, CD3, CD4, CD8 и т. д.). Образцы были получены при помощи автоматической компенсационной матрицы, полученной из компенсационных микрогранул.

Результаты.

Чтобы оценить обработанные нетканевой культурой флаконы T175 см² в качестве альтернативы 24-луночным планшетам, покрытым антителами к CD3 и к CD28, для активации Т-клеток, концентрацию антител поддерживали такой же, как и для маломасштабного способа, а другие параметры, такие как объем покрытия, плотность клеток и объем инокулята, оптимизировали для большей поверхности во флаконе.

Для сравнения жизнеспособности и экспрессии маркеров активации CD25 и CD69 и LDL-R в активированных МКПК, связанных с планшетом (PB) и связанных с флаконом (FB), было проведено окрашивание и получение популяций методом FACS через 16-24 часа после активации с использованием антител к CD3 и к CD28 в форме FB или PB. В качестве отрицательных контролей использовали МКПК.

На фиг. 15 продемонстрировано, что при оптимизированных условиях Т-клетки, активированные во флаконах T175см² (связанные с флаконом, FB), проявляют уровни экспрессии маркеров активации CD25 и CD69 и LDL-R, сопоставимые с их уровнями для Т-клеток, активированных в условиях связывания с планшетом (PB). Эти результаты свидетельствуют о том, что масштабированная активация с использованием антител FB может быть оправданной ввиду сопоставимых уровней активации, получаемых для Т-клеток, активированных в условиях FB и PB.

Для сравнения экспрессии и экспансии трансгена в день 10 собранными Т-клеточными продуктами (от донора 6, донора 7 и донора 8), с использованием антител PB или FB для активации, при помощи метода проточной цитометрии с использованием ТАА-специфического декстрамера или трансгенного антитела, специфичного к β-цепи ТКР, определяли поверхностную экспрессию ТКР R7P1D5. Кратность экспансии рассчитывали на основании числа жизнеспособных клеток, посеянных в планшет или флакон G-Rex во время трансдукции (день 2) и в день сбора (день 10). На фиг. 16А и 16В показаны сопоставимые уровни трансдукции и кратности экспансии, соответственно, Т-клеток, активированных в условиях FB и PB. Эти результаты свидетельствуют о том, что масштабированная трансдукция и экспансия с использованием антител FB может быть оправданной ввиду сопоставимых уровней трансдукции и экспансии, получаемых для Т-клеток, активированных в условиях FB и PB.

Для дальнейшей валидации успешного масштабирования активации было проведено сравнение функциональной способности Т-клеточного продукта, полученного при помощи способов активации в условиях FB и PB. Для оценки индукции антиген-специфичного ИФН-гамма трансдуцированными LV-R73 Т-клеточными продуктами с использованием антител PB или FB для активации, при помощи имеющегося в продаже набора ELISA был качественно определен ИФН-гамма, высвобожденный в супернатант Т-клеток, культивированных совместно с линиями опухолевых клеток (Target+ve, Target-ve).

На фиг. 17 показано, что активированные в условиях FB и трансдуцированные LV-R73 Т-клетки секретируют уровни антиген-специфичного ИФН-гамма, сопоставимые с его уровнями в случае активированных в условиях FB и трансдуцированных Т-клеток в ответ на действие опухолевых клеток, экс-

прессирующих ТАА, у каждого из доноров 6, 7 и 8. Эти результаты свидетельствуют о том, что масштабирование секретирующих ИФН-гамма Т-клеток с использованием антител FB может быть оправданным ввиду сопоставимых уровней секреции ИФН-гамма, получаемых для Т-клеток, активированных в условиях FB и PB.

Для масштабирования оставшихся стадий способа $2,5 \times 10^8$ - $4,0 \times 10^8$ активированных Т-клеток трансдуцировали и высевали при оптимальной плотности посева $0,5 \times 10^6$ на см^2 площади поверхности флакона G-Rex100. Для посева трансдуцированных клеток при оптимальной плотности использовали большое количество флаконов G-Rex100. Для достижения максимальной экспансии были также оптимизированы дополнительные параметры, такие как условия кормления и посева клеток. Конечный способ производства был проверен в 2-х циклах полномасштабного производства программы разработки процесса (PD). Все продукты, полученные в конечном способе, соответствовали критериям выпуска по процентной доле декстримеров и числу интегрированных копий. Число клеток, полученных в этих циклах производства, соответствовало требованиям получения клинических доз на уровне всех когорт. Результаты циклов масштабирования PD сведены в приведенную ниже табл. 1.

Таблица 1

Сводка характеристик продукта 2-х проведенных полномасштабных циклов PD

№ цикла масштабирования	Донор	% CD3	% CD8	% декстример ⁺	Число интегрированных копий	Число клеток
1	Донор 6	99,5%	66,9%	21,6%	0,96	$1,01 \times 10^{10}$
2	Донор 9	96,2%	57,7%	23,1%	1,21	$1,05 \times 10^{10}$

Производство по вышеописанному способу по правилам GMP дало свыше 20 миллиардов клеток для нескольких доноров.

Связанные с флаконом в сравнении со связанными с мешком.

Сравнение Т-клеток, активированных способом связывания с флаконом и способом связывания с мешком (например, мешок Saint-Gobain VueLife AC, покрытый антителами к CD3 и к CD28) в отношении уровня активации (проточная цитометрия), возможности использования для трансдукции (окрашивание декстрамерами, FACS) и экспансии (подсчет клеток).

Для сравнения активации Т-клеток при использовании мешков, покрытых антителами к CD3 и к CD28, в сравнении с планшетами, на фиг. 18 показана экспериментальная разработка, использованная для исследования влияния мешков и планшетов, покрытых антителами к CD3 и к CD28, на активацию Т-клеток. Вкратце, в день 0 МКПК были разморожены и переведены в стадию покоя всю ночь (на 24 часа). В день 1 МКПК, находящиеся в стадии покоя, были активированы их высевом на флакон, например, флаконы T175 см^2 , или мешки, например, мешки Saint-Gobain VueLife AC, покрытые антителами к CD3 и к CD28, в течение 16-20 часов. В день 2 активированные Т-клетки анализировали на экспрессию CD25, CD69 и hLDL-R и трансдуцировали VSV-G-псевдотипированными лентивирусными векторами, например, 1xEng LV-R73. В дни 6/7 и 10 провели анализы, такие как подсчет клеток, жизнеспособность и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) с помощью декстрамеров (Dex).

На фиг. 19 показано, что при оптимизированных условиях Т-клетки (от донора 16 и донора 14), активированные антителами, связанными с мешками, при концентрациях 1 мкг/мл и 2 мкг/мл проявляют уровни экспрессии маркеров активации CD25 и CD69 и LDL-R, сопоставимые с их уровнями для Т-клеток, активированных в условиях связывания с флаконами (флаконы T175 см^2 , маркированные как "стандарт"). Эти результаты свидетельствуют о том, что масштабированная активация с использованием связанных с мешком антител (Bag) может быть оправданной ввиду сопоставимых уровней активации, получаемых для Т-клеток, активированных в условиях связывания с мешком (Bag) и связывания с флаконом (FB).

На фиг. 20 и 21 показано, что в день 6 и день 10 экспансии, соответственно, Т-клетки (от донора 16 и донора 14), активированные антителами, связанными с мешками, при концентрациях 1 мкг/мл и 2 мкг/мл имеют значения числа Т-клеток, т.е. экспансию, сопоставимые с таковыми для Т-клеток, активированных в условиях FB. Эти результаты свидетельствуют о том, что масштабированная экспансия с использованием связанных с мешком антител может быть оправданной ввиду сопоставимых уровней экспансии, получаемых для Т-клеток, активированных в условиях связывания с мешком и связывания с флаконом.

Пример 4.

Короткая продолжительность стадии покоя в сравнении со стадией покоя в течение ночи в способе производства Т-клеток.

На фиг. 22 показан способ производства Т-клеток 220 путем выдерживания МКПК в стадии покоя в течение периода времени примерно 4 часа согласно одному варианту осуществления данного изобретения. Например, способ производства Т-клеток 220 может включать выделение МКПК из продуктов лей-

кафереза и их криоконсервацию (221), при этом может быть проведено испытание стерильности; размораживание, стадия покоя (например, примерно 4 часа) и активация Т-клеток (222); трансдукция вирусным вектором (223); экспансию под воздействием цитокинов (224); рассев/кормление клеток (225), при котором могут проводиться подсчет клеток и иммунофенотипирование; сбор и криоконсервацию клеток как лекарственного препарата (226), при которых проводятся подсчет клеток и тест на микоплазму, и выпуск продукта после криоконсервации (227), при котором проводятся испытания жизнеспособности, стерильности, на эндотоксины, иммунофенотипирование, определение числа копий интегрированного вектора и гликопротеина вируса везикулярного стоматита (VSV-g).

В табл. 2 показаны характеристики Т-клеток, произведенных в трех разных циклах с целью квалификации способа производства Т-клеток 220 путем выдерживания МКПК в стадии покоя в течение короткого периода времени, например, от примерно 4 до примерно 6 часов, в присутствии ИЛ-7 согласно одному варианту осуществления данного раскрытия сущности изобретения.

Таблица 2

Циклы с целью квалификации (QR) способа производства Т-клеток 220 путем выдерживания МКПК в стадии покоя в течение короткого периода времени, например, от примерно 4 до примерно 6 ч, предпочтительно примерно 4 ч (в чистом помещении по GMP)

	QR1	QR2	QR3	Среднее
% CD3+	99,6	99,7	99,8	99,7
% CD8+	33,5	51,5	75,2	53,4
% Dex+/CD3+CD8+	35,5	72,7	83,0	63,7
% жизнеспособных клеток	92,0	92,2	91,7	92,0
Остаточный VSV-g	< 50 копий/мкг	< 50 копий/мкг	< 50 копий/мкг	< 50 копий/мкг
Среднее число копий (на клетку)	1,0	3,0	4,2	2,7
Общее число жизнеспособных клеток	24,8 x 10 ⁹	32,2 x 10 ⁹	26,8 x 10 ⁹	28,0 x 10 ⁹
Трансдуцированные клетки	2,95 x 10 ⁹	12,1 x 10 ⁹	16,73 x 10 ⁹	10,6 x 10 ⁹
Дни производства	10	8	8	8,7
Клеток при трансдукции	281 x 10 ⁶	400 x 10 ⁶ (макс)	400 x 10 ⁶ (макс)	360 x 10 ⁶
Кратность экспансии	88	81	67	78,7
Серия LV	ПРОИЗВ	ПРОИЗВ	GMP	Н/П

На фиг. 23А и в табл. 2 показано, что среднее значение кратности экспансии Т-клеток (n=7), произведенных при продолжительности стадии покоя МКПК в течение ночи, составляет примерно 78,7.

Для определения, экспрессируется ли трансдуцированный ТКР на клеточной поверхности экспандированных Т-клеток, экспандированные Т-клетки были окрашены декстрамерами, нагруженными комплексом пептид/МНС, которые специфически связываются с трансдуцированными ТКР, с последующим исследованием методом проточной цитометрии для идентификации CD8+ Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР. На фиг. 23В и в табл. 2 показано, что средняя процентная доля Dex+/CD8+ Т-клеток (n=7), произведенных с короткой продолжительностью стадии покоя, составляет примерно 53,4%, что указывает на экспрессию трансдуцированных ТКР на клеточной поверхности экспандированных Т-клеток.

Для определения того, какие фенотипы Т-клеток присутствуют в популяции экспандированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, клетки окрашивали различными поверхностными маркерами иммунных клеток с последующим исследованием методом проточной цитометрии для иден-

тификации фенотипов Т-клеток, например, $T_{n/scm}$, T_{cm} , T_{em} и T_{eff} . Среди них $T_{n/scm}$ может оказаться более желательным для иммунотерапии, чем другие, поскольку $T_{n/scm}$ может обладать свойствами лимфоидного хоминга, высоким потенциалом пролиферации, самообновлением и мультипотентностью. Фиг. 23С показывает, что в среднем у примерно 50% экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, проявляется фенотип $T_{n/scm}$.

Для определения цитотоксической активности экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, опухолевые клетки, нагруженные разными концентрациями пептида-мишени, инкубировали с экспансированными Т-клетками, экспрессирующими трансдуцированный ТКР, который специфически распознает комплекс пептида-мишени и молекулы МНС, с последующим измерением роста опухолевых клеток. Фиг. 23D демонстрирует, что экспансированные Т-клетки, экспрессирующие трансдуцированный ТКР, ингибируют рост опухолевых клеток в зависимости от концентрации пептида.

Цитотоксическая активность экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, оказалась сопоставимой для МКПК, полученных от разных здоровых доноров, например, доноров 7, 13, 17, 18 и 21 (фиг. 23E), и для МКПК, полученных от разных пациентов, например, пациентов 312, 319, 351, 472 и 956 (фиг. 23F).

Для определения цитотоксического потенциала экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, опухолевые клетки, экспрессирующие пептид-мишень, инкубировали с экспансированными Т-клетками, экспрессирующими трансдуцированный ТКР (220-Т), который специфически распознает комплекс пептида-мишени и молекулы МНС, с последующим измерением кратности роста опухолевых клеток. Фиг. 23G и фиг. 23H демонстрируют повышенную регрессию или подавление роста опухоли при инкубации с экспансированными Т-клетками, экспрессирующими трансдуцированный ТКР (220-Т) (эффекторами), при соотношении числа эффекторов и опухолевых клеток 10:1 и 3:1 по сравнению с этими показателями для нетрансдуцированных Т-клеток, не содержащих специфического к мишени ТКР (NT).

На фиг. 24 показана схема способа производства Т-клеток 240 с длительностью стадии покоя МКПК в течение ночи (примерно 16 часов). Например, способ производства Т-клеток 240 может включать выделение МКПК (241), в котором МКПК могут быть использованы свежеполученными или храниться в замороженном виде до использования, или могут быть использованы в качестве исходного материала для производства Т-клеток, и может также быть возможным отбор популяций лейкоцитов (например, CD8, CD4 или обеих); размораживание и выдерживание в стадии покоя в течение ночи, например, примерно 16 часов (242), что может способствовать гибели, одна за другой, апоптотических клеток и восстановлению функций Т-клеток (необходимость в этой стадии может отпасть, если используются свежие материалы); активацию лимфоцитов (243), для которой могут использоваться антитела к CD3 и к CD28 (растворимые или связанные с поверхностью, например, магнитных или биodeградируемых микрогранул); трансдукцию при помощи CAR или ТКР (244), для которой могут использоваться лентивирусные или ретровирусные конструкции, кодирующие CAR или ТКР, или могут применяться методы без вирусов; и экспансию, сбор и криоконсервацию лимфоцитов (245), которые могут совершаться в присутствии цитокина(ов), сыворотки ABS или FBS) и/или среды для криоконсервации.

В табл. 3 показаны характеристики Т-клеток, произведенных в трех разных циклах квалификационных испытаний способа производства Т-клеток (240) при выдерживании МКПК в стадии покоя в течение ночи, например, примерно 16 часов.

Таблица 3

Циклы квалификационных испытаний (QR) способа производства Т-клеток при выдерживании МКПК в стадии покоя в течение ночи (в чистом помещении по GMP)

	QR1	QR2	QR3	Среднее
% CD3+	99,2	99,6	99,7	99,5
% CD8+	47,9	46,9	60,9	51,9
% Dex+/CD3+CD8+	36,7	57,3	64,9	53,0

% жизнеспособных клеток	85,6	86,8	85,5	86,0
Остаточный VSV-g	< 50 копий/мкг	< 50 копий/мкг	< 50 копий/мкг	< 50 копий/мкг
Среднее число копий (на клетку)	2,7	3,2	3,6	3,2
Общее число жизнеспособных клеток	$8,7 \times 10^9$	$24,3 \times 10^9$	$14,2 \times 10^9$	$15,7 \times 10^9$
Трансдуцированные клетки	$1,3 \times 10^9$	$5,65 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$
Дни производства	8	9	8	8,3
Клеток при трансдукции	231×10^6	400×10^6	400×10^6	344×10^6
Кратность экспансии	38	61	36	45
Серия LV	ПРОИЗВ	ПРОИЗВ	GMP	Н/П

В отличие от способа производства Т-клеток с короткой продолжительностью стадии покоя, например, примерно 4 часа, Т-клетки, произведенные со стадией покоя длительностью примерно 16 часов, дали меньшую кратность экспансии Т-клеток. На фиг. 25А и в табл. 3 показано, что среднее значение кратности экспансии Т-клеток (n=7), произведенных при продолжительности стадии покоя МКПК примерно 16 часов, составляет примерно 45, по сравнению с примерно 78,7 для способа с короткой продолжительностью стадии покоя примерно 4 часа (табл. 2). ЦПТ и ЦКИ обозначают Циклы переноса технологии и Циклы квалификационных испытаний, соответственно.

Длительность стадии покоя в течение ночи (примерно 16 часов) обеспечила получение меньшего количества экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, чем стадия покоя длительностью примерно 4 часа. На фиг. 25А и в табл. 3 показано, что средняя процентная доля Dex+/CD8+ Т-клеток (n=7), произведенных при продолжительности стадии покоя МКПК в течение ночи, примерно 16 часов, составляет примерно 51,9%, по сравнению с примерно 53,4% для продолжительности стадии покоя примерно 4 часа (табл. 2).

Длительность стадии покоя в течение ночи, примерно 16 часов, обеспечила получение меньшего количества экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированный ТКР, с фенотипом $T_{n/scm}$, чем стадия покоя длительностью примерно 4 часа. На фиг. 25С показано среднее значение примерно 40% (n=5) для экспансированных Т-клеток, имеющих фенотипы $T_{n/scm}$, по сравнению с примерно 50% при стадии покоя длительностью примерно 4 часа (фиг. 23С).

На фиг. 25D отражено значительно большее ингибирование роста опухолевых клеток при помощи инкубации опухолевых клеток экспансированными Т-клетками, экспрессирующими трансдуцированные ТКР (эффекторы), при соотношении числа эффекторов и опухолевых клеток 10:1, 3:1 и 1:1, чем для отрицательных контролей, например, опухолевых клеток, инкубированных либо экспансированными Т-клетками, не экспрессирующими трансдуцированные ТКР (Target-ve), либо в отсутствие эффекторов. Кроме того, цитотоксическая активность экспансированных Т-клеток, экспрессирующих трансдуцированные ТКР, по-видимому, сопоставима для МКПК, полученных от здоровых доноров (n=5) (фиг. 25Е) и от больных раком пациентов (n=7) (фиг. 25F).

В табл. 4 сведены характеристики Т-клеток, произведенных при короткой продолжительности стадии покоя примерно 4 часа, в соответствии с одним вариантом осуществления данного изобретения (способ 220), и при продолжительности стадии покоя примерно 16 часов (способ 240).

Таблица 4

Способ	Кратность экспансии	Подсчет собранных клеток	Жизнеспособность $\geq 70\%$	% живых CD3+ $\geq 80\%$	% CD8+ от CD3+	% Dex+ от CD8+ $\geq 10\%$
220	78,7	$28,0 \times 10^9$	92,0	99,7	53,4	63,7
240	45,0	$15,7 \times 10^9$	86,0	99,5	51,9	53,0

В табл. 4 показано, что способ 220 с короткой продолжительностью стадии покоя (примерно 4-6 часов) может обеспечить один лишний день экспансии, например, день 8 способа 240 представляет собой день 9 способа 220, приводя, таким образом, к получению большего числа клеток.

Пример 5.

Производство Т-клеток в закрытой системе.

Как указывалось выше, способы 220 и 240 могут быть реализованы в открытых системах, таких как G-Rex™. Манипуляции *ex vivo* с гематопозитическими клетками, например, Т-клетками, в открытых системах, могут сопровождаться риском загрязнения возбудителями инфекций и могут снижать перевивочный потенциал и гематопозитическую пригодность. При производстве клеток для применения в клинике могут оказаться предпочтительными закрытые системы в связи с обеспечением стерильности в ходе процессов культивирования клеток.

На фиг. 26 изображен протокол манипуляций *ex vivo* для открытых и закрытых систем. Закрытые системы могут не только снизить риски загрязнения при внешней обработке, но и способствовать стойкости и качеству продукта и повысить безопасность продукта, таким образом, они могут уменьшить проблемы с последующими стадиями переработки, анализом конечного продукта и тестированием. В то время как относительно небольшое число клеток, например, $\leq 1 \times 10^9$, можно культивировать в относительно небольшом объеме в открытой системе, например, 1 литре, относительно большое число клеток, от примерно 1×10^9 до примерно 2×10^{11} , можно культивировать в относительно большом объеме в закрытой системе, например, от 5 литров в системе (например, в биореакторном мешке WAVE (Xuri™) и флаконах G-Rex™) до 50 литров (например, статично культивирование в мешках). Эти технологии культивирования клеток в закрытых системах могут обеспечить высококачественные индивидуализированные средства клеточной терапии в регулируемом, требующем меньшего времени и экономически эффективном способе производства клеток.

Способ производства Т-клеток в соответствии с данным раскрытием может быть осуществлен в любой из закрытых систем культивирования клеток, включая имеющиеся в продаже системы, например, CliniMACS Prodigy™ (Miltenyi), биореактор WAVE (Xuri™) (GE Biosciences) в отдельности или в комбинации с BioSafe Sepax™ II, и закрытой системе G-Rex/GatheRex™ (Wilson Wolf) в отдельности или в комбинации с BioSafe Sepax™ II. Закрытая система G-Rex™ представляет собой сосуд для экспансии, а GatheRex™ представляет собой насос для концентрирования и сбора.

CliniMACS Prodigy™ (Miltenyi).

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

Биореактор WAVE (Xuri™) (GE Biosciences).

Биореактор WAVE (Xuri™) обеспечивает культивирование Т-клеток в культуральных мешках, например, в Xuri Cellbag, с перфузией или без нее. Мешок среднего размера для обеспечения клеток питательными веществами может представлять собой 5-литровый Nyclone Labtainer. Мешком для отходов может быть Mbag (приобретенный у GE Healthcare). Эта система может производить примерно $4-5 \times 10^9$ клеток, включать программное обеспечение UNICORN, которое обеспечивает контроль и отслеживание культуры, содержит качающийся лоток, который может вместить от примерно 0,3 литра до 25 литров, и осуществлять функцию перфузии для поддержания объема культуры, при этом обеспечивая обмен газов и введение свежей среды.

Биореактор WAVE (Xuri™) может включать мешки Xuri Bag для экспансии, мешки VueLife от Saint Gobain для размораживания и стадии покоя и мешки VueLife AC для активации. Биореактор WAVE (Xuri™) может использоваться в комбинации с другими технологиями, например, с системой разделения

клеток Sepax™ (GE Biosciences) для стадий промывки культуры и уменьшения объема. Устройство для стерильного запаивания (Terumo BCT™) может использоваться для соединения стерильных мешков для переноса растворов, а термическое устройство для запаивания - для запаивания магистралей.

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

Как показано на фиг. 27, в день 0 замороженные МКПК, выделенные с помощью системы разделения клеток Sepax™, могут быть разморожены, промыты, переведены в стадию покоя, например, в течение ночи (O/N), а культуральные мешки, например, мешки для клеток VueLife AC, могут быть покрыты антителами к CD3 и к CD28; в день 1 МКПК, находящиеся в стадии покоя, могут быть перенесены в культуральные мешки, покрытые антителами к CD3 и антителами к CD28 для активации; в день 2 клетки могут быть промыты и объем среды может быть уменьшен при помощи системы разделения клеток Sepax™ до надлежащего объема, пригодного для вирусной трансдукции, например, трансдуцированы лентивирусным вектором, экспрессирующим ТКР. Экспансию клеток можно выполнить в культуральных мешках Xuri™ на качающемся лотке с функцией перфузии для поддержания объема культуры, обеспечивая газообмен и введение свежей среды и цитокинов в клеточную культуру. Экспандированные трансдуцированные Т-клетки можно собрать и промыть при помощи системы разделения клеток Sepax™.

Закрытая система G-Rex/GatheRex™ (Wilson Wolf).

Закрытая система G-Rex/GatheRex™ включает газообменный сосуд (G-Rex-CS) для экспансии клеток и автоматический насос (GatheRex), который может позволить оператору слить излишек среды из культуры и собрать клетки без риска их загрязнения. Процесс сбора можно разделить на две стадии: концентрирование клеток и сбор клеток. В ходе процесса концентрирования закрытая система GatheRex™ может функционировать за счет воздушного насоса, который создает давление в устройстве G-Rex™, например, во флаконах, при помощи стерильного воздуха, обеспечивает вытеснение 90% среды, находящейся над клетками, в мешок для сбора среды. По окончании процесса первый оптический детектор чувствует наличие воздуха в линии сбора среды, автоматически останавливая насос. Перед началом процесса сбора оператор может ресуспендировать клетки при помощи остаточных 10% среды, вручную вращая устройство G-Rex™ для удаления клеток с газопроницаемой мембраны. Затем воздушный насос повторно активируют, и ресуспендированные клетки перемещаются в мешок для сбора клеток. Этот этап может закончиться автоматически, как только второй оптический детектор обнаруживает наличие воздуха в линии сбора клеток. Эта система может производить примерно $5-20 \times 10^9$ клеток и вмещать 5 литров на сосуд.

Закрытая система G-Rex/GatheRex™ может поддерживать трансдукцию и экспансию в сосуде и осуществлять сбор при помощи насоса. Стадии размораживания, пребывания в покое и активации могут осуществляться в мешках VueLife™. Закрытая система GatheRex™ может использоваться в сочетании с другими технологиями, например, с системой разделения клеток Sepax™ для стадий промывки культуры и уменьшения объема. Устройство для стерильного запаивания (Terumo BCT™) может использоваться для соединения стерильных мешков для переноса растворов, а термическое устройство для запаивания - для запаивания магистралей.

Как следует из фиг. 28, в день 0 замороженные МКПК, выделенные с помощью системы разделения клеток Sepax™, могут быть разморожены, промыты, переведены в стадию покоя, например, в течение ночи (O/N); в день 1 культуральные мешки могут быть покрыты антителами к CD3 и к CD28 и МКПК, находящиеся в стадии покоя, могут быть перенесены в покрытые культуральные мешки для активации; в день 2 клетки могут быть промыты и объем среды может быть уменьшен при помощи системы разделения клеток Sepax™ до надлежащего объема, пригодного для вирусной трансдукции, например, трансдуцированы лентивирусным вектором, экспрессирующим ТКР. Экспансия и обеспечение клеток питательными веществами может быть выполнено в устройствах закрытой системы G-Rex™. Экспандированные трансдуцированные Т-клетки можно собрать при помощи насоса GatheRex™ и промыть при помощи системы разделения клеток Sepax™.

В табл. 5 приведены результаты сравнения Т-клеток, полученных в открытых системах, например, G-Rex™, как описано в табл. 4, т.е. способами 220 и 240, и Т-клеток, полученных в закрытых системах, например, в CliniMACS Prodigy™, биореакторе WAVE (XURI™) в комбинации с BioSafe Sepax™ II, и закрытой системе G-Rex/GatheRex™ в комбинации с BioSafe Sepax™ II.

Таблица 5

Способ	Кратность экспансии	Подсчет собранных клеток	Жизнеспособность $\geq 70\%$	% живых CD3+ $\geq 80\%$	% CD8+ от CD3+	% Dex+ от CD8+ $\geq 10\%$
220	78,7	$28,0 \times 10^9$	92,0	99,7	53,4	63,7
240	45,0	$15,7 \times 10^9$	86,0	99,5	51,9	53,0
CliniMACS Prodigy™	55,0	$4,4 \times 10^9$	95,4	98,5	55,0	39,7
Биореактор WAVE (XURI™) в комбинации с BioSafe Sepax™ II	40,3	$16,1 \times 10^9$	92,0	99,6	60,8	41,7
G-Rex/GatheRex™ в комбинации с BioSafe Sepax™ II	46,3	$18,5 \times 10^9$	89,7	99,4	62,8	49,5

Эти результаты показывают, что способ производства Т-клеток в соответствии с данным раскрытием может быть легко осуществлен в закрытых системах для получения Т-клеток с характеристиками, сопоставимыми с таковыми, полученными с открытых систем, в то же время снижая риски загрязнения при внешней обработке, способствуя стойкости и качеству продукта и повышая безопасность продукта, таким образом, уменьшая проблемы с последующими стадиями переработки, анализом конечного продукта и тестированием.

Для дополнительного сравнения функциональных характеристик генетически модифицированных Т-клеток, произведенных в закрытых системах, с характеристиками Т-клеток, произведенных в открытых системах, МКПК, полученные от донора 17, обрабатывали с целью получения экспансированных трансдуцированных Т-клеток по способу по данному изобретению. Экспансированные трансдуцированные Т-клетки, экспрессирующие ТКР, были затем проанализированы на высвобождение ИФН-гамма в присутствии и в отсутствии комплекса ТКР-специфического пептида и молекулы МНС (мишени).

Фиг. 29 демонстрирует, что генетически модифицированные Т-клетки, произведенные в закрытых системах, согласно результатам измерений в двух циклах, цикле № 1 и цикле № 2, высвобождали значительно большее количество ИФН-гамма в присутствии мишени, чем клетки, произведенные в открытой системе, например, по способу 220. Эти результаты указывают на то, что генетически модифицированные Т-клетки, произведенные в закрытых системах, могут проявлять более высокую цитотоксическую активность, чем произведенные в открытых системах.

Пример 6.

Производство Т-клеток с встроенными ТКР по правилам GMP в течение 5-6 дней.

Подход адоптивной клеточной терапии аутологичными генетически модифицированными Т-клетками превращает в капитал разработку с ростом масштабов производства в сфере безопасных и эффективных мишеней и распознающих их ТКР. Эти ТКР перенесены методами генной инженерии в собственные (аутологичные) Т-клетки пациента с целью иммунотерапии солидных опухолей.

Фиг. 30 демонстрирует схему производства трех Т-клеточных продуктов (Т-клеточный продукт № 1, Т-клеточный продукт № 2 и Т-клеточный продукт № 3), каждый из которых экспрессирует трансгенный ТКР к его собственному соответствующему антигену, рестриктированному по HLA-A*02:01 и нацеленному на опухоль. Т-клеточный продукт № 1 и Т-клеточный продукт № 2 были произведены примерно за 8-11 дней и примерно за 7-10 дней, соответственно, от размораживания замороженных МКПК, перевода размороженных МКПК в стадию покоя и активации пребывающих в стадии покоя МКПК (стадия 2), трансдукции активированных Т-клеток (стадия 3), до стадии "сбор и криоконсервация клеток как лекарственного препарата" (стадия 6), используя открытые системы в ходе фазы 1 первых испытаний на человеке новых экспериментальных препаратов.

Т-клеточный продукт № 3 может быть произведен путем сокращения стадии экспансии примерно с 5-8 дней (Т-клеточные продукты № 1 и № 2) до примерно 3-4 дней. Кроме того, Т-клеточный продукт

№ 3 может быть произведен путем активации свежих МКПК, т.е. МКПК не подвергаются криоконсервации с последующим размораживанием в день 0. В этом состоит отличие от производства Т-клеточного продукта № 1 путем размораживания подвергнутых криоконсервации МКПК в день 0 с последующей активацией размороженных МКПК в день 1 и от производства Т-клеточного продукта № 2 путем размораживания подвергнутых криоконсервации МКПК с последующей активацией размороженных МКПК в день 0.

В отличие от Т-клеточных продуктов № 1 и № 2, произведенных при использовании открытых систем, Т-клеточный продукт № 3 может быть произведен в полностью закрытой системе или полузакрытой системе, в которой некоторые стадии могут быть выполнены с использованием открытых систем, например, от активации Т-клеток до уменьшения объема для трансдукции и/или от сбора клеток до промывки, концентрирования и криоконсервации.

На фиг. 31 показано, что общее время производственного цикла от сбора клеток за процедуру лейкофереза до готовности к инфузии Т-клеточного продукта № 1 может составлять примерно 30 дней, например, примерно 14 дней от отбора образца до сбора клеток и примерно 16 дней от проведения контроля качества (QC) до выпуска продукта; и общее время производственного цикла для Т-клеточного продукта № 2 может составлять примерно 26 дней, например, примерно 10 дней от отбора образца до сбора клеток и примерно 16 дней от QC до выпуска продукта.

Имеется, тем не менее, потребность в сокращении времени производственного цикла. Как показано на фиг. 30, Т-клеточный продукт № 3 был произведен по более короткому производственному циклу, например, за 5-6 дней, от "необязательного размораживания, пребывания в стадии покоя и активации" (стадия 2) до "сбора и криоконсервации клеток как лекарственного препарата" (стадия 6) при использовании полузакрытых систем. На фиг. 31 показано, что производство ТКР-Т-клеточного продукта № 3 может занять примерно 23 дня, например, примерно 7 дней от отбора образца до сбора клеток и примерно 16 дней от QC до выпуска продукта. Серийное производство, например, ТКР-Т-клеточных продуктов, например, Т-клеточного продукта № 1, Т-клеточного продукта № 2 и Т-клеточного продукта № 3, может занять примерно 13 дней, например, примерно 6 дней от отбора образца до сбора клеток и примерно 7 дней от QC до выпуска продукта.

На фиг. 32 представлена схема способа производства Т-клеток 320 с использованием свежих МКПК, которые не получают размораживанием подвергнутых криоконсервации МКПК, таким образом снижая потери клеток в связи с замораживанием, размораживанием и/или пребыванием МКПК в стадии покоя и обеспечивая получение максимально возможного количества клеток в начале процесса производства. Например, способ производства Т-клеток 320 может включать день 0, выделение свежих МКПК (321), активацию свежих лимфоцитов (322) с использованием, например, антител к CD3 и к CD28 (растворимых или связанных с поверхностью, например, магнитных или биodeградируемых микрогранул) в мешках, например, мешках Saint-Gobain VueLife AC, покрытых антителами к CD3 и к CD28; день 1, трансдукцию при помощи CAR или ТКР (323), с использованием, например, лентивирусных или ретровирусных конструкций, кодирующих CAR или ТКР, или методов без вирусов, например, с липосомами; и день 2, экспансию лимфоцитов, день 5/6, сбор и криоконсервацию (324) в присутствии цитокина(ов), сыворотки (ABS или FBS) и/или среды для криоконсервации.

Улучшенный профиль продукта при более короткой экспансии.

Качество, эффективность, продолжительность и место локализации Т-клеточного иммунитета могут определяться диверсификацией наивных Т-клеток (T_n) в различные отличающиеся по фенотипу популяции с конкретными ролями в иммунной защите. Они включают стволовые клетки памяти (T_{scm}), центральные клетки памяти (T_{cm}), эффекторные клетки памяти (T_{em}) и высоко дифференцированные эффекторные (T_{eff}) Т-клетки. Антиген-специфические T_n дают начало долгоживущим T_{scm} и T_{cm} , которые характеризуются самообновлением и обеспечивают пролиферирующие популяции более короткоживущих клеток T_{em} и T_{eff} . Таким образом, выбор менее дифференцированных популяций T_n , T_{scm} или T_{cm} для генетической модификации может обеспечить получение клеток с большей терапевтической эффективностью.

Для оценки статуса дифференциации Т-клеточных продуктов, собранных в различное время в процессе производства, CD8+ Т-клетки, полученные от 3 доноров (донор 1, донор 2 и донор 3), были собраны в день 4 (экспансия в течение 3 дней), 7 (экспансия в течение 6 дней) и 10 (экспансия в течение 9 дней) процесса производства, с последующим анализом методом фенотипирования Т-клеток памяти.

Фиг. 33 показывает, что количество CD8+ Т-клеток, проявляющих менее дифференцированные фенотипы, например, $T_{n/scm}$ -CD45RA+CCR7+ и T_{cm} -CD45RO+CCR7+, уменьшается зависимым от времени экспансии образом, т.е. день 4 > день 7 > день 10. Наоборот, количество CD8+ Т-клеток, проявляющих более дифференцированные фенотипы, например, T_{em} -CD45RO+CCR7- и T_{eff} -CD45RA+CCR7-, возрастает зависимым от времени экспансии образом, т.е. день 4 < день 7 < день 10, что свидетельствует о большем количестве менее дифференцированных фенотипов экспансированных клеток в день 4, чем для экспансированных клеток в день 7 и день 10. Эти результаты указывают на то, что, чем короче продолжительность экспансии Т-клеток, тем больше Т-клеток памяти характеризуется менее дифференцированными фенотипами, таким образом, обеспечивая более высокую терапевтическую эффективность.

При первоначальном ответе CD8⁺ Т-клеток может потребоваться костимуляция CD27 и CD28. Такая костимуляция может обеспечить стимулирование пролиферации и выживаемости наивных CD8⁺ Т-клеток. Для оценки костимуляторного потенциала в отношении CD27 и CD28 со стороны Т-клеточных продуктов, собранных в разное время в процессе производства, CD8⁺ Т-клетки, полученные от 3 доноров (донор 1, донор 2 и донор 3), были собраны в день 4, день 7 и день 10 процесса производства, с последующим анализом уровня экспрессии CD27 и CD28.

Фиг. 34 показывает, что количество CD8⁺ Т-клеток, проявляющих CD27⁺CD28⁺ костимулирующие фенотипы, уменьшается зависимым от времени экспансии образом, т.е. день 4 > день 7 > день 10, что свидетельствует о большем костимулирующем эффекте в отношении CD27 и CD28 со стороны экспансированных клеток в день 4, чем для экспансированных клеток в день 7 и день 10. Эти результаты указывают на то, что, как правило, чем меньше времени предоставлено Т-клеткам для экспансии, тем больше Т-клеток экспрессируют как CD27, так и CD28.

Для оценки репликативного потенциала Т-клеточных продуктов, собранных в разное время в процессе производства, Т-клетки собирали в дни 4, 7 и 10 производства и отслеживали их рост в ответ на действие соответствующих цитокинов, например, ИЛ-7, ИЛ-15 или ИЛ-2, в анализе чувствительности к цитокинам.

Фиг. 35 показывает, что рост числа CD8⁺ Т-клеток, индуцированный ИЛ-7, ИЛ-15 или ИЛ-2, уменьшается зависимым от времени экспансии образом, т.е. день 4 > день 7 > день 10, что свидетельствует о большем репликативном потенциале экспансированных клеток в день 4, чем для экспансированных клеток в день 7 и день 10. Эти результаты указывают на то, что чем меньше времени предоставлено Т-клеткам для экспансии, тем выше пролиферативный ответ Т-клеток на цитокины.

Для оценки противоопухолевой активности Т-клеточных продуктов, собранных в разное время в процессе производства, Т-клеточные продукты, полученные от 4 доноров (донор 1, донор 2, донор 3 и донор 4), были собраны в дни 5, 7 и 9 производственного цикла с последующим анализом высвобождения интерферона-гамма (ИФН-гамма) в ответ на воздействие целевой положительной клеточной линии.

Фиг. 36 показывает, что секреция ИФН-гамма уменьшается зависимым от времени экспансии образом, т.е. день 5 > день 7 > день 9, свидетельствуя, в общем, о большей противоопухолевой активности экспансированных клеток в день 5, чем для экспансированных клеток в день 7 и день 9. Эти результаты указывают на то, что, как правило, чем меньше времени предоставлено Т-клеткам для экспансии, тем больше Т-клеток секретируют ИФН-гамма.

Для дополнительной оценки цитотоксической активности Т-клеточных продуктов, собранных в разное время в процессе производства, было определено значение EC₅₀ на основе ответа в виде ИФН-гамма на Т2-клетки, нагруженные уменьшающимися концентрациями родственного пептида.

Фиг. 37 показывает, что значение EC₅₀ увеличивается зависимым от времени экспансии образом, т.е. день 5 > день 7 > день 9, свидетельствуя о большей пептид-специфичной цитотоксической активности экспансированных клеток в день 5, чем для экспансированных клеток в день 7 и день 9.

Производство Т-клеточного продукта № 3 по правилам GMP.

Характеристики продуктов, произведенных по способу производства Т-клеточного продукта № 3.

Фиг. 38 показывает количественные показатели. В двух циклах производства с переносом технологии (ТТ) и двух циклах производства с целью квалификации способа производства (PQ) (n=4) в среднем было собрано $1,3 \times 10^{10}$ клеток с жизнеспособностью >90% после короткой экспансии, например, примерно в течение 6 дней.

Фиг. 39 демонстрирует поверхностную экспрессию ТКР Т-клеточным продуктом № 3, определенную методом проточной цитометрии при использовании ТКР-специфичного декстрамера HLA. Репрезентативный график результатов FACS и объединенные данные (среднее $\pm$ SD) показаны для циклов производства с переносом технологии (ТТ) и циклов производства с целью квалификации способа производства (PQ) (n=4), проведенных с использованием продуктов лейкофереза от здоровых доноров.

Фиг. 40 показывает результаты фенотипирования Т-клеток памяти конечного Т-клеточного продукта № 3, в котором Т-клетки, полученные в циклах производства с переносом технологии (ТТ1, ТТ2) и циклах производства с целью квалификации способа производства (PQ1, PQ2), сохраняют менее дифференцированный фенотип доноров, представляющих высоко вариабельный фенотип популяций Т-клеток в МКПК, использованные при производстве g (n=4) (T_{n/scm} - 17,9%, 19,2%, 11,2%, 35,0% T_{cm} - 23,4%, 15,7%, 0,9%, 2,4% T_{em} - 34,8%, 27,0%, 25,9%, 43% T_{eff} - 23,8%, 38,2%, 62,0%, 16,1% соответственно).

На фиг. 41 показано высвобождение ИФН-гамма в ответ на воздействие целевых положительных (LVR11KEA) и отрицательных (NT) клеточных линий. Т-клетки, полученные в циклах производства с переносом технологии (ТТ) и циклах производства с целью квалификации способа производства (PQ), проявляют специфическую цитотоксическую активность, например, высвобождение ИФН-гамма, в отношении целевых положительных клеток. Высвобождение ИФН-гамма не было обнаружено в отношении клеток отрицательного контроля.

Фиг. 42 демонстрирует результаты определения EC₅₀ на основе ответа ИФН-гамма на клетки-мишени, нагруженные уменьшающимися концентрациями родственного пептида. Результаты показыва-

ют, что Т-клетки, полученные в цикле производства с целью квалификации способа производства (PQ1), проявляют противоопухолевую активность ($EC_{50}=0,3149$), сравнимую с таковой, полученной для положительного контроля при анализе ($EC_{50}=0,7037$).

Фиг. 43 дает репрезентативное представление цитотоксического потенциала Т-клеточного продукта № 3 в количественной оценке гибели клеток с использованием Incucyte®. Данные представлены в виде кратности роста опухоли в присутствии Т-клеточного продукта № 3 в ходе 72-часового периода совместного культивирования с мишень-отрицательной клеточной линией, нагруженной уменьшающимися концентрациями соответствующего пептида. Результаты показывают зависимость от дозы пептида уничтожения клеток-мишеней Т-клетками, полученными в цикле производства с целью квалификации способа производства (PQ1).

Суммируя, меньшее время экспансии ex-vivo и общее "время производственного цикла" могут иметь существенное влияние не только на качество клеточного продукта, но и на применимость средств клеточной иммунотерапии в клинике. Усилия по сокращению продолжительности стадии экспансии при разработке способа производства Т-клеток с встроенными ТКР по правилам GMP завершили разработкой устойчивой, имеющей длительность 5-6 дней, полузакрытого способа производства Т-клеток для Т-клеточного продукта № 3. Циклы производства с переносом технологии (ТТ) и с целью квалификации способа производства (PQ) для производства Т-клеточного продукта № 3 в чистом помещении, соответствующем правилам GMP, подтвердили воспроизводимость и осуществимость способа производства с сокращенной продолжительностью стадии экспансии. Фенотип и испытания функциональности Т-клеток с встроенными ТКР при выпуске были подтверждены для Т-клеточных продуктов, произведенных по правилам GMP.

Пример 7.

Производство и функциональные характеристики Т-клеточных продуктов, полученных из материала пациентов, больных раком.

Как упоминалось выше, Т-клеточный продукт № 3, полученный из материала от здоровых доноров, обнаруживает фенотип Т-клеток памяти и цитотоксический потенциал. Как показано ниже, аналогичные характеристики наблюдались у Т-клеточного продукта № 3, полученного из материала пациентов, больных раком, если сравнивать их с характеристиками Т-клеточного продукта № 3, полученного из материала от здоровых доноров.

Характеристики пациента и донора.

Пациент (PT)/донор (D)	Основной диагноз	Возраст	Пол	Раса	Клиническая стадия	Статус заболевания/статус химиотерапии	Лекарственный препарат: примечания по препарату
PT1	Рак яичника	78	Жен.	W	IV	Стабилизация/активное лечение	Цисплатин/гемзар
PT2	Рак яичника	69	Жен.	W	III-C	Стабилизация/активное лечение	Доксил
PT3	Рак яичника	73	Жен.	W	III-B	Стабилизация/активное лечение	Карбоплатин/гемзар
PT4	Рак эндометрия	72	Жен.	AI	III-A	Неизвестен/предварительно лечение	Таксол/карбоплатин
D1	Норма	69	Муж.	W	н/п	Неизвестен	н/п
D2	Норма	70	Муж.	W	н/п	Неизвестен	н/п
D3	Норма	62	Муж.	W	н/п	Неизвестен	н/п
D4	Нормальные ткани	52	Жен.	H	н/п	Неизвестен	н/п

W = белый; AI = американский индеец; H = латиноамериканец.

Т-клеточный продукт № 3 производился в малом масштабе с использованием МКПК, полученных от больных раком пациентов и здоровых доноров. Вкратце, в день 0 криоконсервированные МКПК, выделенные из продуктов лейкофереза у 4 больных раком пациентов и 4 здоровых доноров, размораживали и переводили в стадию покоя в присутствии ИЛ-7 примерно на 4-6 часов с последующей активацией в 24-луночных планшетах NTC и инкубацией в течение примерно 16-24 часов. В день 1 клетки трансдуцировали вирусным вектором, экспрессирующим рекомбинантный ТКР, например, ТКР R11KEA, при $5 \text{ мкл}/10^6$ клеток. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контролей. Трансдуцированные и нетрансдуцированные клетки высевали с плотностью не менее $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, например, $2,0 \times 10^6$ клеток/мл. В день 2 трансдуцированные и нетрансдуцированные клетки экспандировали в полной среде ТехMACS и ИЛ-7 и ИЛ-15. В день 6, т.е. при экспансии в течение 4 дней, экспандированные клетки собирали с последующим анализом методом проточной цитометрии и анализов функциональности для определения, например, восстановления, жизнеспособности, фенотипов, числа интегрированных копий ДНК и функциональности.

Фиг. 44 показывает сопоставимые значения восстановления Т-клеток, полученных от больных раком пациентов (Pt) и здоровых доноров (HD) после размораживания, после стадии покоя и после активации.

Фиг. 45 демонстрирует сопоставимость общего числа жизнеспособных клеток и % жизнеспособных клеток в Т-клеточном продукте № 3 в день 6, т.е. при экспансии в течение 4 дней, в трансдуцированных и нетрансдуцированных клетках для каждого индивида, за исключением PT1 и PT4, для которых все клетки были трансдуцированы.

Фиг. 46 демонстрирует сопоставимость кратности экспансии клеток в Т-клеточном продукте № 3 в день 6, т.е. при экспансии в течение 4 дней, в трансдуцированных и нетрансдуцированных клетках для каждого индивида, за исключением PT1 и PT4, для которых все клетки были трансдуцированы.

Анализ фенотипа.

Фиг. 47 показывает преобладающую экспансию CD3+CD8+ клеток (показаны стрелками), по сравнению с экспансией CD3+CD4+ клеток, в МКПК, полученных от больных раком пациентов (PT1-PT4) и здоровых доноров (D1-D4).

Фиг. 48 показывает сопоставимые общие средние значения CD3+CD8+ клеток и CD3+CD4+ клеток в Т-клеточном продукте № 3 и нетрансдуцированных клеток (NT), полученных от больных раком пациентов (PT1-PT4) и здоровых доноров (D1-D4).

Фиг. 49 показывает пример результатов цитометрического анализа Т-клеточного продукта № 3. Результаты показывают, что 43,8% клеток Т-клеточного продукта № 3 являются CD3+CD8+ клетками, среди которых 64,7% экспрессируют ТКР R11KEA, на что указывают данные окрашивания декстрамерами, нагруженными комплексом пептид/МНС (Dex), и 35,3% клеток не экспрессируют ТКР R11KEA.

Фиг. 50 показывает сопоставимую экспрессию ТКР R11KEA в CD8+ Т-клеточном продукте № 3, полученном от больных раком пациентов (PT1-PT4) и здоровых доноров (D1-D4).

Фиг. 51 также показывает сопоставимую экспрессию ТКР R11KEA в CD8+ Т-клеточном продукте № 3, полученном от больных раком пациентов (PT1-PT4) (например, 64,3%) и здоровых доноров (D1-D4) (например, 68,2%).

Фиг. 52 показывает схему гейтирования для определения фенотипа Т-клеток памяти (T_{memory}) Т-клеточного продукта № 3. Например, гейтированием по CD45RA и CCR7 могут быть идентифицированы наивные "молодые" Т-клетки (CD45RA+CCR7+), терминально дифференцированные "старые" Т-клетки (T_{emRA}) (CD45RA+CCR7-), эффекторные Т-клетки памяти (T_{em}) (CD45RA-CCR7-) и центральные Т-клетки памяти (T_{cm}) (CD45RA-CCR7+).

Фиг. 53 показывает заметное увеличение среднего содержания обеих желательных популяций наивных и T_{cm} клеток Т-клеточного продукта № 3, полученного как от пациентов (PT1-PT4), так и от здоровых доноров (D1-D4). Эти результаты указывают на то, что трансдуцированные клетки могут обладать большей способностью к персистированию после инфузии и вызывать более длительные ответы *in vivo*.

Анализ функциональности.

Для определения функциональности Т-клеточного продукта № 3 клетки могут быть стимулированы соответствующим пептидом (например, при 1 мкг/мл), который специфически связывает ТКР R11KEA, или нерелевантным пептидом (например, при 1 мкг/мл), который не связывает специфически ТКР R11KEA, в качестве контроля. Стимуляция РМА или иономицином, которые активируют все лимфоциты, служит положительным контролем, а отсутствие стимуляции служит отрицательным контролем. После 2 часов стимуляции добавляли ингибиторы транспорта белков. Через 6 часов после стимуляции при помощи внутриклеточного окрашивания (ICS) оценивали экспрессию цитокинов и сигнальных молекул, например, CD107a, ИФН-гамма, TNF-альфа, ИЛ-2, и макрофагального воспалительного белка-1-бета (MIP-1 β) в CD3+CD8+ клетках.

На фиг. 54 показан пример Т-клеточного продукта № 3 после стимуляции соответствующим пептидом (d), уровни экспрессии CD107a, ИФН-гамма, TNF-альфа, ИЛ-2 и MIP-1 β в Т-клеточном продукте № 3 возрастают в сравнении с их уровнями при стимуляции нерелевантным пептидом (c). Стимуляция РМА

или иономицином, которые активируют все лимфоциты, служит положительным контролем (b), а отсутствие стимуляции служит отрицательным контролем (a).

Фиг. 55 демонстрирует полифункциональность Т-клеточного продукта № 3. Цифры 0, 1, 2, 3, 4 и 5 обозначают, соответственно, части Т-клеточного продукта № 3, не экспрессирующие ни одного, экспрессирующие любой один, любые два, любые три, любые четыре и все пять из CD107a, ИФН-гамма, TNF-альфа, ИЛ-2 и MIP-1 β . Например, после стимуляции соответствующим пептидом более чем 50% полученного от здорового донора (D3) Т-клеточного продукта № 3, транедуцированного ТКР R11KEA (R11), экспрессирует по меньшей мере 2 цитокина из CD107a, ИФН-гамма, TNF-альфа, ИЛ-2 и MIP-1 β , в сравнении с продуктом, стимулированным нерелевантным пептидом, т.е. 0% клеток экспрессирует по меньшей мере 2 цитокина. В отличие от этого, не наблюдалось значимой разницы в экспрессии цитокинов в нетрансдуцированных (NT) клетках между стимуляциями соответствующим пептидом и нерелевантным пептидом. Эти результаты показывают, что Т-клеточный продукт № 3, полученный из материала от здоровых доноров и трансдуцированный ТКР R11KEA, является полифункциональным. Положительные контроли, т.е. Т-клетки, стимулированные РМА/иономицином, обнаруживают полифункциональность как с трансдукцией ТКР, так и без нее. Отрицательные контроли, т.е. Т-клетки без стимуляции, обнаруживают слабую функциональность как с трансдукцией ТКР, так и без нее.

Фиг. 56 показывает, после стимуляции соответствующим пептидом, полифункциональность ТКР R11KEA+ (CD8+Vb8+) Т-клеточного продукта № 3, полученного из материала от здоровых доноров, например, D3 и D2, и от больных раком пациентов, например, PT1, PT2 и PT3. Т-клетки, полученные от D1, D4 и PT4, не проявили полифункциональности, исходя из результатов этих исследований функциональности. Как показано ниже, Т-клетки, полученные от D1, D4 и PT4, тем не менее, всё же проявляют цитотоксическую активность по отношению к клеткам-мишеням.

Фиг. 57 показывает высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточного продукта № 3, полученного от больных раком пациентов, например, PT1-PT4, если эти клетки находятся в контакте с клеточной линией с высоким числом мишеней на клетку, имеющей примерно 1000 копий/клетку соответствующего пептида, представленного на клеточной поверхности, зависимым от соотношения Е:Т образом, например, 10:1 > 3,3:1 > 1:1. Следует отметить, что Т-клетки, полученные от PT4, которые не выглядят полифункциональными, судя по фиг. 56, также обнаруживают высвобождение ИФН-гамма зависимым от соотношения Е:Т образом.

Фиг. 58 показывает высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточного продукта № 3, полученного от здоровых доноров, например, D1-D4, если эти клетки находятся в контакте с клеточной линией со значительным числом мишеней на клетку, имеющей примерно 1000 копий/клетку соответствующего пептида, представленного на клеточной поверхности, зависимым от соотношения Е:Т образом, например, 10:1 > 3,3:1 > 1:1. Следует отметить, что Т-клетки, полученные от D1 и D4, которые не выглядят полифункциональными, судя по фиг. 56, также обнаруживают высвобождение ИФН-гамма зависимым от соотношения Е:Т образом.

Фиг. 59 показывает, что среднее высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточного продукта № 3, полученного от здоровых доноров, например, D1-D4, если эти клетки находятся в контакте с клетками с различными уровнями соответствующего пептида, представленного на клеточной поверхности, например, клеточной с высоким числом мишеней на клетку, имеющей примерно 1000 копий/клетку соответствующего пептида, представленного на клеточной поверхности, клеточной линией с низким числом мишеней на клетку, имеющей примерно 50 копий/клетку соответствующего пептида, представленного на клеточной поверхности, и линией клеток с отсутствием мишеней, не имеющей соответствующего пептида, представленного на клеточной поверхности, происходит зависимым от уровня презентации пептида образом, т.е. высокое число мишеней > низкое число мишеней > отсутствие мишеней.

Фиг. 60 показывает, аналогично, что среднее высвобождение ИФН-гамма из Т-клеточного продукта № 3, полученного от больных раком пациентов (PT1-PT4), если эти клетки находятся в контакте с клеточной линией с высоким числом мишеней на клетку, клеточной линией с низким числом мишеней на клетку и линией клеток с отсутствием мишеней, происходит зависимым от уровня презентации пептида образом, т.е. высокое число мишеней > низкое число мишеней > отсутствие мишеней.

Фиг. 61 показывает отсутствие активности в отношении уничтожения клеток у Т-клеточного продукта № 3, полученного от здорового донора, например, D3, при контакте с мишень-отрицательной клеточной линией, в которой соответствующий пептид не представлен на клеточной поверхности. Вкратце, Т-клетки, полученные от D3, трансдуцированные ТКР R11KEA (R11) или без трансдукции (NT), совместно культивировали с мишень-отрицательной клеточной линией при соотношении Е:Т 10:1, 3,3:1 и 1:1. Активность в отношении уничтожения клеток измеряли методом количественной оценки гибели клеток с использованием Incucyte®. Эти результаты не показывают значимой разницы в уничтожении клеток в отношении мишень-отрицательной клеточной линии между Т-клетками с трансдукцией ТКР (R11) и без нее (NT). В отличие от этого, фиг. 62 демонстрирует ТКР-специфическую активность в отношении уничтожения для Т-клеточного продукта № 3, полученного от здорового донора, например, D3, при контакте с мишень-положительной клеточной линией, у которой соответствующий пептид представлен на кле-

точной поверхности. То есть, Т-клетки, экспрессирующие ТКР R11KEA, уничтожают целевые положительные клетки зависимым от соотношения Е:Т образом, например, $10:1 > 3,3:1 > 1:1$. В отличие от этого, не наблюдается значимой разницы в уничтожении клеток между Т-клетками без трансдукции (NT) при различных соотношениях Е:Т.

На фиг. 63А-63С демонстрирует ТКР-специфическую активность в отношении уничтожения для Т-клеточного продукта № 3, трансдуцированного ТКР R11KEA (R11), полученного от здоровых доноров, например, D3 и D4, и от больных раком пациентов, например, PT1 и PT2, при контакте с положительной по мишеням клеточной линией, у которой соответствующий пептид представлен на клеточной поверхности. Т-клетки, экспрессирующие ТКР R11KEA (R11), полученные от D3, D4, PT1 и PT2, уничтожают положительные по мишеням клетки зависимым от соотношения Е:Т образом, например, $10:1$ (фиг. 63А) $> 3,3:1$ (фиг. 63А) $> 1:1$ (фиг. 63С). В отличие от этого, не наблюдается значимой разницы в уничтожении клеток между Т-клетками без трансдукции ТКР R11KEA (NT) при различных соотношениях Е:Т.

Подводя итог, эти результаты показывают, что способ получения Т-клеточного продукта № 3 может производить Т-клеточные продукты, экспрессирующие трансген ТКР с целевой специфичностью. Этот способ работает также хорошо с исходным материалом, полученным от больных раком пациентов, как и с материалом от здоровых доноров. Способ производства Т-клеточного продукта № 3 занимает меньше времени, чем способ получения Т-клеточных продуктов № 1 и № 2, и всё же позволяет получить продукт с большим числом наивных Т-клеток и клеток Тсм. Т-клеточный продукт № 3 может быть полифункциональным и секретировать ИФН-гамма в ответ на линии мишень-положительных клеток. Т-клеточный продукт № 3 может также проявлять хорошую эффекторную функцию в количественной оценке гибели клеточных линий.

Преимущества настоящего раскрытия могут включать способы производства аутологичных Т-клеток, в которых продолжительность стадии покоя может быть сокращена, например, до 4-6 часов, время активации, например, до 16-20 часов, время трансдукции, например, до 24 часов, стадия экспансии, например, до 5-7 дней для производства Т-клеточных продуктов с встроенными ТКР для применения в клинике. Клинические параметры, влияющие на каждую стадию, могут систематически подвергаться оценке и могут быть оптимизированы до получения выхода продукта, превышающего 1 миллиардов молодых, реагирующих с опухолью Т-клеток с высокой способностью распознавать и эффективно уничтожать опухолевые клетки, которые экспрессируют мишень. Дополнительно к повышению качества Т-клеточных продуктов, эти процессы оптимизации могут также привести к снижению стоимости производства на 30%. Далее, способы производства аутологичных Т-клеток по данному изобретению могут быть масштабированы при использовании связанных с флаконом и/или связанных с мешком антител к CD3 и к CD28 для активации Т-клеток с целью достижения сравнимых уровней активации, возможности использования для трансдукции и уровней экспансии, и эти способы производства в увеличенном масштабе могут требовать меньше времени, чем способы с использованием антител, связанных с планшетом.

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

Следует понимать, что каждый из элементов, описываемых выше, или два или более совместно могут также найти полезное применение в других видах способов, отличающихся от описанного выше типа. Без дополнительного анализа предшествующее описание выявляет в такой полноте суть настоящего раскрытия, что другие лица могут, применяя актуальные знания, легко приспособить его для различных применений, не опуская характеристики, которые с точки зрения уровня техники, справедливо представляют собой неотъемлемые характеристики общих и специфических аспектов этого раскрытия сущности, заявленных в прилагающейся формуле изобретения. Вышеупомянутые варианты осуществления представлены исключительно как примеры; объем настоящего раскрытия ограничивают только следующие пункты формулы изобретения.

Перечень последовательностей

<110> ИММАТИКС ЮЭс, ИНК.
 <120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ Т-КЛЕТОК
 <130> 3000011-006977
 <150> US62/726,350
 <151> 2018-09-03
 <150> US62/647,571
 <151> 2018-03-23
 <150> US62/633,113
 <151> 2018-02-21
 <150> US62/628,521
 <151> 2018-02-09
 <150> DE10 2018 108 996.1
 <151> 2018-04-16
 <150> DE10 2018 102 971.3
 <151> 2018-02-09
 <150> DE10 2018 104 628.6
 <151> 2018-02-28
 <160> 157
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 His Leu Met Asp Gln Pro Leu Ser Val
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Gly Leu Leu Lys Lys Ile Asn Ser Val
 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Val Asp Gly Ser Ser Ala Leu
1 5

<210> 5

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 5

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val
1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Leu Tyr Lys Ile Ile Asp Glu Leu
1 5

<210> 7

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 7

Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu
1 5 10

<210> 8

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Val Asp Asp Leu Thr Ile Asn Leu
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 11

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr Leu Asp Gly Ala Ala Val Asn Gln Val
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile
1 5 10

<210> 14
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 15

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
1 5

<210> 17
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val
 1 5 10

<210> 20
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
 1 5

<210> 22
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 25

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
1 5

<210> 27

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 27

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu
1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
 1 5

<210> 33
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val
 1 5 10

<210> 34
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu
 1 5

<210> 35
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile
 1 5 10

<210> 36

<211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu
 1 5

<210> 41
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val
 1 5

<210> 42
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val
 1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu
 1 5

<210> 44

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 44

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu
 1 5

<210> 45

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 45

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu
 1 5

<210> 46

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 46

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu
 1 5

<210> 47

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val
 1 5

<210> 48

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu
 1 5 10

<210> 49
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu
 1 5

<210> 54
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 55
 <211> 9

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 55

Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 57

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu
1 5

<210> 58
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 58

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr
1 5 10

<210> 59
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 59

Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 61

Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val
1 5

<210> 62
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 62

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val
1 5 10

<210> 63
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 63

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 64

Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu
1 5 10

<210> 65
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 65

Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
1 5 10

<210> 66
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 66

Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val
1 5 10

<210> 67
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu
1 5

<210> 68
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu
 1 5

<210> 69
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu
 1 5 10

<210> 70
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 70

His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val
 1 5 10

<210> 71
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu
 1 5

<210> 73
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val
 1 5

<210> 74
 <211> 10
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val
1 5 10

<210> 75

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 75

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 76

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 76

Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val
1 5

<210> 77

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val
1 5

<210> 78

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 78

Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val
1 5

<210> 79

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val
1 5 10

<210> 80

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 80

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu
1 5

<210> 81
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 81

Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 82

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val
1 5

<210> 83
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val
1 5 10

<210> 84
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 85

Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu
1 5

<210> 86
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 86

Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 87
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu
 1 5

<210> 88
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 88

Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val
 1 5 10

<210> 89
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 89

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val
 1 5 10

<210> 90
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val
 1 5 10

<210> 91
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala
 1 5

<210> 92
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 93

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 94

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val
1 5

<210> 95

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 95

Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val
1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 97

Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile
1 5

<210> 98

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 98

Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu
1 5

<210> 99

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 99

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu

1 5 10

<210> 100
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 100

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu
 1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 101

Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val
 1 5

<210> 102
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 102

Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro
 1 5 10

<210> 103
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 103

Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu
 1 5

<210> 104
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 104

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu
 1 5

<210> 105
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 105

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val
 1 5

<210> 106

<211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 106

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val
 1 5 10

<210> 107
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val
 1 5

<210> 108
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 108

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val
 1 5

<210> 109
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 109

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu
 1 5 10

<210> 110
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 110

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val
 1 5 10

<210> 111
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 111

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile
 1 5

<210> 112
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 112

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu
 1 5

<210> 113

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 113

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val
 1 5

<210> 114

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 114

Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile
 1 5

<210> 115

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 115

Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val
 1 5

<210> 116

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 116

Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu
 1 5 10

<210> 117

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 117

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu
 1 5 10

<210> 118

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 118

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val
 1 5

<210> 119
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 119

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile
 1 5

<210> 120
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 120

Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu
 1 5

<210> 121
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 121

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu
 1 5

<210> 122
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val
 1 5 10

<210> 123
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 123

Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala
 1 5 10

<210> 124
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 124

Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu
 1 5 10

<210> 125
 <211> 12

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 125

Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro
1 5 10

<210> 126
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 126

Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 127

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 128

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu
1 5

<210> 129
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 129

Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 130

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 131

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

<210> 132
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 132

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile
1 5 10

<210> 133
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 133

Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu
1 5 10

<210> 134
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 134

Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 135

Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile
1 5

<210> 136
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 136

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val
1 5 10

<210> 137
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 137

Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val
1 5

<210> 138
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 138

Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val
 1 5

<210> 139
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 139

Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu
 1 5 10

<210> 140
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 140

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 141

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
 1 5

<210> 142
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 142

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile
 1 5 10

<210> 143
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 143

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val
 1 5

<210> 144
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 144

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu
1 5

<210> 145

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 145

His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 146

Ser Met Asn Gly Gly Val Phe Ala Val
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 147

Met Leu Ala Glu Lys Leu Leu Gln Ala
1 5

<210> 148

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 148

Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val
1 5

<210> 149

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 149

Ala Leu Trp Leu Pro Thr Asp Ser Ala Thr Val
1 5 10

<210> 150

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 150

Gly Leu Ala Ser Arg Ile Leu Asp Ala
1 5

<210> 151
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 151

Ser Tyr Val Lys Val Leu His His Leu
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 152

Val Tyr Leu Pro Lys Ile Pro Ser Trp
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 153

Asn Tyr Glu Asp His Phe Pro Leu Leu
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 154

Val Tyr Ile Ala Glu Leu Glu Lys Ile
1 5

<210> 155
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 155

Val His Phe Glu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Leu Phe
1 5 10

<210> 156
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 156

Val Leu Ser Pro Phe Ile Leu Thr Leu
1 5

<210> 157
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

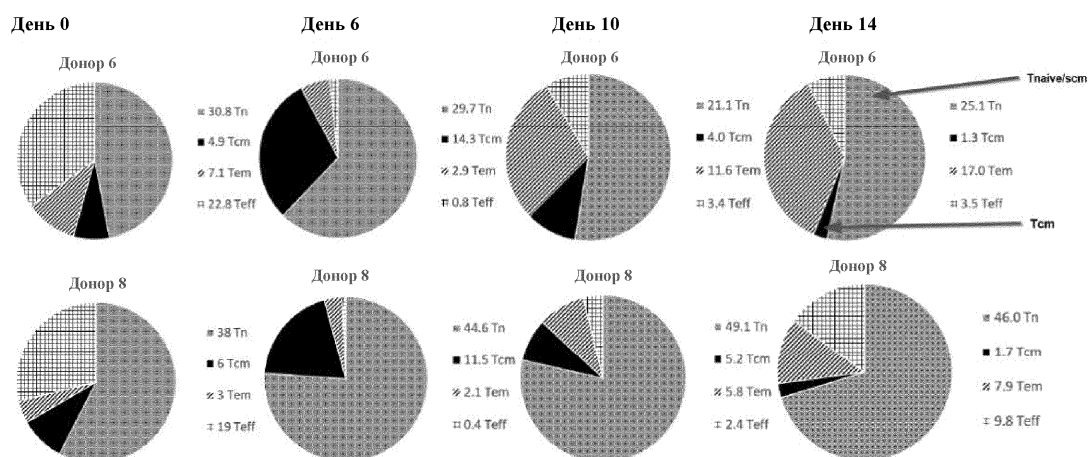
<400> 157

His Leu Leu Glu Gly Ser Val Gly Val
 1 5

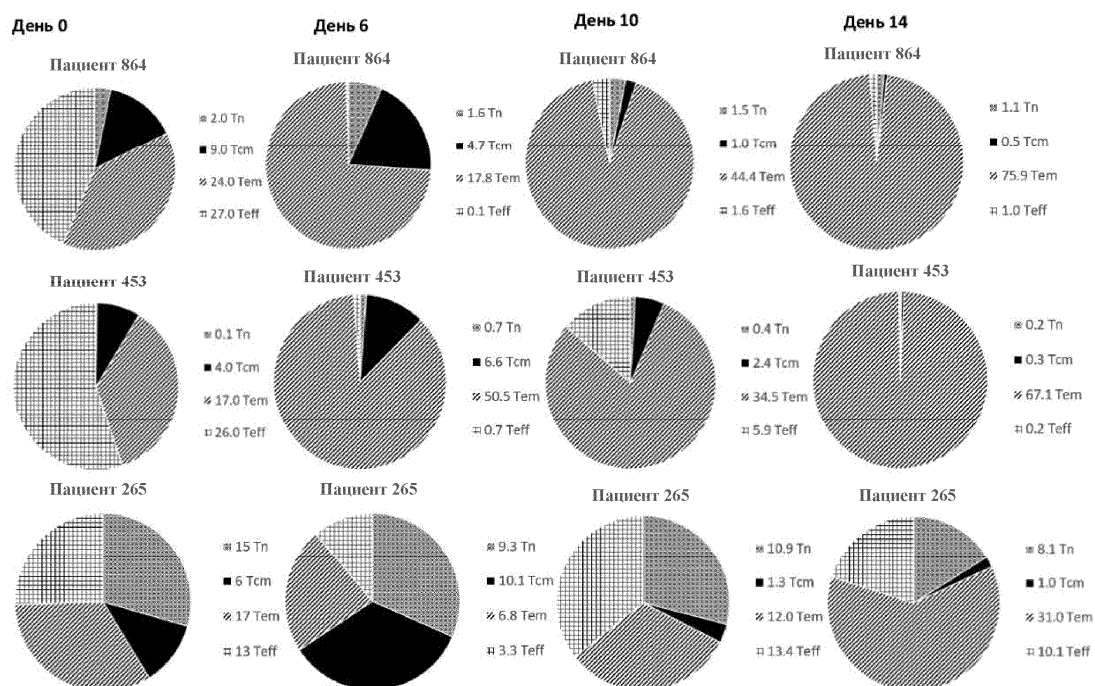
2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ трансдукции Т-клеток, включающий размораживание замороженных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), нахождение в стадии покоя размороженных МКПК в течение от 4 до 6 часов, активацию Т-клеток в МКПК, находящихся в стадии покоя, при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28, трансдукцию активированных Т-клеток вирусным вектором, при этом вирусный вектор является ретровирусным вектором, экспрессирующим Т-клеточный рецептор (ТКР), увеличение трансдуцированных Т-клеток в присутствии интерлейкина 7 (ИЛ-7) и интерлейкина 15 (ИЛ-15), и получение экспансированных Т-клеток.
2. Способ по п.1, в котором стадия активации включает иммобилизацию Т-клеток в МКПК, находящихся в стадии покоя, при помощи антитела к CD3 и антитела к CD28 на твердофазной подложке.
3. Способ по п.1, в котором кратность экспансии полученных Т-клеток с продолжительностью стадии покоя от примерно 4 часов до примерно 6 часов по меньшей мере примерно в 1,5 раза выше, чем кратность экспансии полученных Т-клеток, произведенных в идентичных условиях с продолжительностью стадии покоя от примерно 16 до примерно 20 часов.
4. Способ по любому из пп.1-3, в котором концентрация ИЛ-7 при экспансии составляет от примерно 1 нг/мл до 100 нг/мл, и концентрация ИЛ-15 при экспансии составляет примерно от 5 нг/мл до 500 нг/мл.
5. Способ по любому из пп.1-4, в котором стадия покоя проводится в присутствии по меньшей мере одного цитокина и, возможно, цитокин включает интерлейкин 7 (ИЛ-7) и/или интерлейкин 15 (ИЛ-15).
6. Способ по любому из пп.1-5, в котором активация проводится в течение периода времени от примерно 6 часов до примерно 72 часов.
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором трансдукция проводится в течение периода времени от примерно 1 часа до примерно 72 часов.
8. Способ по любому из пп.1-7, в котором трансдукция проводится в присутствии по меньшей мере одного цитокина.
9. Способ по любому из пп.1-8, в котором размораживание, пребывание в стадии покоя, активация, трансдукция, экспансия и получение проводятся в закрытой системе.
10. Способ по п.9, в котором закрытой системой является CliniMACS Prodigy™, биореактор WAVE (XURI™), биореактор WAVE (XURI™) в сочетании с BioSafe Sepax™ II, закрытая система G-Rex/GatheRex™ или закрытая система G-Rex/GatheRex™ в сочетании с BioSafe Sepax™ II.
11. Способ по любому из пп.1-10, в котором активация проводится в течение не более чем 1 дня.
12. Способ по любому из пп.1-11, в котором количество полученных экспансированных Т-клеток составляет по меньшей мере 1×10^9 клеток.
13. Способ по любому из пп.1-11, в котором количество экспансированных Т-клеток составляет по меньшей мере 1×10^{13} клеток.

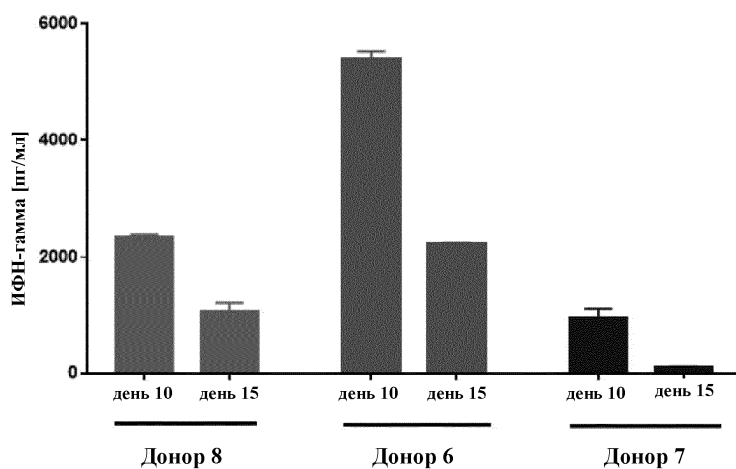


Фиг. 1А

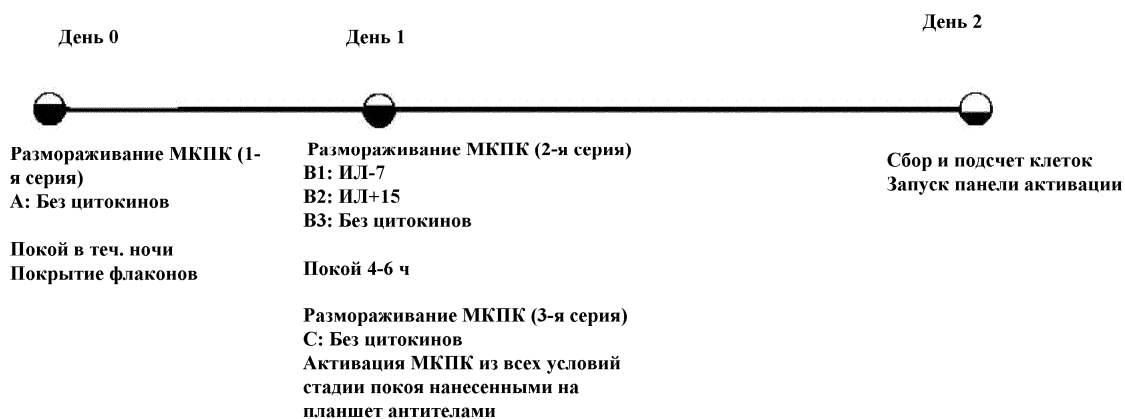


Фиг. 1В

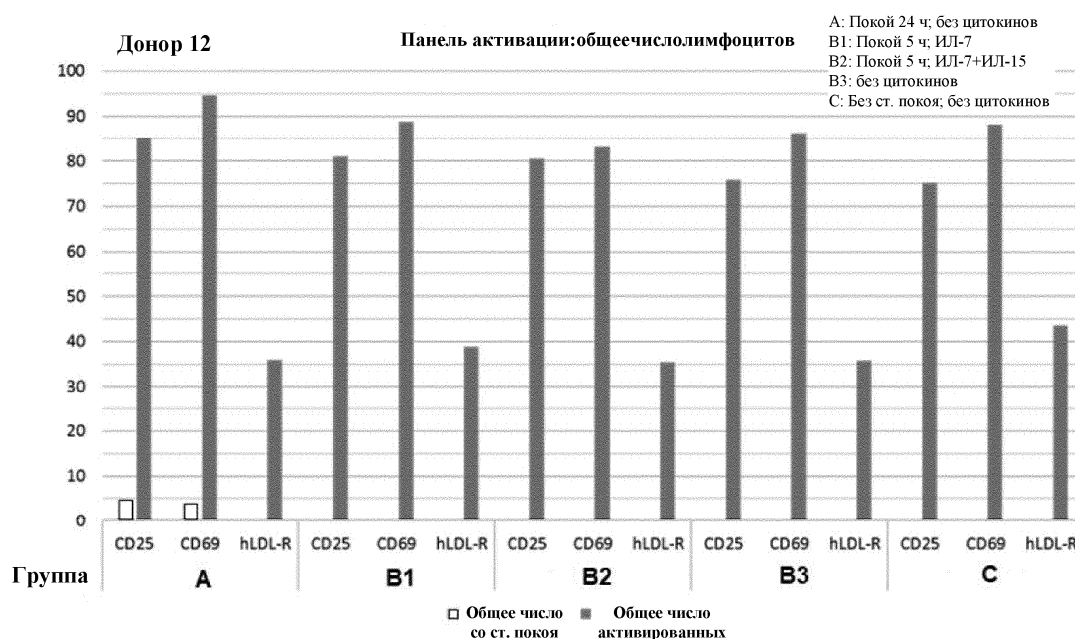
день 10 в сравнении с днем 15



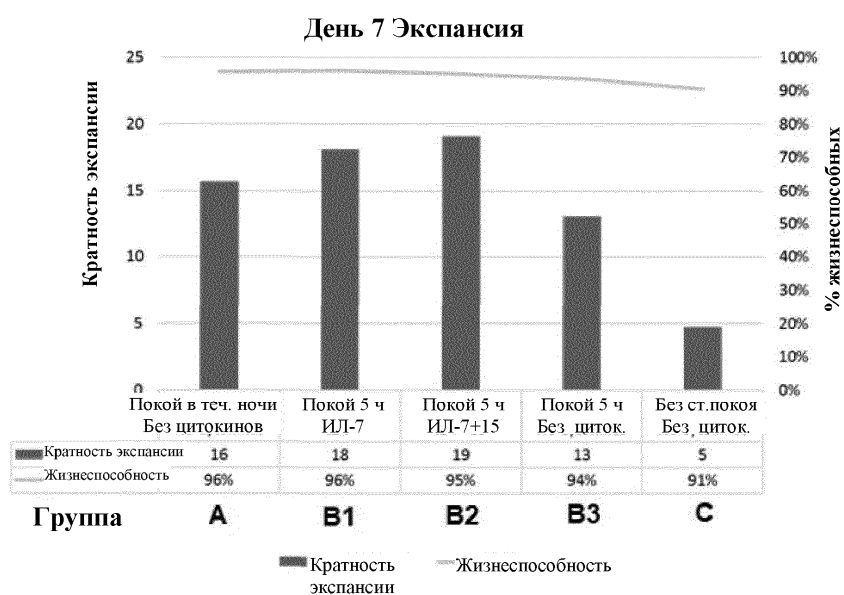
Фиг. 2



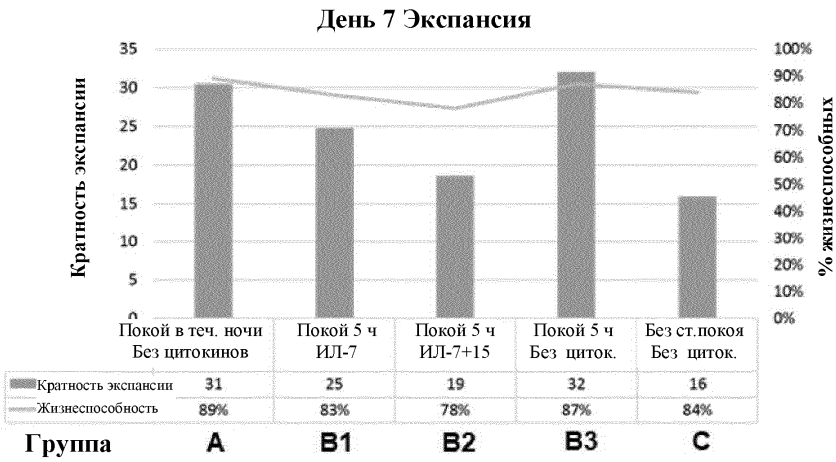
ФИГ. 3



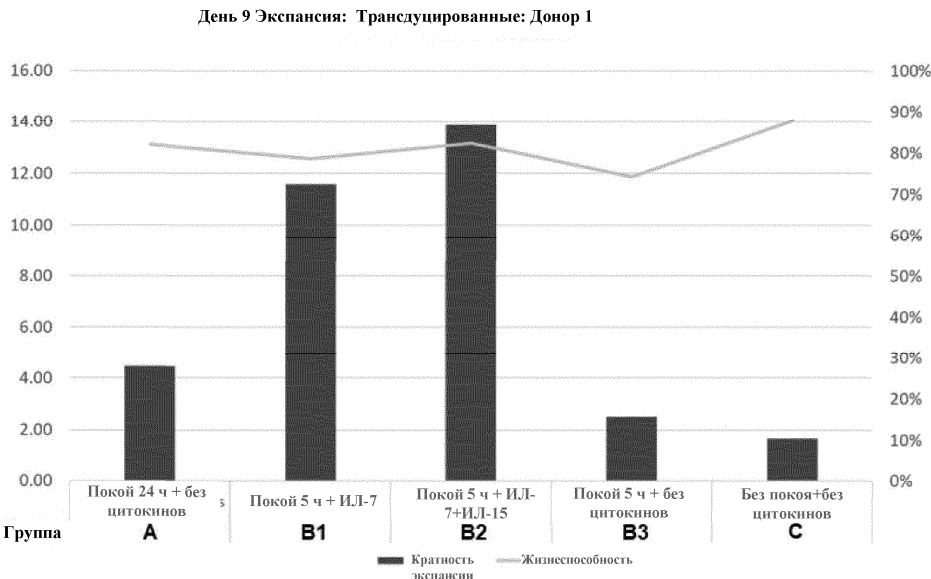
ФИГ. 4



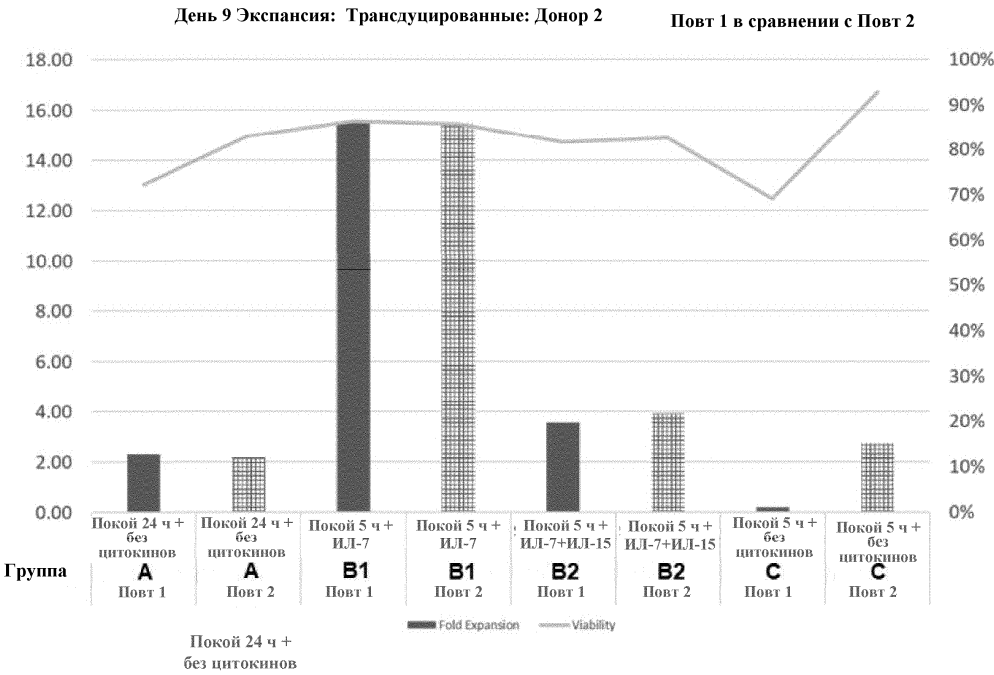
ФИГ. 5А



Фиг. 5B

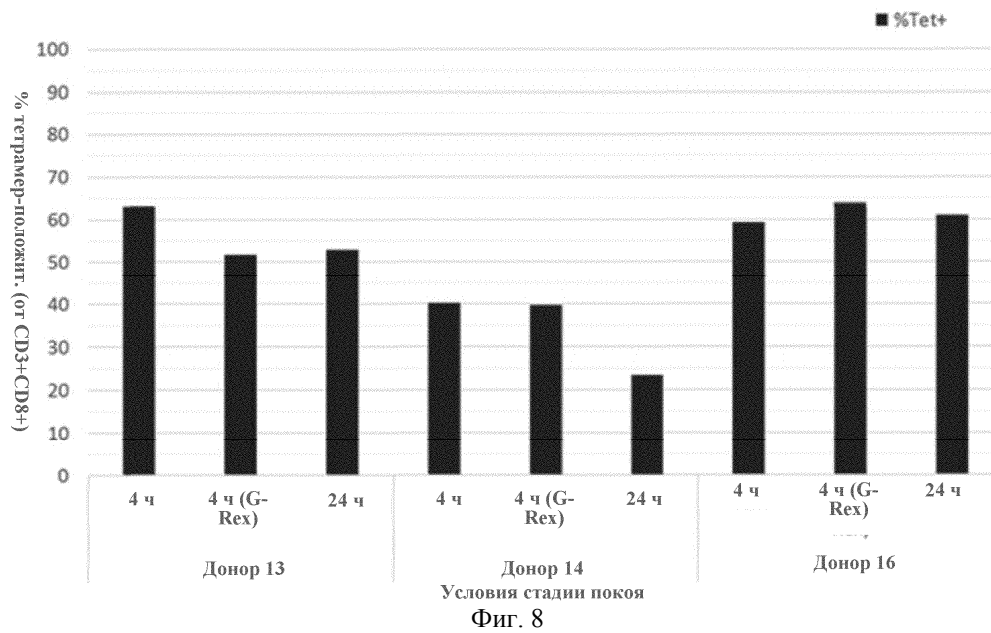


Фиг. 6

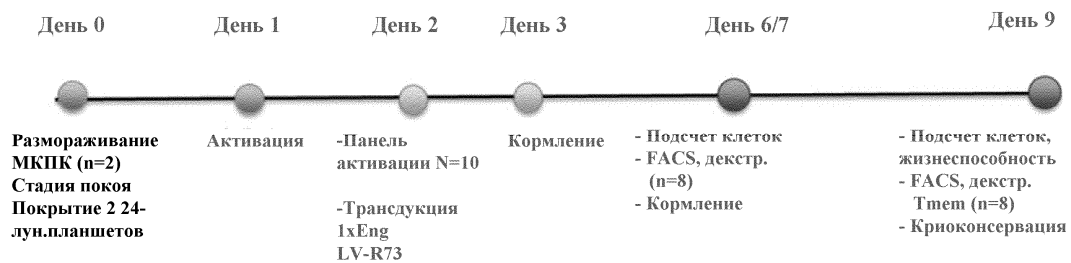
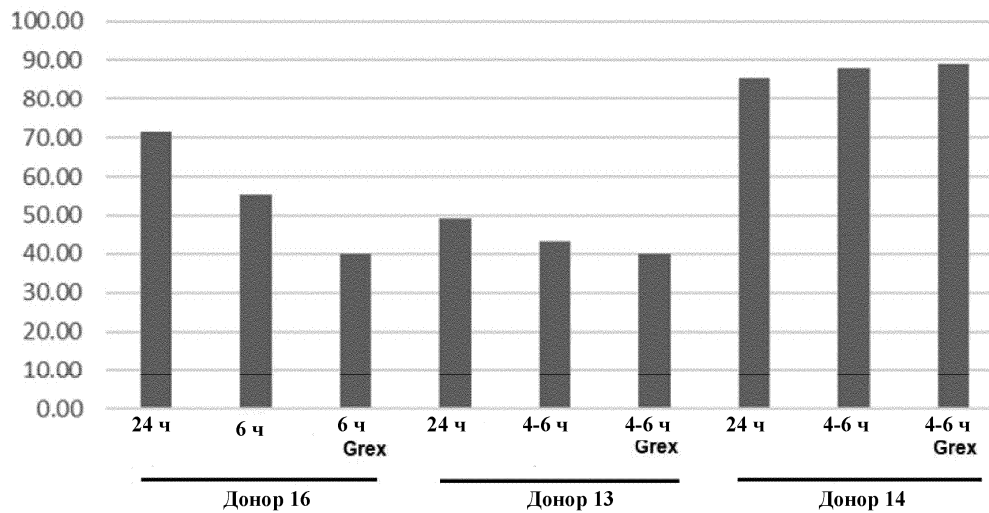


Фиг. 7

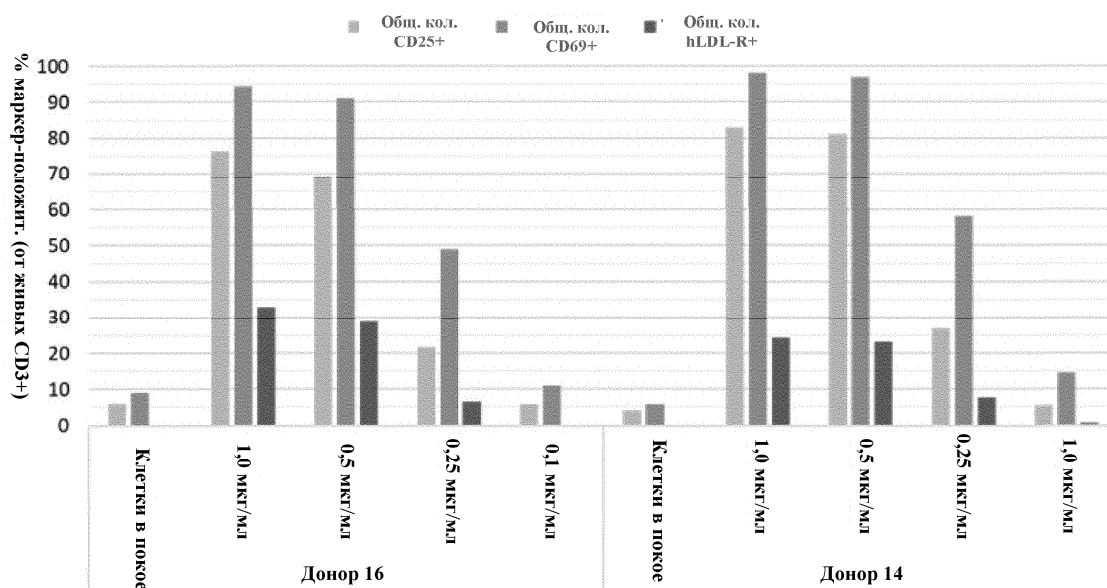
Высвобождение тетрамера (R37D)



День 10 – кратность экспансии

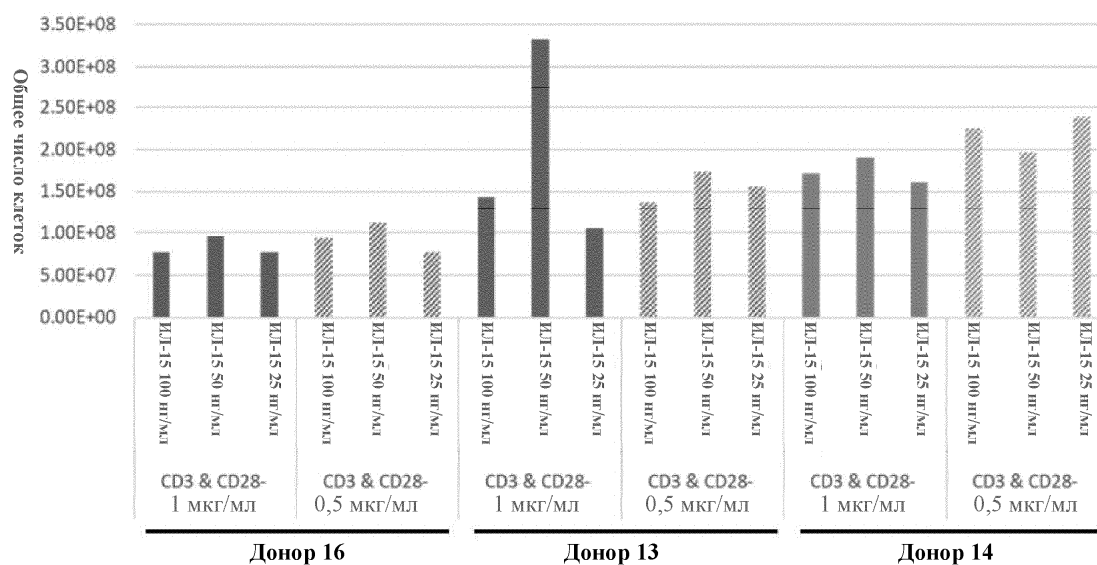


Панель активации, перед трансдукцией
% общ. кол. CD3+

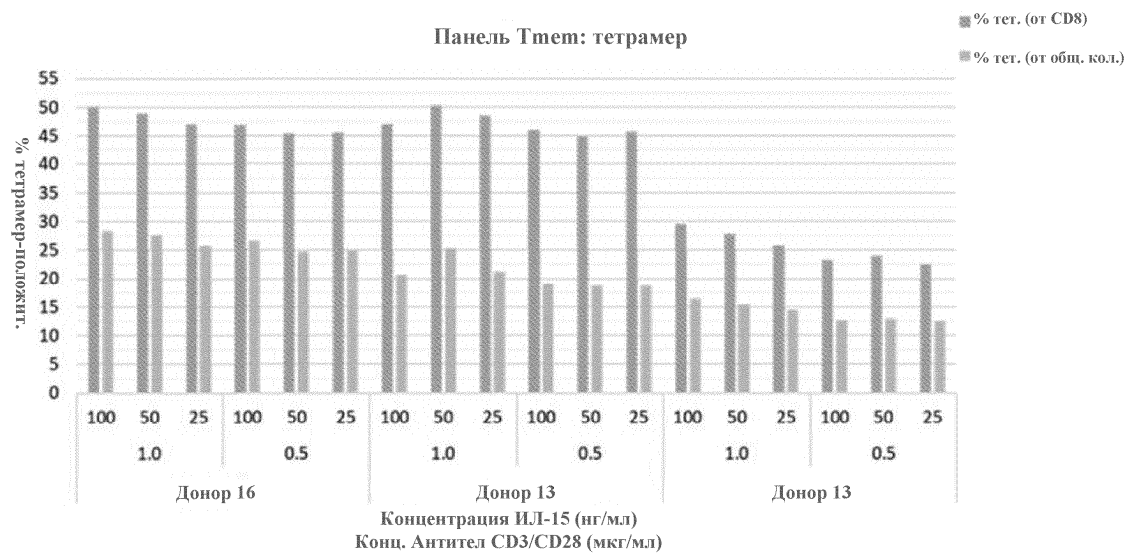


Фиг. 11

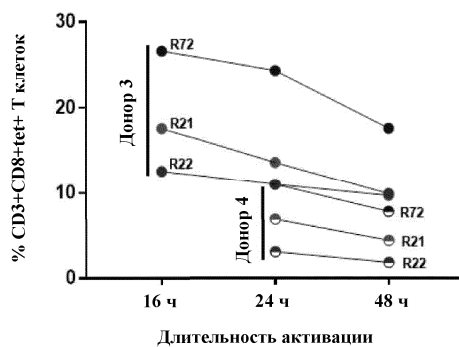
День 10 экспансия



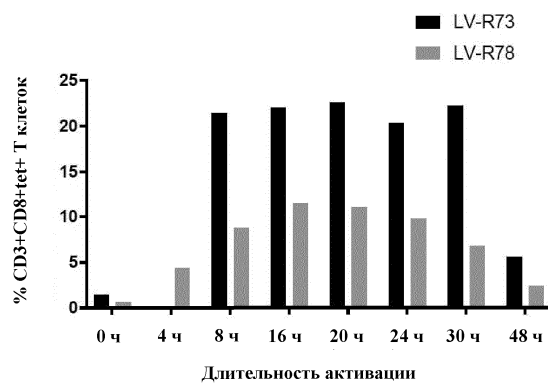
Фиг. 12



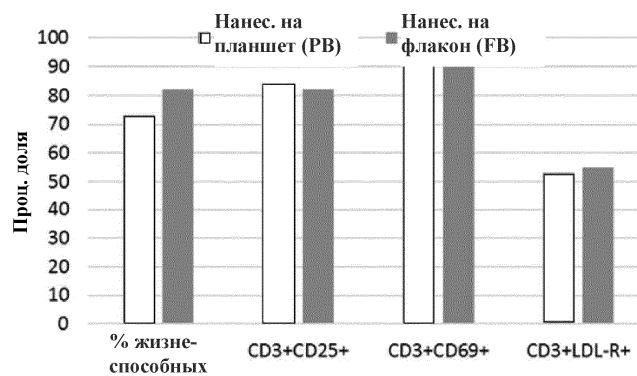
Фиг. 13



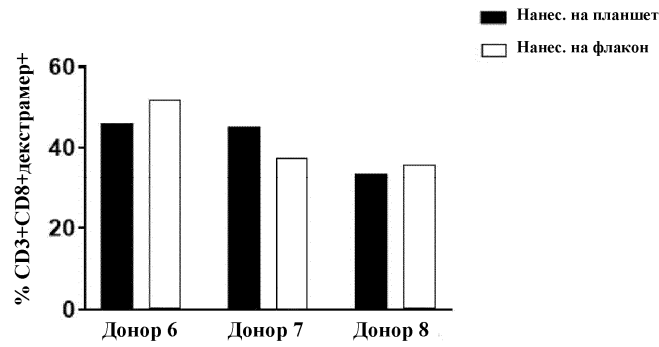
Фиг. 14А



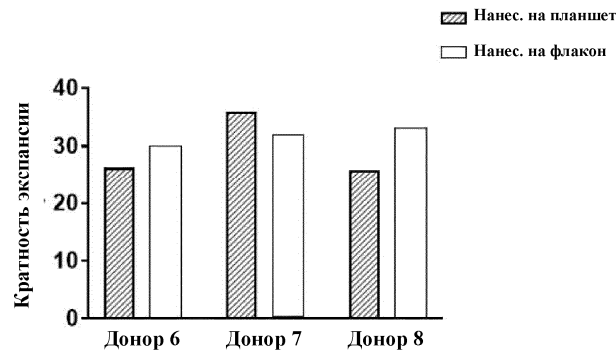
Фиг. 14В



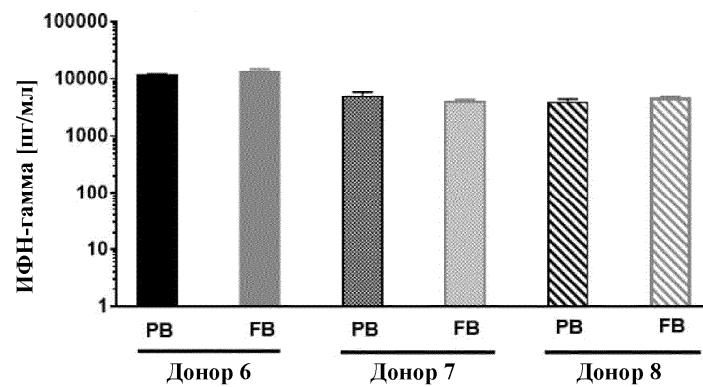
Фиг. 15



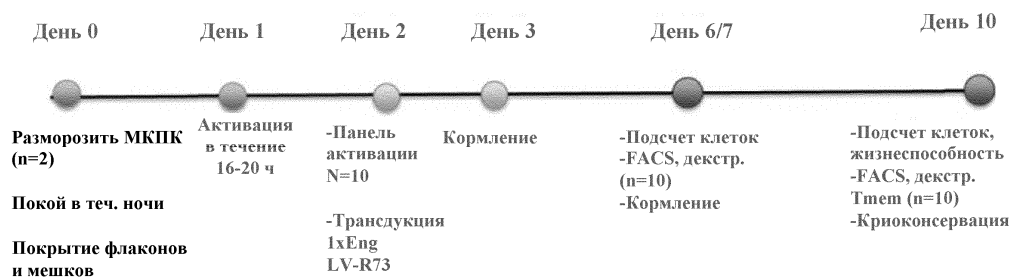
Фиг. 16А



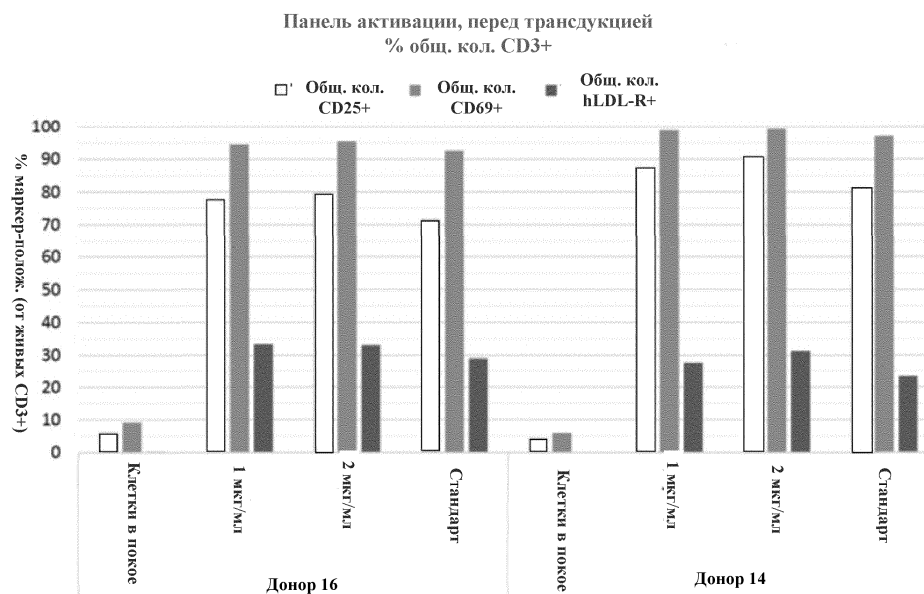
Фиг. 16В



Фиг. 17

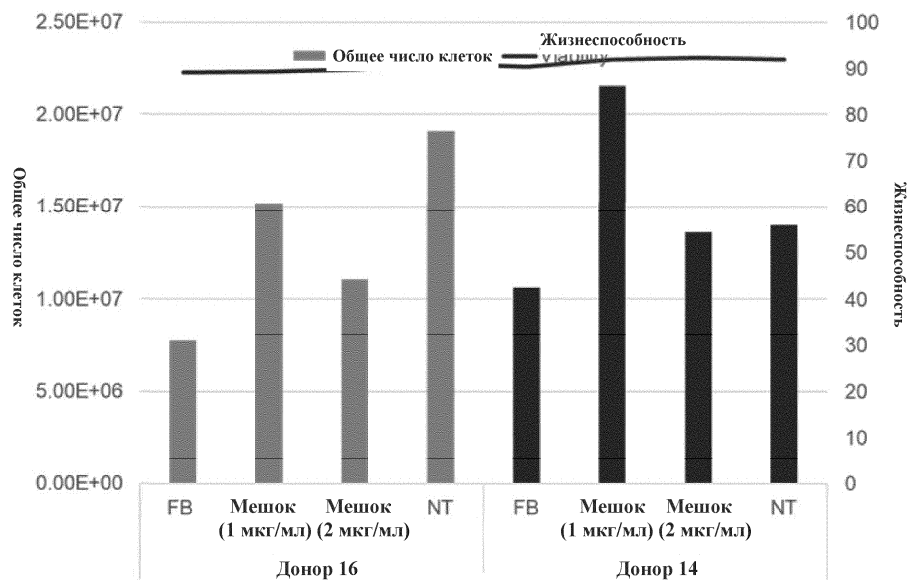


Фиг. 18



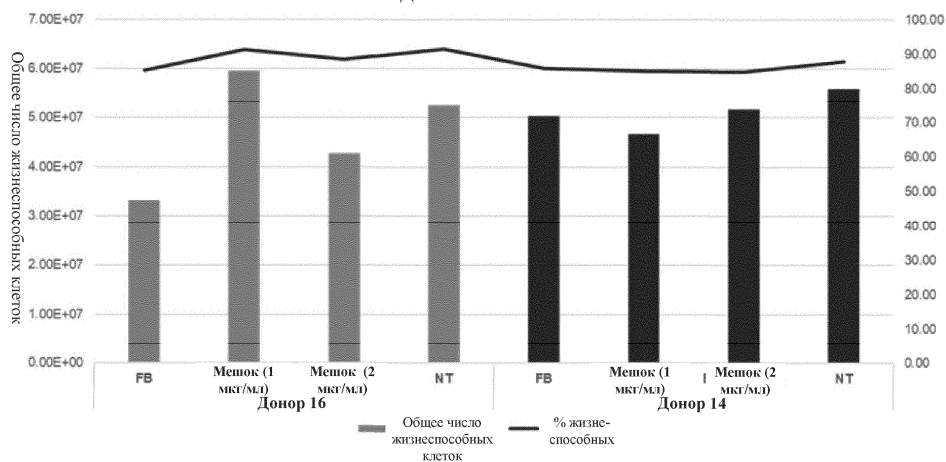
Фиг. 19

День 6 экспансия

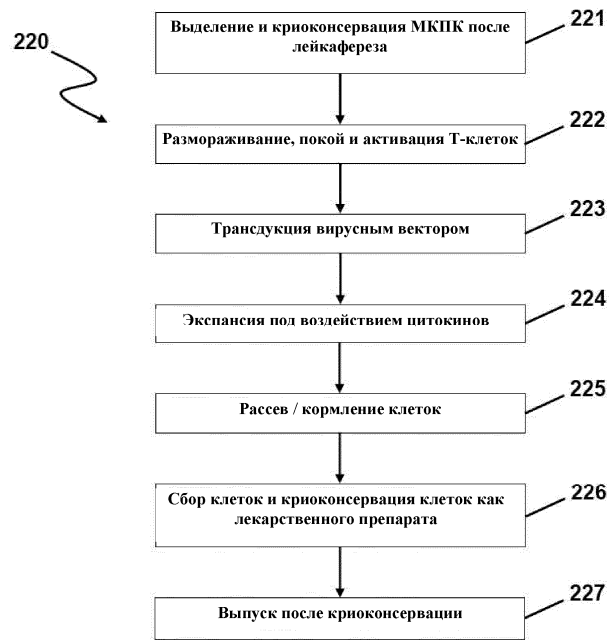


Фиг. 20

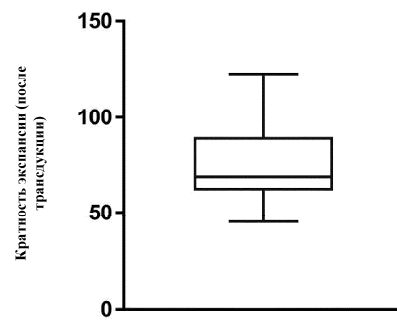
День 10 экспансия



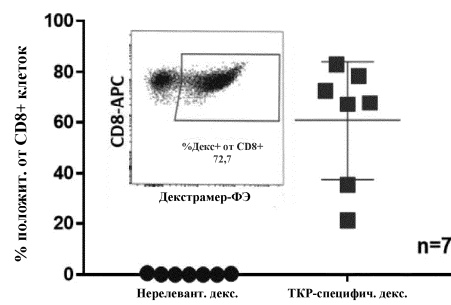
Фиг. 21



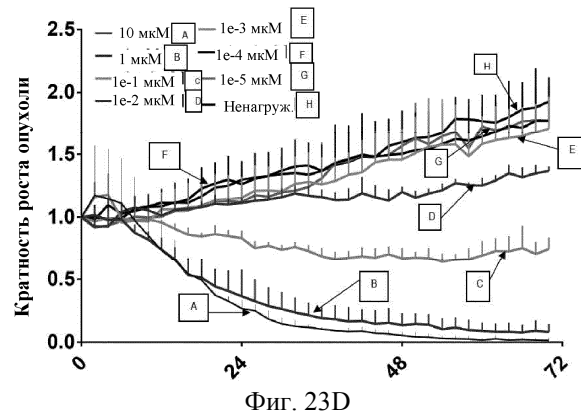
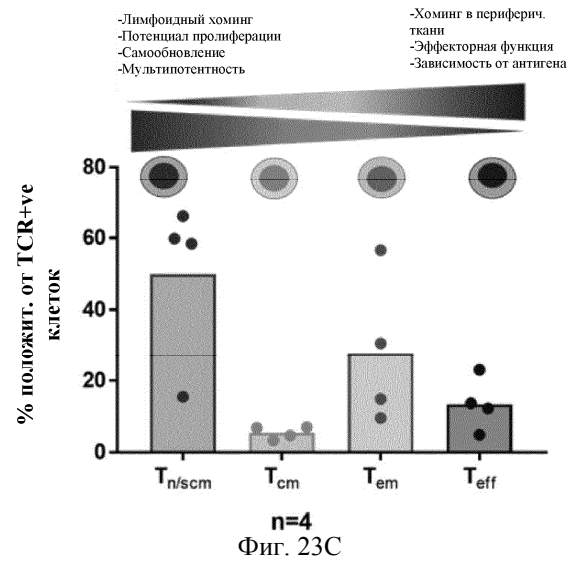
Фиг. 22



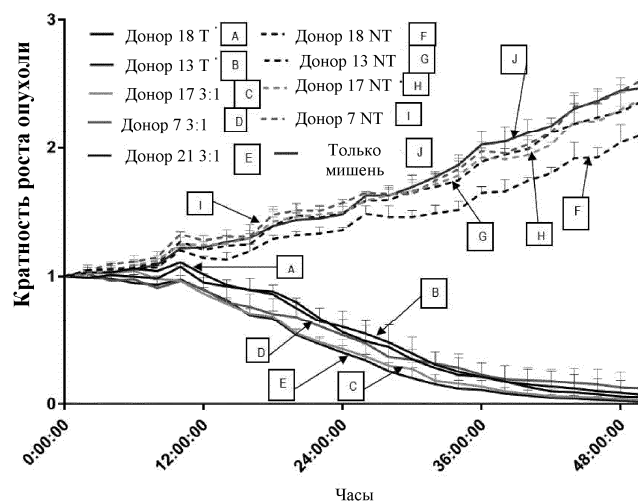
Фиг. 23А



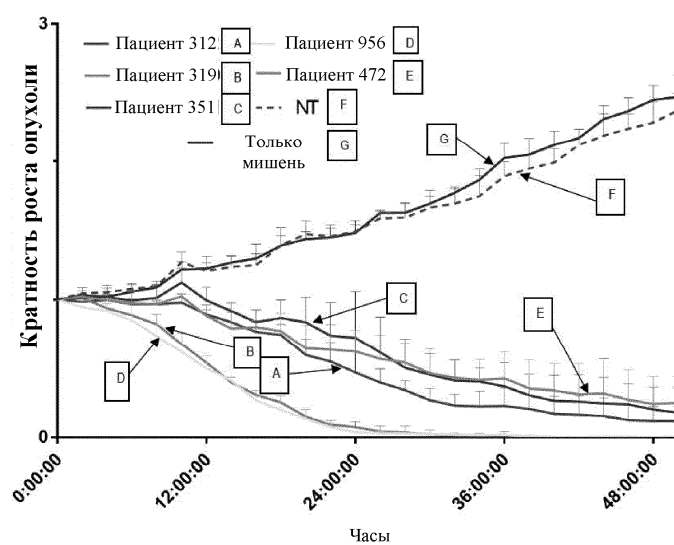
Фиг. 23В



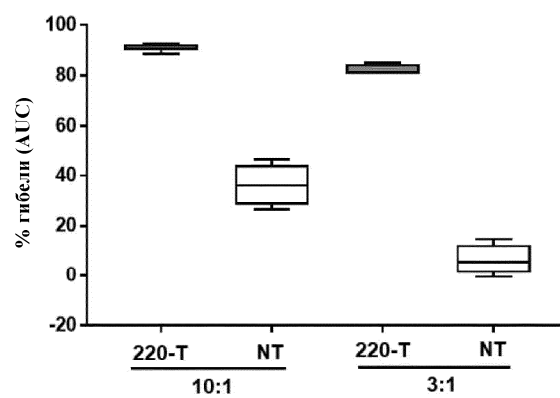
Кратность роста опухоли



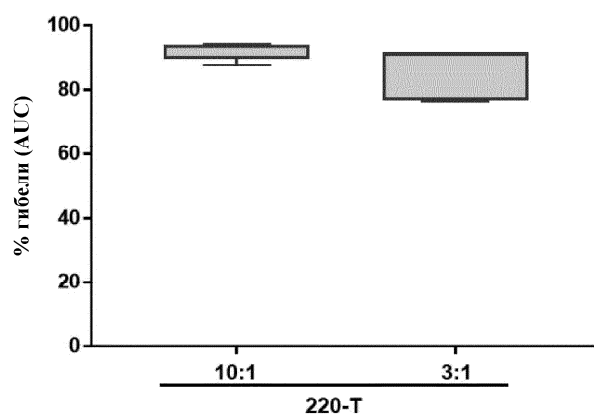
Кратность роста опухоли



Фиг. 23F



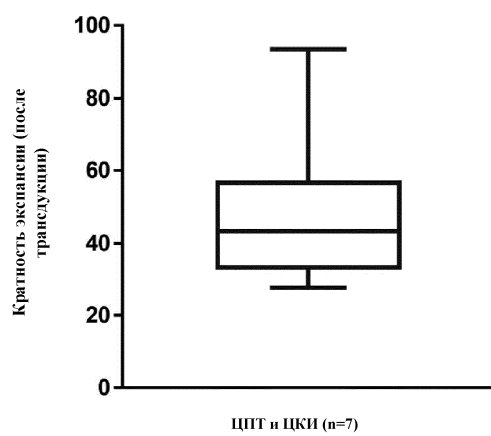
Фиг. 23G



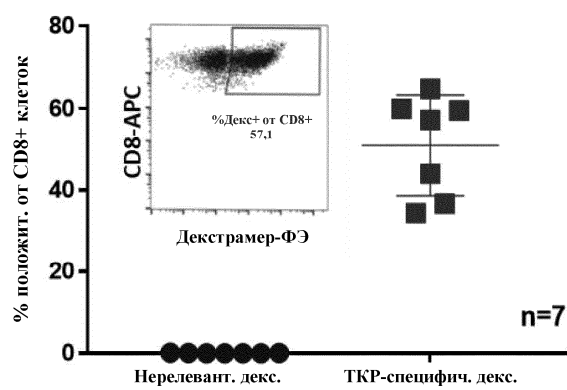
Фиг. 23H



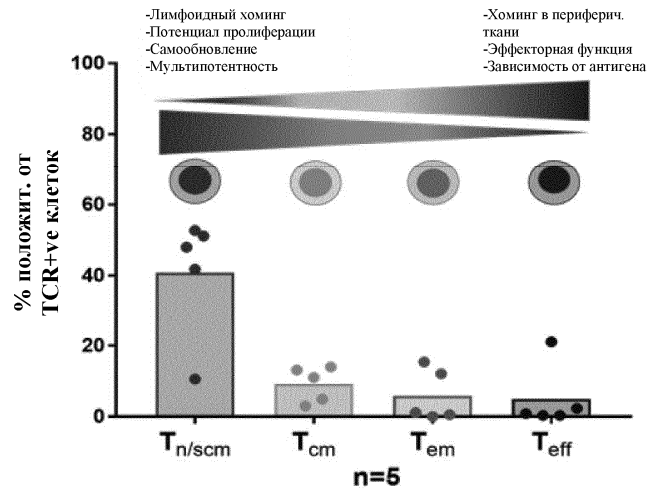
Фиг. 24



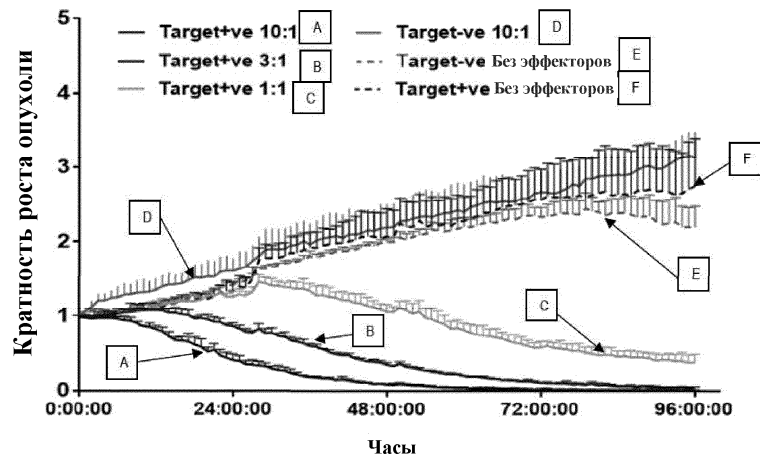
Фиг. 25А



Фиг. 25В

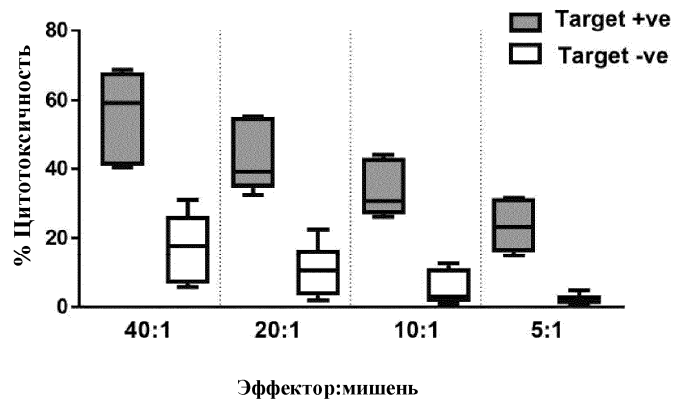


Фиг. 25C

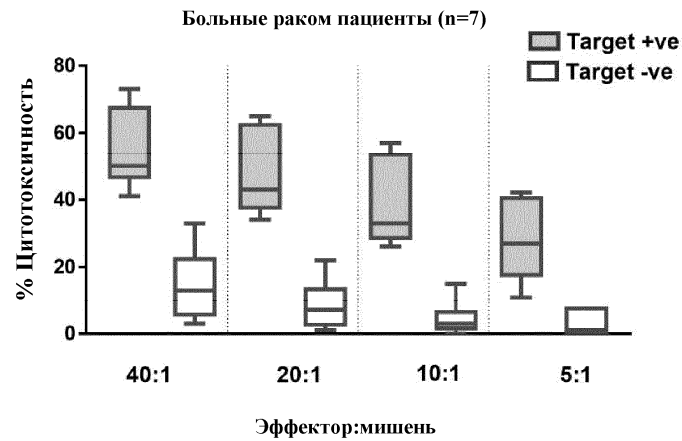


Фиг. 25D

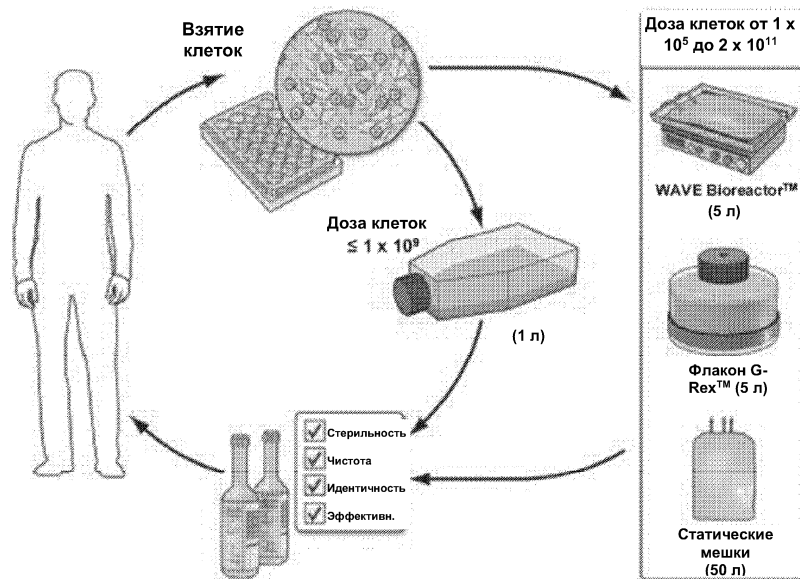
Здоровые доноры (n=5)



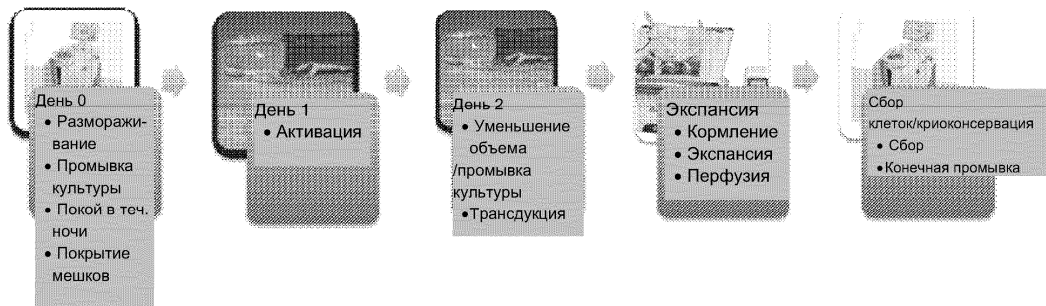
Фиг. 25E



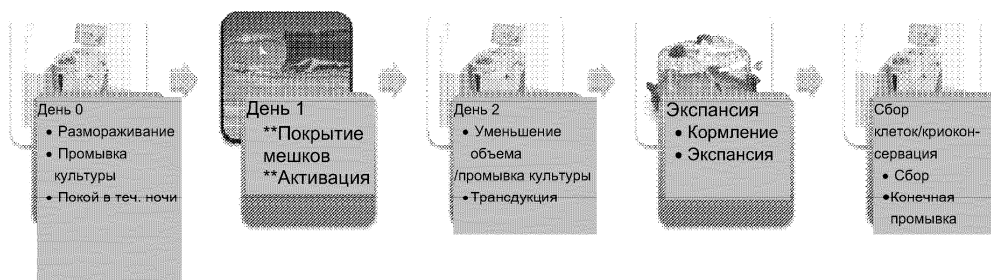
Фиг. 25F



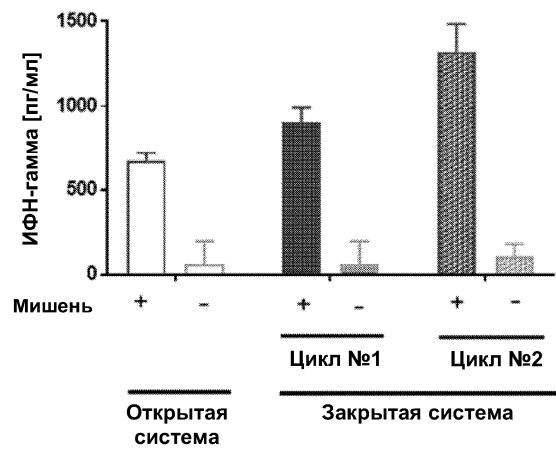
Фиг. 26



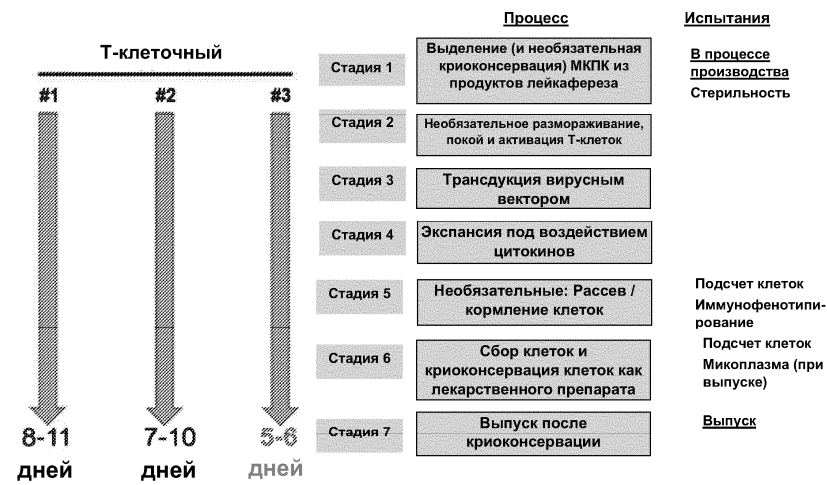
Фиг. 27



Фиг. 28

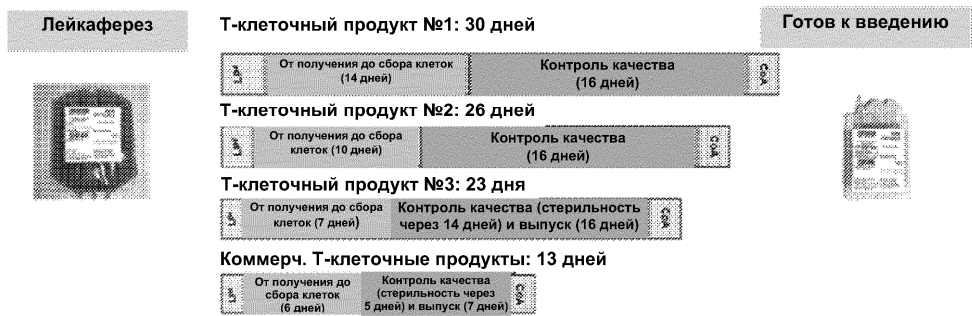


Фиг. 29



Открытый Открытый Полузакрытый

Фиг. 30

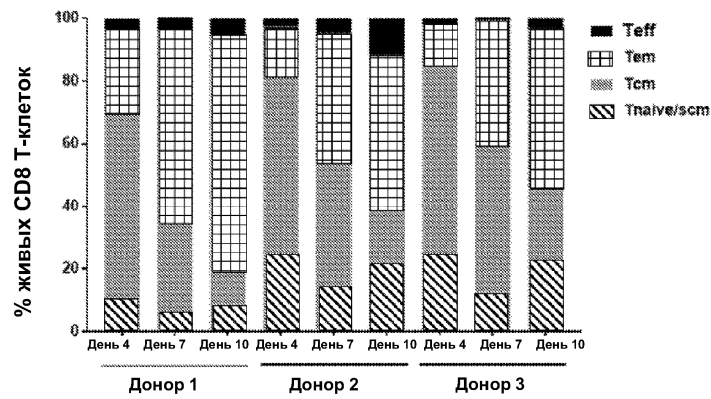


Фиг. 31



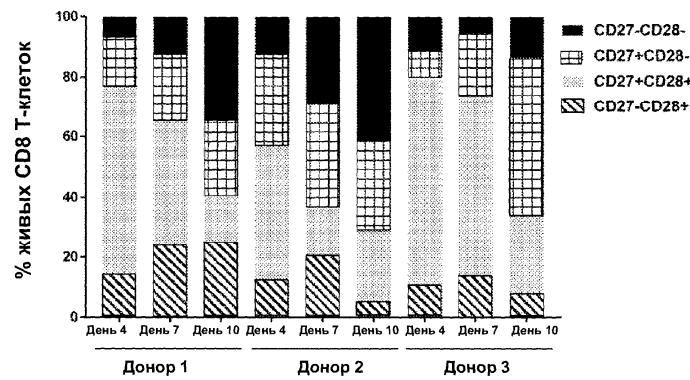
Фиг. 32

Фенотипирование Т-клеток памяти

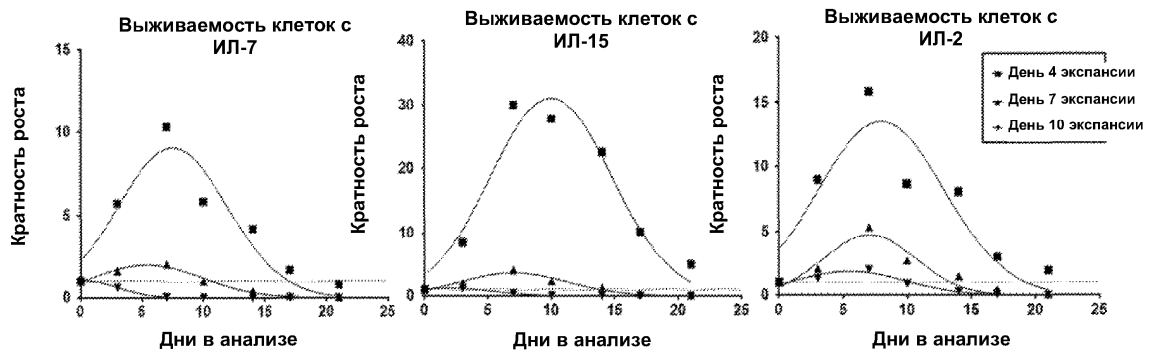


Фиг. 33

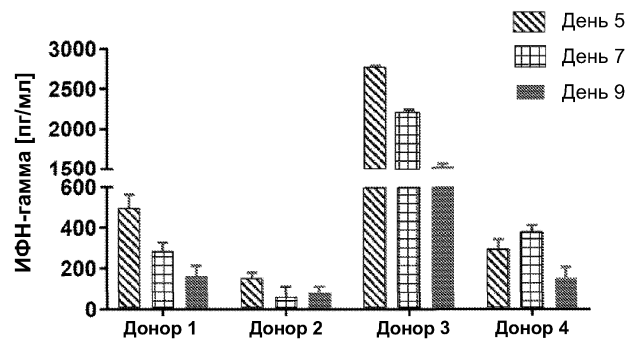
Фенотипирование на костимуляторную активность



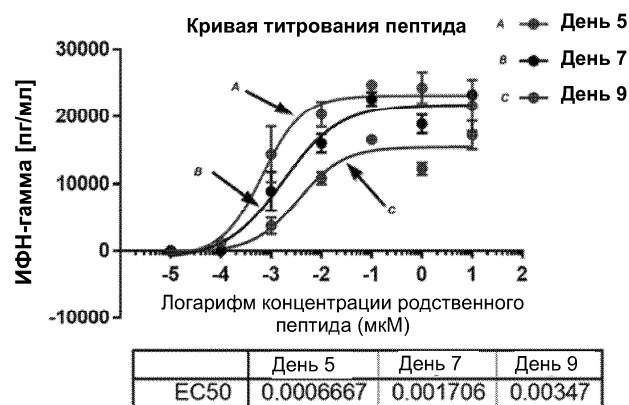
Фиг. 34



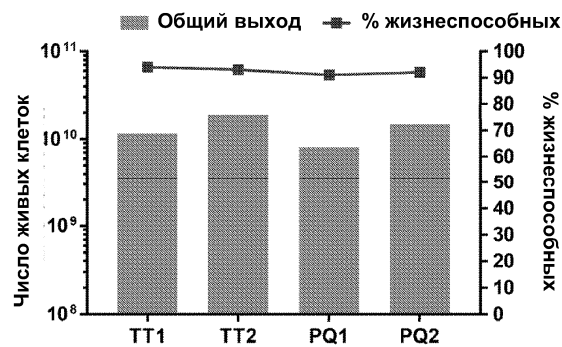
Фиг. 35



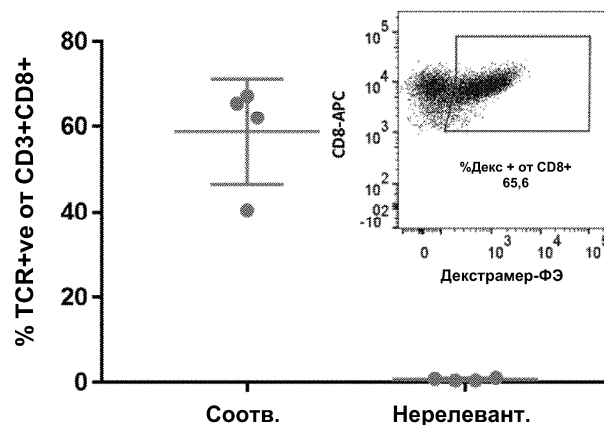
Фиг. 36



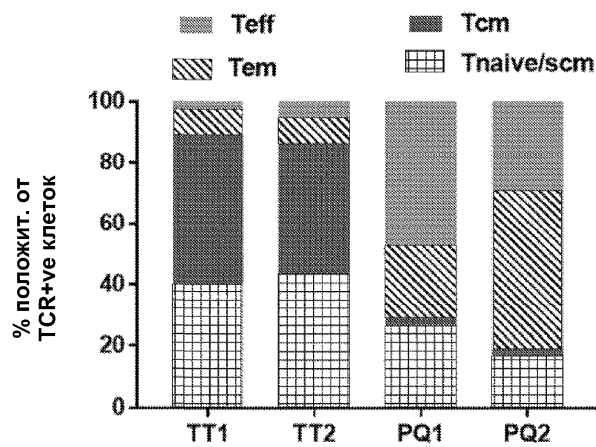
Фиг. 37



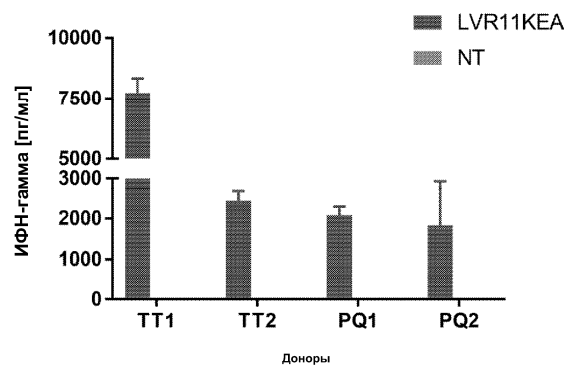
Фиг. 38



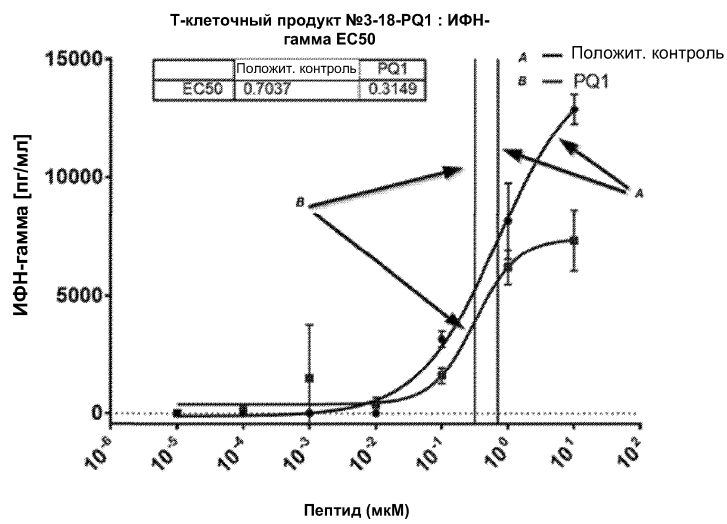
Фиг. 39



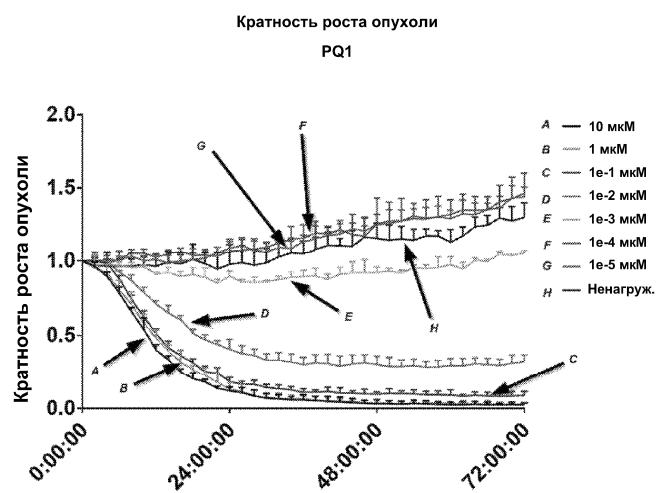
Фиг. 40



Фиг. 41

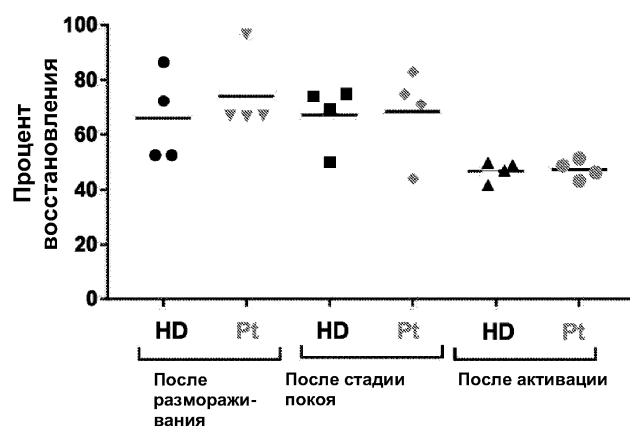


Фиг. 42

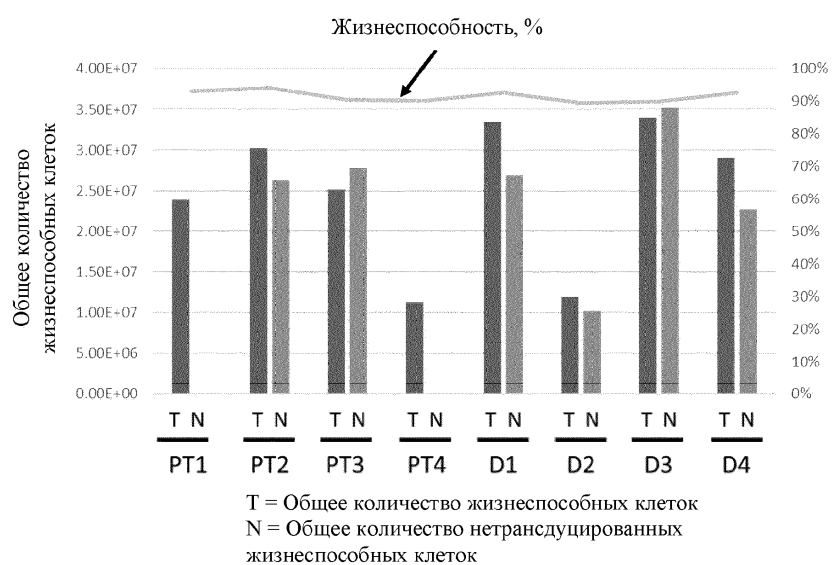


Фиг. 43

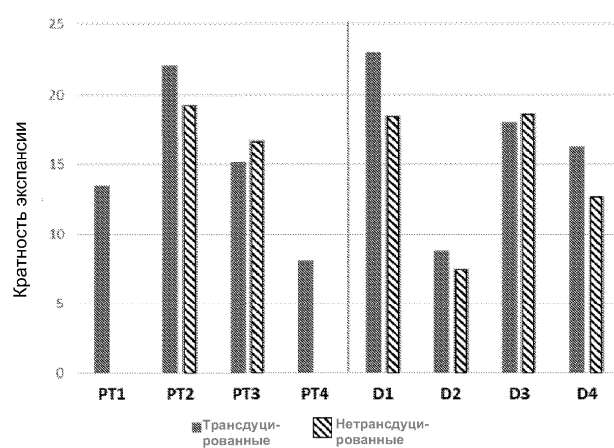
Здоровые доноры (HD) в сравнении с больными раком пациентами (Pt)



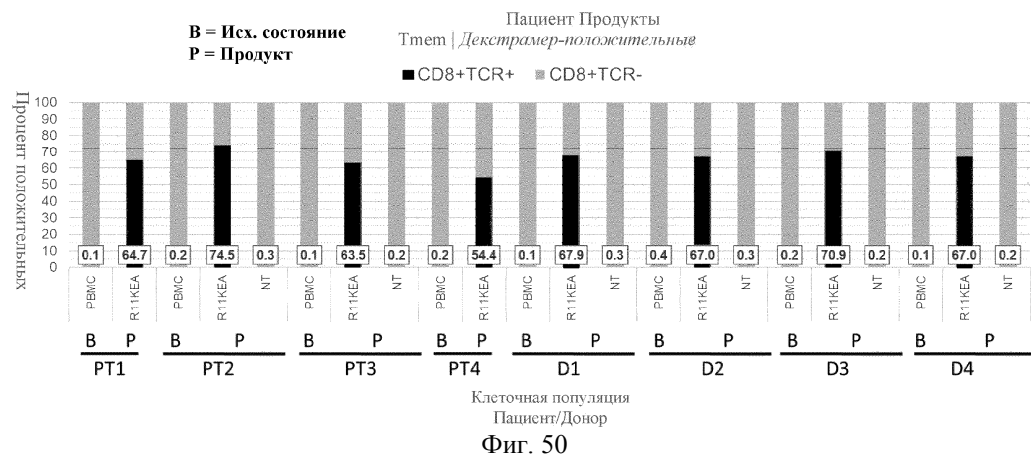
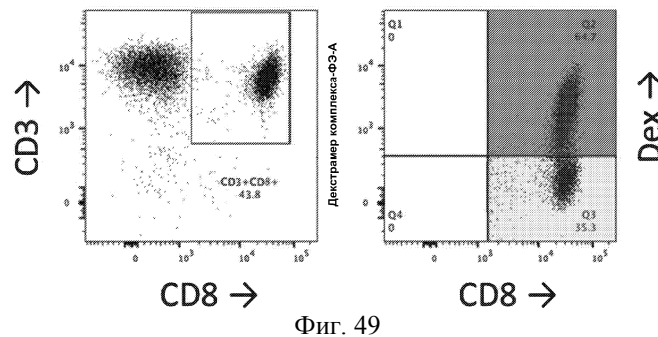
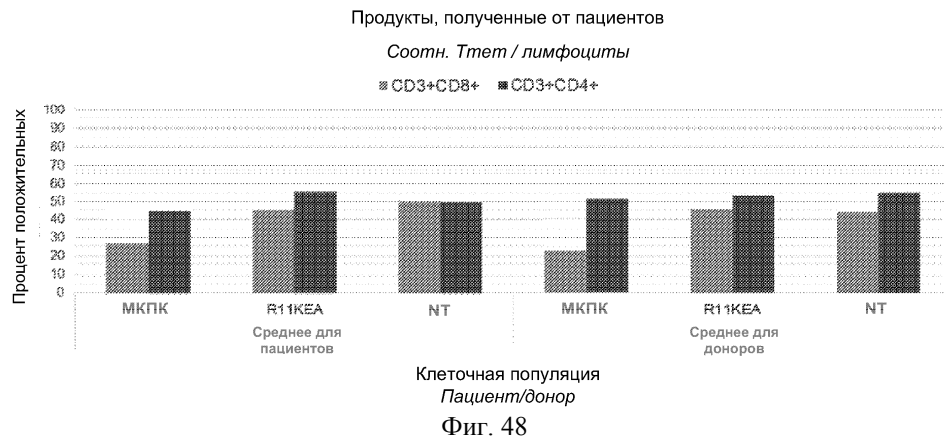
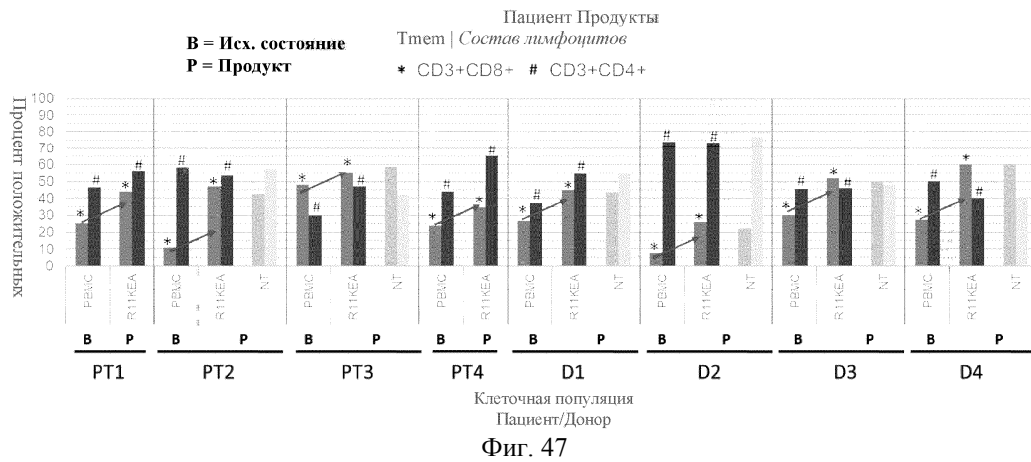
Фиг. 44



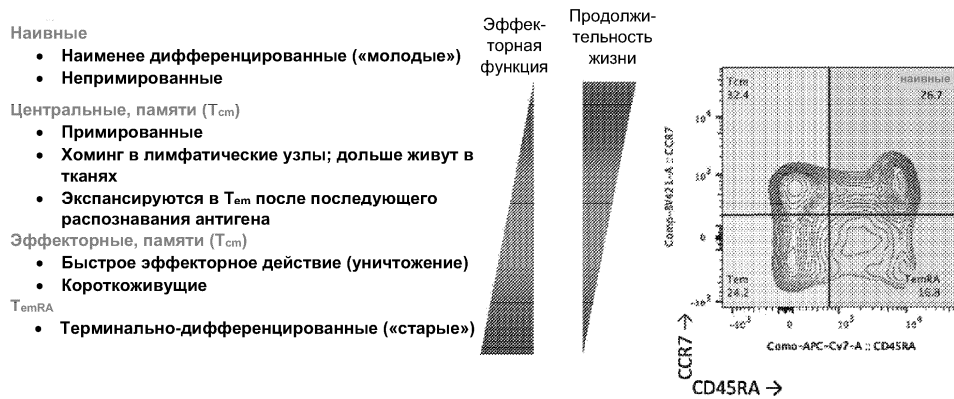
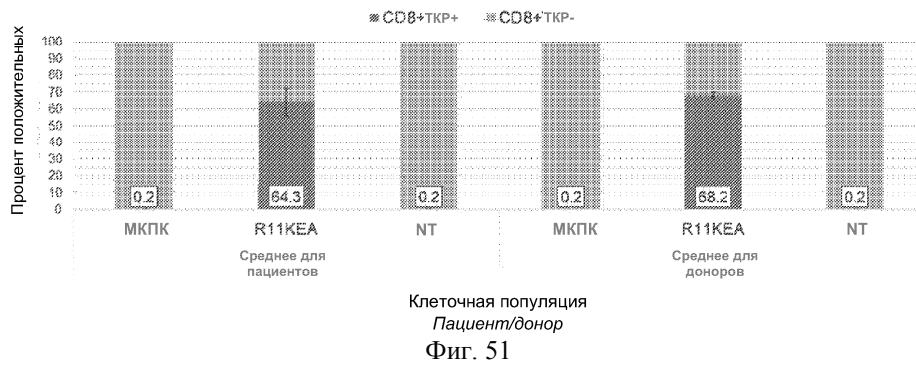
Фиг. 45



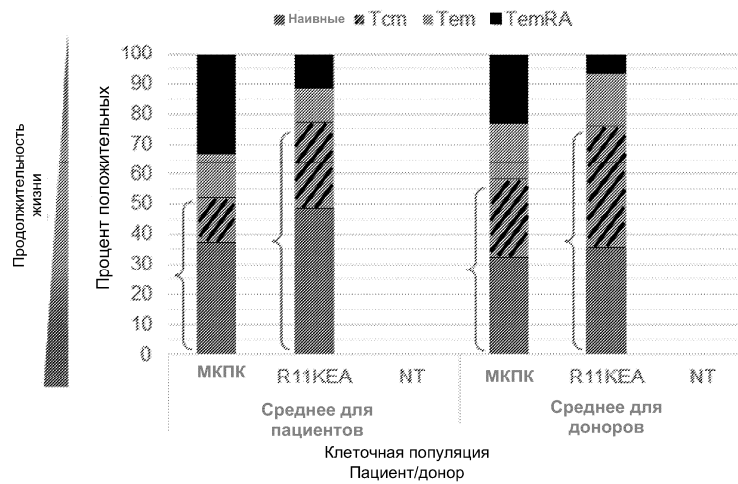
Фиг. 46

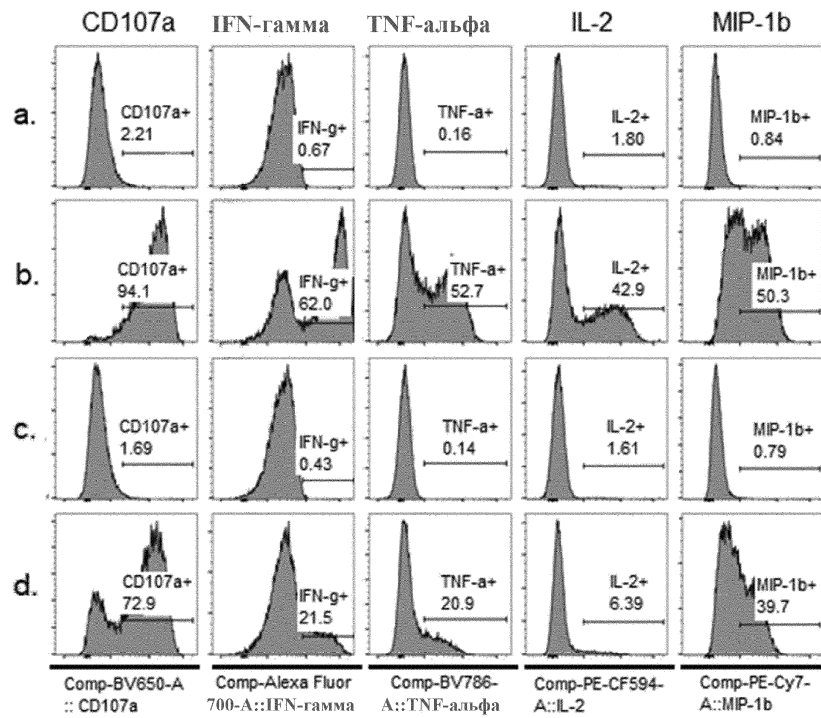


Продукты, полученные от пациентов
Соотн. Ттет / дextramer-положительные

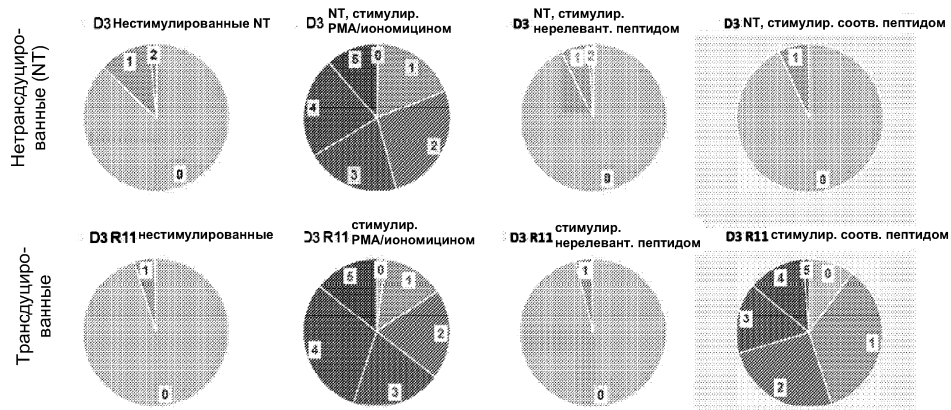


Продукты, полученные от пациентов
Соотн. Tтет / субпопуляции клеток памяти, TKP+ (МКПК на исходном уровне = TKP-)

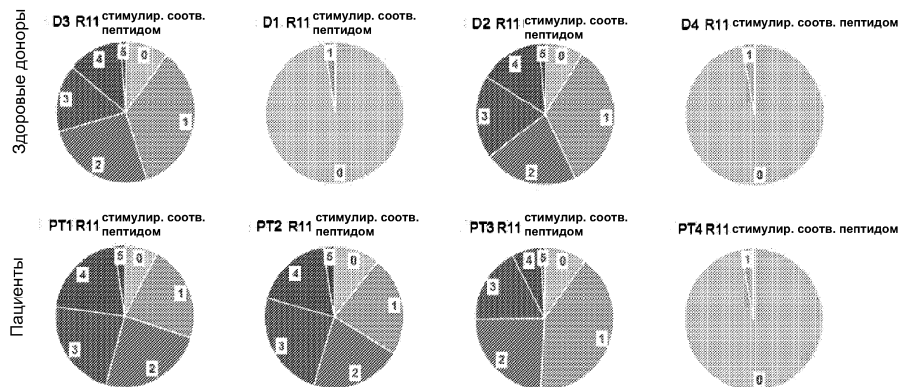




Фиг. 54

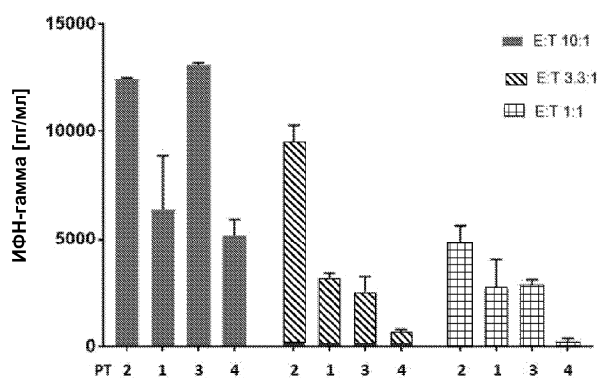


Фиг. 55



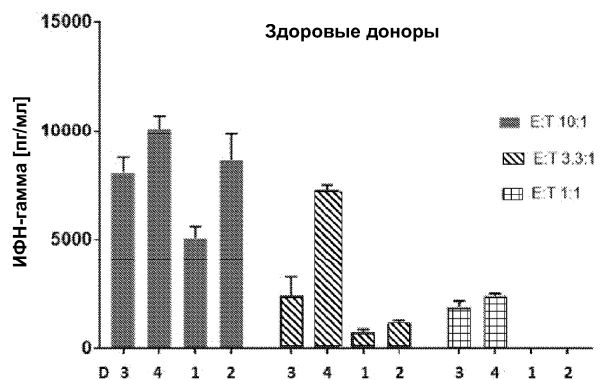
Фиг. 56

Больные раком пациенты



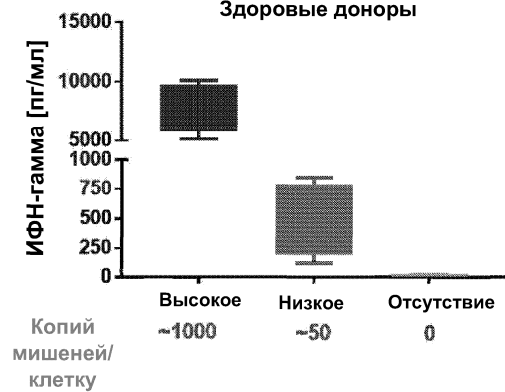
Фиг. 57

Здоровые доноры



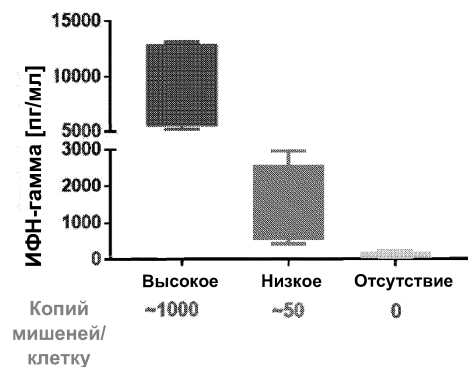
Фиг. 58

Здоровые доноры



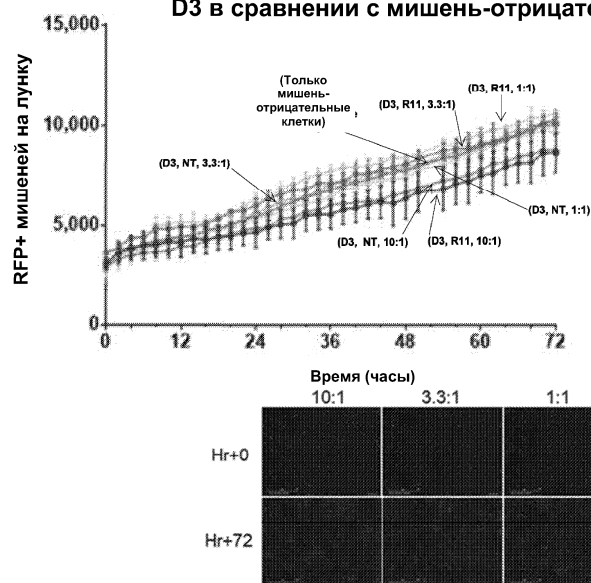
Фиг. 59

Больные раком пациенты



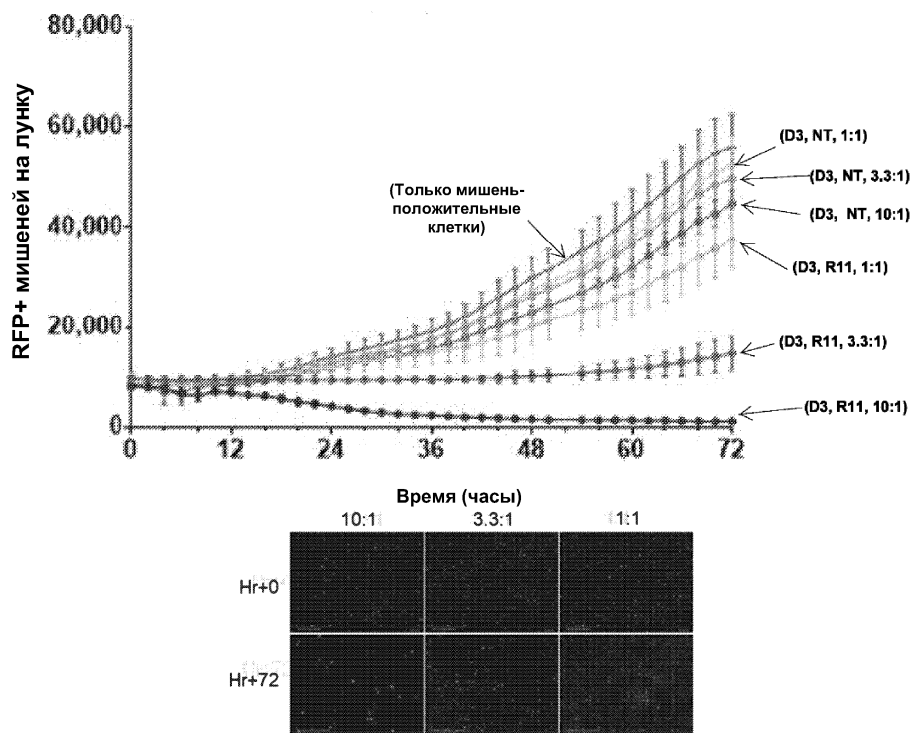
Фиг. 60

D3 в сравнении с мишень-отрицательными клетками



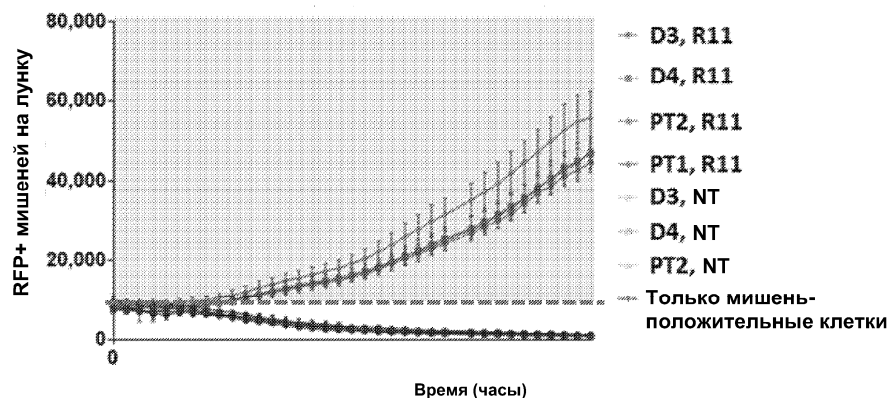
Фиг. 61

D3 в сравнении с мишень-положительными клетками

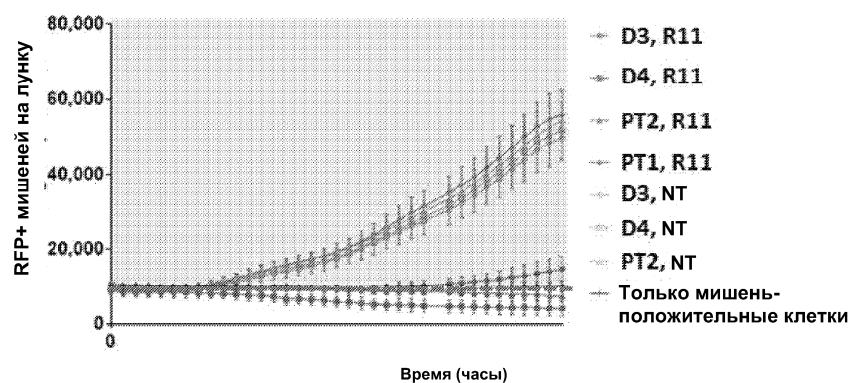


Фиг. 62

Продукты в сравнении с мишень-положительными клетками (10:1)



Продукты в сравнении с мишень-положительными клетками (3,3:1)



Продукты в сравнении с мишень-положительными клетками (3,3:1)

