

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293103 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.02

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

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(54) СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

(31) 63/016,907

(32) 2020.04.28

(33) US

(86) PCT/US2021/029762

(87) WO 2021/222479 2021.11.04

(71) Заявитель:
ЛАЙЕЛЬ ИММЬЮНОФАРМА, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

Воднала Суман Кумар, Эйл Роберт
Ланглэнд, Рестифо Николас П. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам культивирования клеток, например плюрипотентных клеток, мультипотентных клеток и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL) в среде, содержащей по меньшей мере около 5 мМ ионов калия, при этом среда не является гипертонической. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах описанные в данном документе способы увеличивают количество менее дифференцированных клеток в популяции клеток. В некоторых аспектах культивируемые клетки сконструированы, например, таким образом, чтобы они содержали химерный антигенный рецептор или сконструированный Т-клеточный рецептор. В некоторых аспектах клетки вводят нуждающемуся в этом субъекту.

A1

202293103

202293103

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576324EA/032

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке США № 63/016907, поданной 28 апреля 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП). В некоторых аспектах описанные в данном документе способы способствуют обогащению менее дифференцированных клеток и/или недифференцированных клеток в культуре. Клетки, культивированные с использованием описанных в данном документе способов, могут быть использованы для различных клеточных терапий, включая, но не ограничиваясь ими, терапию на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) и терапию на основе Т-клеток с TCR, включая терапию на основе неонатиген-направленных Т-клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Иммунотерапия рака основана на использовании Т-клеток, основных убийц иммунной системы инфицированных и пораженных клеток, для атаки и уничтожения опухолевых клеток. Однако есть важный камень преткновения для иммунотерапии: способность Т-клеток убивать может ослабевать, и это явление часто называют истощением или терминальной дифференцировкой Т-клеток. Блокада контрольных точек иммунного ответа, терапия на основе инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) *ex vivo*, терапия на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) и терапия на основе Т-клеток со сконструированным Т-клеточным рецептором (TCR) представляют собой это методы лечения, в которых используются функционально активные Т-клетки, выделенные от пациентов и требуют высокофункциональных Т-клеток для того, чтобы быть эффективными. Эти Т-клетки созданы и размножаются *ex vivo* для распознавания антигенов на раковых клетках-мишенях. Терапия на основе Т-клеток не всегда эффективна в лечении солидных злокачественных новообразований, отчасти потому, что Т-клетки со временем теряют способность размножаться или уничтожать.

Одним из способов преодоления истощения Т-клеток является выборочное введение Т-клеток, имеющих менее дифференцированное состояние. Например, стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}) сохраняются в организме пациентов в течение более длительного периода после введения, чем более дифференцированные Т-клетки центральной памяти (T_{CM}) или Т-клетки эффекторные памяти (T_{EM}), и T_{SCM} вызывают более выраженное и продолжительное влияние на размер опухоли, чем более дифференцированные клетки. Однако в данной области техники сохраняется потребность в способах эффективного обогащения менее дифференцированными и/или наивными Т-

клетками из смешанной популяции выделенных Т-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу культивирования иммунных клеток и/или стволовых клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающему помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда не является гипертонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения популяции иммунных клеток и/или стволовых клеток, включающему помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда не является гипертонической.

В некоторых аспектах среда дополнительно содержит один или более цитокинов. В некоторых аспектах один или более цитокинов включают интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-21 (IL-21), интерлейкин-15 (IL-15), интерлейкин-7 (IL-7) или любую их комбинацию.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения количества или процента недифференцированных или менее дифференцированных клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающему культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток в среде, содержащей ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда содержит IL-2, но не содержит IL-7 и IL-15. В некоторых аспектах иммунные клетки и/или стволовые клетки после культивирования содержат большее количество и/или процент недифференцированных или менее дифференцированных иммунных клеток и/или стволовых клеток по сравнению с иммунными клетками и/или стволовыми клетками, которые культивируются в среде, содержащей IL-2, IL-7, и IL-15.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения количества и/или процентного содержания недифференцированных или менее дифференцированных иммунных клеток и/или стволовых клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающему помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда содержит IL-7 и IL-21 или при этом среда содержит IL-2, IL-7 и IL-15.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения количества или процента недифференцированных или менее дифференцированных иммунных клеток и/или стволовых клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающему помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда содержит IL-15 и IL-21.

В некоторых аспектах клетки включают иммунные клетки. В некоторых аспектах иммунные клетки включают Т-клетки, TIL, NK-клетки, TIL, Treg и любую их комбинацию. В некоторых аспектах клетки включают стволовые клетки. В некоторых аспектах клетки экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), который может представлять собой сконструированный TCR. В некоторых аспектах среда является

гипотонической. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ионы натрия, например, NaCl, ион кальция, глюкозу и/или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах среда дополнительно содержит агент для экспансии клеток. В некоторых аспектах агент для экспансии клеток содержит ингибитор GSK3B, ингибитор ACLY, ингибитор PI3K, ингибитор АКТ или любую их комбинацию. В некоторых аспектах ингибитор PI3K выбран из LY294002, пиктилисиба, CAL101, IC87114 и любой их комбинации. В некоторых аспектах ингибитор АКТ выбран из MK2206, A443654, АКТи-VIII и любой их комбинации. В некоторых аспектах среда способна: увеличивать количество и/или процент менее дифференцированных и/или недифференцированных клеток; повышать эффективность трансдукции; увеличивать количество подобных стволовым клеткам иммунных клеток; повышать жизнеспособность *in vivo*; повышать потентность клеток; предотвращать истощение клеток; или любую их комбинацию, например, в конечном клеточном продукте по сравнению с исходной клеточной популяцией.

В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 45 мМ, по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 55 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 65 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 45 мМ до около 110 мМ, от около 45 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 45 мМ до около 80 мМ, от около 45 мМ до около 70 мМ, от около 45 мМ до около 60 мМ, от около 45 мМ до около 50 мМ, от около 50 мМ до около 110 мМ, от около 50 мМ до около 100 мМ, от около 50 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 80 мМ, от около 50 мМ до около 70 мМ, от около 60 мМ до около 110 мМ, от около 60 мМ до около 100 мМ, от около 60 мМ до около 90 мМ, от около 60 мМ до около 80 мМ, от около 60 мМ до около 70 мМ, от около 70 мМ до около 100 мМ, от около 70 мМ до около 90 мМ, от около 70 мМ до около 80 мМ, от около 80 мМ до около 110 мМ, от около 80 мМ до около 100 мМ, от около 80 мМ до около 90 мМ, от около 90 мМ до около 110 мМ, от около 90 мМ до около 100 мМ или от около 100 мМ до около 110 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 50 мМ до около 90 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 50 мМ до около 80 мМ.

В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность ниже около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность от около 100 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 125 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 150 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 175 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 210 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 220 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 225 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 230 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 235 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 240 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 245 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 250 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 255 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 260 мОсм/л до около 280

мОсм/л, от около 265 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 270 мОсм/л до около 280 мОсм/л или от около 275 мОсм/л до около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность от около 100 мОсм/л до около 280 мОсм/л, около 125 мОсм/л, около 150 мОсм/л, около 175 мОсм/л, около 200 мОсм/л, около 210 мОсм/л, около 220 мОсм/л, около 225 мОсм/л, около 230 мОсм/л, около 235 мОсм/л, около 240 мОсм/л, около 245 мОсм/л, около 250 мОсм/л, около 255 мОсм/л, около 260 мОсм/л, около 265 мОсм/л, около 270 мОсм/л или около 275 мОсм/л.

В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 250. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 255. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 260.

В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность от около 280 мОсм/л до около 285 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 290 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 295 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 300 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 305 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 310 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 315 мОсм/л или около 280 мОсм/л до менее 320 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 285 мОсм/л, около 290 мОсм/л, около 295 мОсм/л, около 300 мОсм/л, около 305 мОсм/л, около 310 мОсм/л или около 315 мОсм/л.

В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ионы натрия. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет от около 25 мМ до около 100 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет от около 30 мМ до около 40 мМ, от около 30 мМ до около 50 мМ, от около 30 мМ до около 60 мМ, от около 30 мМ до около 70 мМ, от около 30 мМ до около 80 мМ, от около 40 мМ до около 50 мМ, от около 40 мМ до около 60 мМ, от около 40 мМ до около 70 мМ, от около 40 мМ до около 80 мМ, от около 50 мМ до около 55 мМ, от около 50 мМ до около 60 мМ, от около 50 мМ до около 65 мМ, от около 50 мМ до около 70 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ, от около 50 мМ до около 80 мМ, от около 55 мМ до около 60 мМ, от около 55 мМ до около 65 мМ, от около 55 мМ до около 70 мМ, от около 55 мМ до около 75 мМ, от около 55 мМ до около 80 мМ, от около 60 мМ до около 65 мМ, от около 60 мМ до около 70 мМ, от около 60 мМ до около 75 мМ, от около 60 мМ до около 80 мМ, от около 70 мМ до около 75 мМ, от около 70 мМ до около 80 мМ или от около 75 мМ до около 80 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ или около 80 мМ.

В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 55 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 65 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 70 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 75 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет от около 80 до около 85 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов натрия

составляет от около 80 до около 90 мМ.

В некоторых аспектах среда дополнительно содержит глюкозу. В некоторых аспектах концентрация глюкозы составляет более около 10 мМ. В некоторых аспектах концентрация глюкозы составляет от около 10 мМ до около 25 мМ, от около 10 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 25 мМ, от около 15 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 19 мМ, от около 15 мМ до около 18 мМ, от около 15 мМ до около 17 мМ, от около 15 мМ до около 16 мМ, от около 16 мМ до около 20 мМ, от около 16 мМ до около 19 мМ, от около 16 мМ до около 18 мМ, около 16 мМ до около 17 мМ, от около 17 мМ до около 20 мМ, от около 17 мМ до около 19 мМ или от около 17 мМ до около 18 мМ. В некоторых аспектах концентрация глюкозы составляет около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ. В некоторых аспектах концентрация глюкозы составляет около 15,4 мМ, около 15,9 мМ, около 16,3 мМ, около 16,8 мМ, около 17,2 мМ или около 17,7 мМ.

В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ионы кальция. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет более около 0,4 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет от около 0,4 мМ до около 2,5 мМ, от около 0,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,0 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,1 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,3 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,4 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,6 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,7 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,8 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 до около 1,3 мМ, от около 1,2 до около 1,4 мМ, от около 1,2 до около 1,5 мМ, от около 1,2 до около 1,6 мМ, от около 1,2 до около 1,7 мМ, от около 1,2 до около 1,8 мМ, от около 1,3 до около 1,4 мМ, от около 1,3 до около 1,5 мМ, от около 1,3 до около 1,6 мМ, от около 1,3 до около 1,7 мМ, от около 1,3 до около 1,8 мМ, от около 1,4 до около 1,5 мМ, от около 1,4 до около 1,6 мМ, от около 1,4 до около 1,7 мМ, от около 1,4 до около 1,8 мМ, от около 1,5 до около 1,6 мМ, от около 1,5 до около 1,7 мМ, от около 1,5 до около 1,8 мМ, от около 1,6 до около 1,7 мМ, от около 1,6 до около 1,8 мМ или от около 1,7 до около 1,8 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,0 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ, около 1,9 мМ, или около 2,0 мМ.

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ ионов натрия; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 254,7 мОсоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и (i) около 76 мМ ионов натрия; (ii) около 17,2 мМ глюкозы; (iii) около 1,7 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 255,2 мОсоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и (i) около 72,2

мМ ионов натрия; (ii) около 16,8 мМ глюкозы; (iii) около 1,6 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 257,2 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и (i) около 67,6 мМ ионов натрия; (ii) около 16,3 мМ глюкозы; (iii) около 1,5 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 257,5 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и (i) около 63,9 мМ ионов натрия; (ii) около 15,9 мМ глюкозы; (iii) около 1,4 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 259,7 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ ионов натрия; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 260 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ ионов натрия; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 262,26 мОсмоль.

В некоторых аспектах иммунные клетки являются CD3+, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+CD27+, CD28+ или TCF7+ или любой их комбинацией после культивирования.

В некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 13 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 12 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 11 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 9 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 8 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 7 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 6 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 5 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 4 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 3 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 2 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 15 нг/мл или от около 15 нг/мл до около 20 нг/мл.

В некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2 нг/мл, около 3 нг/мл, около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 6 нг/мл, около 7 нг/мл, около 8 нг/мл, около 9 нг/мл, около 10 нг/мл, около 11 нг/мл, около 12 нг/мл, около 13 нг/мл, около 14 нг/мл, около 15 нг/мл, около 16 нг/мл, около 17 нг/мл, около 18 нг/мл, около 19 нг/мл или около 20 нг/мл. В некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет около 1,0 нг/мл. В некоторых аспектах концентрация IL-2 составляет около 10 нг/мл.

В некоторых аспектах концентрация IL-21 составляет от около 0,1 нг/мл до около

около 20 нг/мл. В некоторых аспектах концентрация IL-15 составляет около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2 нг/мл, около 3 нг/мл, около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 6 нг/мл, около 7 нг/мл, около 8 нг/мл, около 9 нг/мл, около 10 нг/мл, около 11 нг/мл, около 12 нг/мл, около 13 нг/мл, около 14 нг/мл, около 15 нг/мл, около 16 нг/мл, около 17 нг/мл, около 18 нг/мл, около 19 нг/мл или около 20 нг/мл. В некоторых аспектах концентрация IL-15 составляет около 1,0 нг/мл. В некоторых аспектах концентрация IL-15 составляет около 10 нг/мл.

В некоторых аспектах иммунные клетки и/или стволовые клетки содержат химерный антигенный рецептор, сконструированный Т-клеточный рецептор или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах иммунные клетки и/или стволовые клетки вводят субъекту-человеку после культивирования.

В некоторых аспектах клетки дополнительно трансдуцируют вектором. В некоторых аспектах вектор содержит трансген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) или имитатор TCR. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-la, MAGE-A1, легумин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, простеин, сурвивин, теломеразу, PCTA- 1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL или любые их комбинации. В некоторых аспектах TCR нацелен на AFP, CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl,

тирози́назу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, простеин, сурвивин, теломеразу, PCTA-1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL или любые их комбинации. В некоторых аспектах вектор представляет собой вектор на основе ретровируса, вектор на основе лентивируса, аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус, гибридный вирус AAV, бакуловирус или любую их комбинацию. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к популяции клеток, полученной с помощью описанного в данном документе способом. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к популяции клеток, содержащей по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60% или по меньшей мере около 70% клеток, которые являются CD3+, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+, CD27+, CD28+ и TCF7+, где клетки культивируют в соответствии со способом, описанным в данном документе. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к среде для культивирования клеток, применимой для описанного в данном документе способа. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к среде для культивирования клеток, содержащей (i) иммунные клетки или стволовые клетки, как описано в данном документе, и (ii) ионы калия в концентрации выше 40 mM, при этом среда для культивирования не является гипертонической.

В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 45 mM, по меньшей мере около 50 mM, по меньшей мере около 55 mM, по меньшей мере около 60 mM, по меньшей мере около 65 mM, по меньшей мере около 70 mM, около 75 mM, около 80 mM, около 85 mM, около 90 mM, около 95 mM или около 100 mM. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 50 mM, около 60 mM, около 70 mM или около 80 mM. В некоторых аспектах культуральная среда дополнительно содержит один или более цитокинов. В некоторых аспектах один или более цитокинов представляют собой IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 или любую их комбинацию. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение

субъекту популяции клеток, описанных в данном документе. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние включает опухоль, происходящую из злокачественного новообразования, включающего рак молочной железы, рак головы и шеи, рак матки, рак головного мозга, рак кожи, рак почки, рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак глаза, рак желудка (гастральный рак), рак желудочно-кишечного тракта, рак яичников, карциному, саркому, лейкоз, лимфому, миелому или их комбинацию.

Аспекты

Аспект 1. Способ культивирования иммунных клеток и/или стволовых клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающий помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда не является гипертонической.

Аспект 2. Способ получения популяции иммунных клеток и/или стволовых клеток, включающий помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда не является гипертонической.

Аспект 3. Способ по аспекту 1 или 2, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит один или более цитокинов.

Аспект 4. Способ по аспекту 3, отличающийся тем, что один или более цитокинов включают интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-7, интерлейкин-21, интерлейкин-15 (IL-15) или любую их комбинацию.

Аспект 5. Способ увеличения количества или процента недифференцированных или менее дифференцированных клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающий культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток в среде, содержащей ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда содержит IL-2, но не включает IL-7 и IL-15.

Аспект 6. Способ по аспекту 5, отличающийся тем, что иммунные клетки и/или стволовые клетки после культивирования содержат большее количество и/или процент недифференцированных или менее дифференцированных иммунных клеток и/или стволовых клеток по сравнению с иммунными клетками и/или стволовыми клетками, которые культивируются в среде, содержащей IL-2, IL-7, и IL-15.

Аспект 7. Способ увеличения количества и/или процента недифференцированных или менее дифференцированных иммунных клеток и/или стволовых клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающий помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом среда содержит IL-7 и IL-21.

Аспект 8. Способ увеличения количества или процента недифференцированных или менее дифференцированных иммунных клеток и/или стволовых клеток *ex vivo* или *in vitro*, включающий помещение иммунных клеток и/или стволовых клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, где среда содержит IL-15 и IL-21.

Аспект 9. Способ по любому из аспектов 1-8, отличающийся тем, что клетки включают иммунные клетки.

Аспект 10. Способ по аспекту 8, отличающийся тем, что иммунные клетки включают Т-клетки, ТНЛ, НК-клетки, ТНЛ, Treg и любую их комбинацию.

Аспект 11. Способ по любому из аспектов 1-8, отличающийся тем, что клетки включают стволовые клетки.

Аспект 12. Способ по любому из аспектов 1-11, отличающийся тем, что клетки экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR).

Аспект 13. Способ по любому из аспектов 1-11, отличающийся тем, что клетки экспрессируют сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR).

Аспект 14. Способ по любому из аспектов 1-13, отличающийся тем, что среда является гипотонической.

Аспект 15. Способ по любому из аспектов 1-14, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ионы натрия, ионы кальция, глюкозу и/или любую их комбинацию.

Аспект 16. Способ по любому из аспектов 1-15, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит агент для экспансии клеток.

Аспект 17. Способ согласно аспекту 16, отличающийся тем, что агент для экспансии клеток содержит ингибитор GSK3B, ингибитор ACLY, ингибитор PI3K, ингибитор АКТ или любую их комбинацию.

Аспект 18. Способ согласно аспекту 17, отличающийся тем, что ингибитор PI3K выбран из LY294002, пиктилисиба, CAL101, IC87114 и любой их комбинации.

Аспект 19. Способ по аспекту 17, отличающийся тем, что ингибитор АКТ выбран из MK2206, A443654, AKTi-VIII и любой их комбинации.

Аспект 20. Способ по любому из аспектов 1-19, отличающийся тем, что среда способна: а. увеличивать количество и/или процент менее дифференцированных и/или недифференцированных клеток; b. повышать эффективность трансдукции; с. увеличивать количество иммунных клеток, подобных стволовым; d. повышать жизнеспособность *in vivo*; e. повышать потенцию клеток; f. предотвращать истощение клеток; или g. любую их комбинацию.

Аспект 21. Способ по любому из аспектов 1-20, отличающийся тем, что концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 45 мМ, по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 55 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 65 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ.

Аспект 22. Способ по любому из аспектов 1-21, отличающийся тем, что концентрация ионов калия составляет от около 45 мМ до около 110 мМ, от около 45 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 45 мМ до около 80 мМ, от около 45 мМ до около 70 мМ, от около 45 мМ до около 60 мМ, от около 45 мМ до около 50 мМ, от около 50 мМ до около 110 мМ, от около 50 мМ до около 100 мМ, от около 50

мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 80 мМ, от около 50 мМ до около 70 мМ, от около 60 мМ до около 110 мМ, от около 60 мМ до около 100 мМ, от около 60 мМ до около 90 мМ, от около 60 мМ до около 80 мМ, от около 60 мМ до около 70 мМ, от около 70 мМ до около 100 мМ, от около 70 мМ до около 90 мМ, от около 70 мМ до около 80 мМ, от около 80 мМ до около 110 мМ, от около 80 мМ до около 100 мМ, от около 80 мМ до около 90 мМ, от около 90 мМ до около 110 мМ, от около 90 мМ до около 100 мМ или от около 100 мМ до около 110 мМ.

Аспект 23. Способ по любому из аспектов 1-22, отличающийся тем, что концентрация ионов калия составляет от около 50 мМ до около 90 мМ.

Аспект 24. Способ по любому из аспектов 1-23, отличающийся тем, что концентрация ионов калия составляет от около 50 мМ до около 80 мМ.

Аспект 25. Способ по любому из аспектов 1-24, отличающийся тем, что осмоляльность среды ниже около 280 мОсм/л.

Аспект 26. Способ по любому из аспектов 1-25, отличающийся тем, что среда имеет осмоляльность от около 100 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 125 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 150 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 175 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 200 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 210 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 220 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 225 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 230 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 235 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 240 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 245 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 250 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 255 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 260 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 265 мОсм/л до около 280 мОсм/л, от около 270 мОсм/л до около 280 мОсм/л или от около 275 мОсм/л до около 280 мОсм/л.

Аспект 27. Способ по любому из аспектов 1-26, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет от около 100 мОсм/л до около 280 мОсм/л, около 125 мОсм/л, около 150 мОсм/л, около 175 мОсм/л, около 200 мОсм/л, около 210 мОсм/л, около 220 мОсм/л, около 225 мОсм/л, около 230 мОсм/л, около 235 мОсм/л, около 240 мОсм/л, около 245 мОсм/л, около 250 мОсм/л, около 255 мОсм/л, около 260 мОсм/л, около 265 мОсм/л, около 270 мОсм/л или около 275 мОсм/л.

Аспект 28. Способ по любому из аспектов 1-27, отличающийся тем, что среда имеет осмоляльность около 250.

Аспект 29. Способ по любому из аспектов 1-28, отличающийся тем, что среда имеет осмоляльность около 255.

Аспект 30. Способ по любому из аспектов 1-29, отличающийся тем, что среда имеет осмоляльность около 260.

Аспект 31. Способ по любому из аспектов 1-24, отличающийся тем, что среда является изотонической.

Аспект 32. Способ по аспекту 31, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет от около 280 мОсм/л до около 285 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 290

мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 295 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 300 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 305 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 310 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 315 мОсм/л, или от около 280 мОсм/л до менее 320 мОсм/л.

Аспект 33. Способ по аспекту 31 или 32, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 285 мОсм/л, около 290 мОсм/л, около 295 мОсм/л, около 300 мОсм/л, около 305 мОсм/л, около 310 мОсм/л, или около 315 мОсм/л.

Аспект 34. Способ по любому из аспектов 1-33, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ионы натрия.

Аспект 35. Способ согласно аспекту 34, отличающийся тем, что концентрация ионов натрия составляет от около 25 мМ до около 100 мМ.

Аспект 36. Способ по аспекту 34 или 35, отличающийся тем, что концентрация ионов натрия составляет от около 30 мМ до около 40 мМ, от около 30 мМ до около 50 мМ, от около 30 мМ до около 60 мМ, от около 30 мМ до около 70 мМ, от около 30 мМ до около 80 мМ, от около 40 мМ до около 50 мМ, от около 40 мМ до около 60 мМ, от около 40 мМ до около 70 мМ, от около 40 мМ до около 80 мМ, от около 50 мМ до около 55 мМ, от около 50 мМ до около 60 мМ, от около 50 мМ до около 65 мМ, от около 50 мМ до около 70 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ, от около 50 мМ до около 80 мМ, от около 55 мМ до около 60 мМ, от около 55 мМ до около 65 мМ, от около 55 мМ до около 70 мМ, от около 55 мМ до около 75 мМ, от около 55 мМ до около 80 мМ, от около 60 мМ до около 65 мМ, от около 60 мМ до около 70 мМ, от около 60 мМ до около 75 мМ, от около 60 мМ до от около 80 мМ, от около 70 мМ до около 75 мМ, от около 70 мМ до около 80 мМ или от около 75 мМ до около 80 мМ.

Аспект 37. Способ по любому из аспектов 34-36, отличающийся тем, что концентрация ионов натрия составляет около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ или около 80 мМ.

Аспект 38. Способ по любому из аспектов 34-37, отличающийся тем, что концентрация ионов натрия составляет около 55 мМ.

Аспект 39. Способ по любому из аспектов 34-38, отличающийся тем, что концентрация ионов натрия составляет около 60 мМ.

Аспект 40. Способ по любому из аспектов 34-39, отличающийся тем, что концентрация ионов натрия составляет около 65 мМ.

Аспект 41. Способ по любому из аспектов 1-40, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит глюкозу.

Аспект 42. Способ по аспекту 41, отличающийся тем, что концентрация глюкозы составляет более около 10 мМ.

Аспект 43. Способ по аспекту 41 или 42, отличающийся тем, что концентрация глюкозы составляет от около 10 мМ до около 25 мМ, от около 10 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 25 мМ, от около 15 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около

19 мМ, от около 15 мМ до около 18 мМ, от около 15 мМ до около 17 мМ, от около 15 мМ до около 16 мМ, от около 16 мМ до около 20 мМ, от около 16 мМ до около 19 мМ, от около 16 мМ до около 18 мМ, около 16 мМ до около 17 мМ, от около 17 мМ до около 20 мМ, от около 17 мМ до около 19 мМ или от около 17 мМ до около 18 мМ.

Аспект 44. Способ по любому из аспектов 41-43, отличающийся тем, что концентрация глюкозы составляет около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

Аспект 45. Способ по любому из аспектов 41-44, отличающийся тем, что концентрация глюкозы составляет около 15,4 мМ, около 15,9 мМ, около 16,3 мМ, около 16,8 мМ, около 17,2 мМ или около 17,7 мМ.

Аспект 46. Способ по любому из аспектов 1-45, отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ионы кальция.

Аспект 47. Способ согласно аспекту 46, отличающийся тем, что концентрация ионов кальция составляет более около 0,4 мМ.

Аспект 48. Способ по аспекту 46 или 47, отличающийся тем, что концентрация ионов кальция составляет от около 0,4 мМ до около 2,5 мМ, от около 0,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,0 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,1 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,3 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,4 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,6 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,7 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,8 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 до около 1,3 мМ, от около 1,2 до около 1,4 мМ, от около 1,2 до около 1,5 мМ, от около 1,2 до около 1,6 мМ, от около 1,2 до около 1,7 мМ, от около 1,2 до около 1,8 мМ, от около 1,3 до около 1,4 мМ, от около 1,3 до около 1,5 мМ, от около 1,3 до около 1,6 мМ, от около 1,3 до около 1,7 мМ, от около 1,3 до около 1,8 мМ, от около 1,4 до около 1,5 мМ, от около 1,4 до около 1,6 мМ, от около 1,4 до около 1,7 мМ, от около 1,4 до около 1,8 мМ, от около 1,5 до около 1,6 мМ, от около 1,5 до около 1,7 мМ, от около 1,5 до около 1,8 мМ, от около 1,6 до около 1,7 мМ, от около 1,6 до около 1,8 мМ или от около 1,7 до около 1,8 мМ.

Аспект 49. Способ по любому из аспектов 46-48, отличающийся тем, что концентрация ионов кальция составляет около 1,0 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ, около 1,9 мМ или около 2,0 мМ.

Аспект 50. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ ионов натрия; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 51. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 254,7 мОсоль.

Аспект 52. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 55 мМ ионов калия и (i) около 76 мМ ионов натрия; (ii) около 17,2 мМ глюкозы; (iii) около 1,7 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 53. Способ согласно аспекту 52, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 255,2 мОсмоль.

Аспект 54. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 60 мМ ионов калия и (i) около 72,2 мМ ионов натрия; (ii) около 16,8 мМ глюкозы; (iii) около 1,6 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 55. Способ по аспекту 54, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 257,2 мОсмоль.

Аспект 56. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 65 мМ ионов калия и (i) около 67,6 мМ ионов натрия; (ii) около 16,3 мМ глюкозы; (iii) около 1,5 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 57. Способ согласно аспекту 56, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 257,5 мОсмоль.

Аспект 58. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 70 мМ ионов калия и (i) около 63,9 мМ ионов натрия; (ii) около 15,9 мМ глюкозы; (iii) около 1,4 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 59. Способ согласно аспекту 58, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 259,7 мОсмоль.

Аспект 60. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ ионов натрия; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 61. Способ согласно аспекту 60, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 260 мОсмоль.

Аспект 62. Способ по любому из аспектов 1-49, отличающийся тем, что среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ ионов натрия; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

Аспект 63. Способ согласно аспекту 62, отличающийся тем, что осмоляльность среды составляет около 262,26 мОсмоль.

Аспект 64. Способ по любому из аспектов 9-55, отличающийся тем, что иммунные клетки являются CD3+, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+CD27+, CD28+ или TCF7+ или любой их комбинацией после культивирования.

Аспект 65. Способ по любому из аспектов 4-6 и 9-64, отличающийся тем, что концентрация IL-2 составляет от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 13 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 12 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 11 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 9 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 8 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 7 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 6 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 5 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 4 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 3 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 2 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 15 нг/мл или от около 15 нг/мл до около 20 нг/мл.

около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 6 нг/мл, около 7 нг/мл, около 8 нг/мл, около 9 нг/мл, около 10 нг/мл, около 11 нг/мл, около 12 нг/мл, около 13 нг/мл, около 14 нг/мл, около 15 нг/мл, около 16 нг/мл, около 17 нг/мл, около 18 нг/мл, около 19 нг/мл или около 20 нг/мл.

Аспект 75. Способ по аспекту 73 или 74, отличающийся тем, что концентрация IL-7 составляет около 1,0 нг/мл.

Аспект 76. Способ по аспекту 73 или 74, отличающийся тем, что концентрация IL-7 составляет около 10 нг/мл.

Аспект 77. Способ по любому из аспектов 4-6 и 8-76, отличающийся тем, что концентрация IL-15 составляет от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 13 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 12 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 11 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 9 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 8 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 7 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 6 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 5 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 4 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 3 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 2 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 15 нг/мл или от около 15 нг/мл до около 20 нг/мл.

Аспект 78. Способ по аспекту 77, отличающийся тем, что концентрация IL-15 составляет около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2 нг/мл, около 3 нг/мл, около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 6 нг/мл, около 7 нг/мл, около 8 нг/мл, около 9 нг/мл, около 10 нг/мл, около 11 нг/мл, около 12 нг/мл, около 13 нг/мл, около 14 нг/мл, около 15 нг/мл, около 16 нг/мл, около 17 нг/мл, около 18 нг/мл, около 19 нг/мл или около 20 нг/мл.

Аспект 79. Способ по аспекту 77 или 78, отличающийся тем, что концентрация IL-15 составляет около 1,0 нг/мл.

Аспект 80. Способ согласно аспекту 77 или 78, отличающийся тем, что концентрация IL-15 составляет около 10 нг/мл.

Аспект 81. Способ по любому из аспектов 1-80, отличающийся тем, что иммунные клетки и/или стволовые клетки содержат химерный антигенный рецептор, сконструированный Т-клеточный рецептор или любую их комбинацию.

Аспект 82. Способ по любому из аспектов 1-81, отличающийся тем, что иммунные клетки и/или стволовые клетки вводят субъекту-человеку после культивирования.

Аспект 83. Способ по любому из аспектов 1-82, отличающийся тем, что клетки дополнительно трансдуцируют вектором.

Аспект 84. Способ по аспекту 83, отличающийся тем, что вектор содержит трансген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) или имитатор TCR.

Аспект 85. Способ по аспекту 84, отличающийся тем, что CAR нацелен на CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21,

VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-la, MAGE-A1, легумаин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, протеин, сурвивин, теломеразу, PCTA- 1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL или любые их комбинации.

Аспект 86. Способ по аспекту 84, отличающийся тем, что TCR нацелен на AFP, CD19, TRAC, TCRβ, BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL- 13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюис Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-la, MAGE-A1, легумаин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, протеин, сурвивин, теломеразу, PCTA- 1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL или любые их комбинации.

Аспект 87. Способ по аспекту 84, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор на основе ретровируса, вектор на основе лентивируса, аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус, гибридный вирус AAV, бакуловирус или любую их комбинацию.

Аспект 88. Популяция клеток, полученная с помощью способа по любому из аспектов 1-87.

Аспект 89. Популяция клеток, содержащая по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60% или по меньшей мере около 70% клеток являются CD3+, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+, CD27+, CD28+ и TCF7+, при этом клетки культивируют в соответствии со способом по любому из аспектов 1-87.

Аспект 90. Среда для культивирования клеток, применимая для способа по любому из аспектов 1-87.

Аспект 91. Среда для культивирования клеток, содержащая (i) иммунные клетки или стволовые клетки, как описано в аспектах 1-87, и (ii) ионы калия в концентрации выше 40 мМ, при этом культуральная среда не является гипертонической.

Аспект 92. Культуральная среда по аспекту 91, отличающаяся тем, что концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 45 мМ, по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 55 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 65 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ.

Аспект 93. Культуральная среда по аспекту 91 или 92, отличающаяся тем, что концентрация ионов калия составляет около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ или около 80 мМ.

Аспект 94. Культуральная среда по любому из аспектов 91-93, которая дополнительно содержит один или более цитокинов.

Аспект 95. Культуральная среда по аспекту 94, отличающаяся тем, что один или более цитокинов выбраны из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 и любой их комбинации.

Аспект 96. Способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту популяции клеток по аспекту 88 или 89.

Аспект 97. Способ по аспекту 96, отличающийся тем, что заболевание или патологическое состояние включает опухоль, происходящую из злокачественного новообразования, включающего рак молочной железы, рак головы и шеи, рак матки, рак головного мозга, рак кожи, рак почки, рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак глаза, рак желудка (гастральный рак), рак желудочно-кишечного тракта, рак яичников, карциному, саркому, лейкоз, лимфому, миелому или их комбинацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

На Фиг. 1А показаны специфические маркеры клеточной поверхности и факторы транскрипции для анализа методом FACS, которые точно определяют «подобные стволовым клеткам» клетки, например, Т-клетки. На Фиг. 1В представлена иллюстрация процесса протекания дифференцировки иллюстративных клеток, например Т-клеток,

аннотированных различными фенотипическими характеристиками и профилями экспрессии биомаркеров.

На Фиг. 2А-2F представлены графики рассеяния, демонстрирующие относительную популяцию подобных стволовым клеткам (Фиг. 2А-2С) и относительный выход (Фиг. 2D-2F) при различных концентрациях калия, при этом среда имеет тоничность 250 мОсморь (Фиг. 2А и 2D), 280 мОсморь (Фиг. 2В и 2Е) или 320 мОсморь (Фиг. 2С и 2F) (кружки: 50 мМ ионов калия; квадраты: 60 мМ ионов калия; треугольники: 70 мМ ионов калия; перевернутые треугольники: 80 мМ ионов калия; ромбы: 90 мМ ионов калия; незакрашенные кружки: контроль). На Фиг. 2G представлен линейный график, демонстрирующий относительные популяции клеток, подобных стволовым, после культивирования в контрольной среде или гипотонической среде с тоничностью 250 мОсморь. Тоничность среды рассчитывали на основе концентраций калия и NaCl, как показано в таблице 2.

На Фиг. 3А-3G показано влияние культивирования Т-клеток с повышенным содержанием калия в гипотонических условиях культивирования. На Фиг. 3А показана схема культивирования Т-клеток, соответствующая некоторым описанным в данном документе аспектам. На Фиг. 3В показан анализ методом FACS экспрессии CD45RA и CCR7 в различных условиях культивирования. На Фиг. 3С показан анализ методом FACS экспрессии CD45RA и CD62L в различных условиях культивирования. На Фиг. 3D показан анализ методом FACS экспрессии маркера CD27 и CCR7⁺, ассоциированного с персистенцией Т-клеток, в различных условиях культивирования. На Фиг. 3Е показан анализ методом FACS экспрессии TCF7 и CD39 в различных условиях культивирования. На Фиг. 3F показан анализ методом FACS экспрессии TCF7 и CD3. На Фиг. 3G показан процент TCF7⁺ клеток из контрольной и гипотонической модифицированной среды с условиями культивирования с повышенным содержанием калия.

На Фиг. 4А-4В показаны выход и жизнеспособность Т-клеток во время экспансии *in vitro*. На Фиг. 4А показано кратное увеличение (10⁶) Т-клеток, культивируемых в контрольной среде и модифицированной (гипотонической) среде, т.е. в среде, имеющей повышенное количество калия и NaCl таким образом, что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 мМ. На Фиг. 4В показана жизнеспособность Т-клеток, культивируемых в контрольной среде и модифицированной (гипотонической) среде, т.е. в среде, имеющей повышенное содержание калия и NaCl, так что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 мМ.

Фиг. 5А-5В показаны обогащенные гипотонической кондиционирующей средой «подобные стволовым клеткам» Т-клетки. На Фиг. 5А показан анализ методом FACS маркеров клеток, «подобных стволовым», из CD4 и CD8 Т-клеток, культивируемых в контрольной среде. На Фиг. 5В показан анализ методом FACS маркеров клеток, «подобных стволовым», из CD4 и CD8 Т-клеток, культивируемых в модифицированной (гипотонической) среде, т.е. в среде, имеющей повышенное содержание калия и NaCl, так что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 мМ.

На Фиг. 6 показано влияние модифицированных сред на эффективность трансдукции. Модифицированные (гипотонические) среды имеют повышенное содержание калия и NaCl, так что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 мМ.

На Фиг. 7 показано влияние повышенного содержания калия в модифицированной среде на популяции T_{SCM}.

На Фиг. 8А-8С показано влияние повышенного содержания калия на проявление эффекторных функций эффекторных функций популяций T_{SCM}. На Фиг. 8А показаны графики FACS, показывающие увеличение экспрессии IL-2 в CCR7⁺ и снижение IFN- γ в CD4 Т-клетках со сконструированным CD19-CAR. На Фиг. 8В показаны графики FACS, показывающие увеличение экспрессии IL-2 в CCR7⁺ и снижение IFN- γ в CD8 Т-клетках со сконструированным CD19-CAR. На Фиг. 8С показана количественная оценка экспрессии IL-2 и IFN- γ в контроле и при повышенном уровне калия в гипотонических условиях культивирования.

На Фиг. 9А-9В показано влияние цитокинов на популяции T_{SCM} в контроле (левые панели) или в модифицированной (гипотонической) среде (правые панели) с повышенным содержанием калия и гипотоническими условиями культивирования. На Фиг. 9А показан эффект комбинации IL-2, IL-7, и IL-15. На Фиг. 9В показан эффект комбинации IL-7 и IL-21.

На Фиг. 10А-10В показано количество клеток T_{SCM} в продуктах со сконструированным CAR, культивируемых в контроле и с повышенным содержанием калия в гипотонических условиях культивирования в модифицированной (гипотонической) среде, содержащей комбинации повышенного содержания калия и цитокинов. На Фиг. 10А показано количество клеток T_{SCM} в продуктах со сконструированным CAR от донора 1. Слева направо клетки культивировали с IL-2, IL-7 и IL-15; IL-2 (10 нг/мл); IL-2 и IL-21 (1 нг/мл); IL-7 и IL-21 (1 нг/мл); IL-15 и IL-21 (1 нг/мл); калий и IL-2, IL-7 и IL-15; калий и IL-2 (10 нг/мл); калий и IL-2 и IL-21 (1 нг/мл); калий и IL-7 и IL-21 (1 нг/мл); калий и IL-15 и IL-21 (1 нг/мл). На Фиг. 10В показано количество клеток T_{SCM} в продуктах со сконструированным CAR от донора 1. Слева направо клетки культивировали с IL-2, IL-7 и IL-15; IL-2 (10 нг/мл); IL-2 и IL-21 (1 нг/мл); IL-7 и IL-21 (1 нг/мл); IL-15 и IL-21 (1 нг/мл); калий и IL-2, IL-7 и IL-15; калий и IL-2 (10 нг/мл); калий и IL-2 и IL-21 (1 нг/мл); калий и IL-7 и IL-21 (1 нг/мл); калий и IL-15 и IL-21 (1 нг/мл).

На Фиг. 11 представлена гистограмма процента клеток, экспрессирующих IL-2 и/или IFN γ , как указано, иллюстрирующая статус дифференцировки Т-клеток с химерным антигенным рецептором к ROR1 (CAR), культивируемых в контрольной среде или в гипотонической среде (т.е. модифицированной среде, имеющей повышенное количество калия и NaCl так, что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 мМ).

На Фиг. 12 представлено графическое представление данных последовательного уничтожения для Т-клеток с CAR к ROR1, совместно культивируемых в контрольной

среде («CAR к ROR1») или в модифицированной гипотонической среде, имеющей повышенное количество калия и NaCl, так что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 mM.

На Фиг. 13A-13B представлены гистограммы, иллюстрирующие секрецию IL-2 (Фиг. 13A) и секрецию IFN γ (Фиг. 13B) для CAR-T-клеток, совместно культивируемых с клетками H1975 в контрольной среде или в среде с повышенным содержанием калия и NaCl, так что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 mM.

На Фиг. 14 представлен линейный график, демонстрирующий пролиферацию T-клеток с CAR к ROR1 при совместном культивировании с клетками-мишенями H1975 в контрольной среде («CAR к ROR1») и в средах с повышенным содержанием калия и NaCl, так что содержание ионов калия и NaCl в комбинации составляет менее 140 mM.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток, клеткам, полученным с помощью этих способов, и/или композициям или наборам для способов культивирования клеток. Способы культивирования клеток по настоящему изобретению способны повышать мультипотентность и/или плюрипотентность культивируемых клеток или повышать эффективность трансдукции, когда клетки трансдуцируют вектором. В некоторых аспектах способы культивирования способны уменьшать и/или предотвращать истощение клеток, когда клетки культивируют и/или клетки используют в терапии *in vivo*. В некоторых аспектах способы культивирования также способны повышать жизнеспособность *in vivo*, устойчивость *in vivo*, эффекторную функцию *in vivo* или любую их комбинацию. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток, включающим помещение клеток в среду, содержащую калий в концентрации по меньшей мере около 5 mM (например, выше 5 mM), при этом среда не является гипертонической, например, является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток, включающим помещение клеток в среду, содержащую калий в концентрации выше 40 mM, например, около 50 mM-80 mM. В некоторых аспектах клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых аспектах иммунные клетки включают T-клетки, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), естественные клетки-киллеры (NK), регуляторные T-клетки (T_{reg}) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах клетки представляют собой мультипотентные клетки. В некоторых аспектах клетки представляют собой плюрипотентные клетки. В некоторых аспектах плюрипотентные клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или эмбриональные стволовые клетки. В некоторых аспектах клетки представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения выхода иммунных клеток и/или стволовых клеток человека во время культивирования их

vivo или *in vitro* при одновременном повышении стволовости иммунных клеток и/или стволовых клеток человека, включающему культивирование иммунных клеток человека и/или стволовых клеток в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, где общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения популяции иммунных клеток и/или стволовых клеток человека для иммунотерапии, включающему культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения стволовости иммунных клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* для иммунотерапии, включающему культивирование иммунных клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. В некоторых аспектах иммунные клетки человека представляют собой Т-клетки.

В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит интерлейкин (IL)-2, IL-21, IL-7, IL-15 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах среда содержит IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых аспектах среда содержит IL-2 и IL-21. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ионы натрия, ионы кальция, глюкозу или любую их комбинацию.

Прежде чем настоящее изобретение будет описано более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными композициями или стадиями процессов, поскольку таковые, конечно, могут варьироваться. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных аспектов, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и особенности, которые могут быть легко отделены или объединены с особенностями любого из нескольких других аспектов без отклонения от объема или сущности настоящего изобретения. Любой изложенный способ можно выполнять в порядке изложения событий или в любом другом логически возможном порядке.

Заголовки, представленные в настоящем документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут быть определены со ссылкой на описание в целом. Также понятно, что использованная в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных аспектов, и не предназначена для ограничения объема изобретения.

I. Термины

Для того, чтобы данное описание было более понятным, сначала определены некоторые термины. Каждый из следующих терминов, используемых в настоящей заявке,

если иное прямо не предусмотрено в данном документе, имеет значение, изложенное ниже. Дополнительные определения приведены в тексте заявки.

В этом описании термины в форме единственного числа объекта относятся к одному или большему количеству объектов; например, подразумевается, что «химерный полипептид» представляет собой один или более химерных полипептидов. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Кроме того, «или» означает открытый перечень компонентов в перечне. Например, «где X содержит A или B» означает, что X включает A, X включает B, X включает A и B или X включает A или B и любые другие компоненты.

Кроме того, использование в настоящем документе союзов «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «A и/или B», предназначен для включения фраз «A и B», «A или B»; «A» (отдельно) и «B» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «A, B и/или C», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: A, B и C; A, B или C; A или C; A или B; B или C; A и C; A и B; B и C; A (отдельно); B (отдельно) и C (отдельно).

Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалисту общим словарем многих терминов, используемых в данном описании.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон.

Сокращения, используемые в данном документе, определены в настоящем описании. Различные аспекты настоящего изобретения более подробно описаны в следующих подразделах.

Термин «около» или «состоящий по существу из» относится к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретного значения или состава, как определено специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется или определяется, *т.е.*, ограничений системы измерения. Например, термин «около» или «состоящий по существу

из» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы термин «около» или «состоящий по существу из» может означать диапазон до 10%. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать в пределах порядка величины или в пределах 5-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения представлены конкретные значения или составы, если не указано иное, следует предполагать, что значение «около» или «состоящий по существу из» находится в пределах допустимого диапазона ошибок для этого конкретного значения или состава.

В контексте настоящего документа термин «примерно» применительно к одному или более значениям, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично указанному эталонному значению. В определенных аспектах термин «примерно» относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного эталонного значения, если иное не указано или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

Как описано в данном документе любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одна десятая и одна сотая часть целого числа), если не указано иное.

Используемый в данном документе термин «плюрипотентная клетка» относится к самовоспроизводящейся клетке, которая способна дифференцироваться в клетки любого типа, например, в организме человека.

Используемый в данном документе термин «мультипотентная клетка» относится к самовоспроизводящейся клетке, которая способна дифференцироваться более чем в одну дифференцированную клетку-потомка.

Используемый в данном документе термин «иммунная клетка» относится к клетке иммунной системы. В некоторых аспектах иммунная клетка выбрана из Т-лимфоцита («Т-клетки»), В-лимфоцита («В-клетки»), естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила). Используемый в данном документе термин «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» взаимозаменяемы и относятся к любым лимфоцитам, продуцируемым или процессируемыми вилочковой железой. Неограничивающие классы Т-клеток включают эффекторные Т-клетки и Th-клетки (такие как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки). В некоторых аспектах иммунная клетка представляет собой клетку Th1. В некоторых аспектах иммунная клетка представляет собой клетку Th2. В некоторых аспектах иммунная клетка представляет собой клетку Tc17. В некоторых аспектах иммунная клетка представляет собой клетку Th17. В некоторых аспектах иммунная клетка представляет собой опухоль-инфильтрирующую клетку (TIL). В некоторых аспектах иммунная клетка представляет собой клетку T_{reg}.

Используемый в данном документе термин «Т-клетки памяти» относится к Т-

клеткам, которые ранее сталкивались с когнатным им антигеном и реагировали на него (например, *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*) или которые были стимулированы, например, антителом к CD3 (например, *in vitro* или *ex vivo*). Иммунные клетки, имеющие фенотип «подобный фенотипу клеток памяти» при вторичном воздействии, такие Т-клетки памяти могут размножаться, вызывая более быстрый и сильный иммунный ответ, чем при первичном воздействии. В некоторых аспектах Т-клетки памяти включают Т-клетки центральной памяти (клетки T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (клетки T_{EM}), тканевые резидентные Т-клетки памяти (клетки T_{RM}), Т-клетки памяти, подобные стволовым, (клетки T_{SCM}) или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин «подобные стволовым клеткам Т-клетки памяти», «Т-клетки памяти» или «клетки T_{SCM}» относится к Т-клеткам памяти, которые экспрессируют CD95, CD45RA, CCR7 и CD62L и наделены подобной стволовым клеткам способностью к самообновлению и мультипотентным потенциалом восстанавливать весь спектр субпопуляций эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти.

Используемый в данном документе термин «Т-клетки центральной памяти» или «клетки T_{CM}» относится к Т-клеткам памяти, которые экспрессируют CD45RO, CCR7 и CD62L. Т-клетки центральной памяти обычно находятся в лимфатических узлах и в периферических отделах системы кровообращения.

Используемый в данном документе термин «Т-клетки эффекторной памяти» или «клетки T_{EM}» относится к Т-клеткам памяти, которые экспрессируют CD45RO, но не экспрессируют CCR7 и CD62L. Поскольку в Т-клетках эффекторной памяти отсутствуют рецепторы для хоминга в лимфоузел (например, CCR7 и CD62L), эти клетки, как правило, обнаруживаются в периферических отделах системы кровообращения и в нелимфоидных тканях.

Используемый в данном документе термин «тканевые резидентные Т-клетки памяти» или «клетки T_{RM}» относится к Т-клеткам памяти, которые не циркулируют и остаются резидентными в периферических тканях, таких как кожа, легкие и желудочно-кишечный тракт. В определенных аспектах тканевые резидентные Т-клетки памяти также являются эффекторными Т-клетками памяти.

Используемый в данном документе термин «наивные Т-клетки» или «клетки T_N» относится к Т-клеткам, которые экспрессируют CD45RA, CCR7 и CD62L, но не экспрессируют CD95. Клетки T_N представляют собой наиболее недифференцированные клетки в линии дифференцировки Т-клеток. Взаимодействие между клеткой T_N и антигенпрезентирующей клеткой (APC) вызывает дифференцировку клетки T_N в сторону активированной клетки T_{EFF} и иммунный ответ.

Термин «культивирование», используемый в данном документе, относится к контролируемому росту клеток *ex vivo* и/или *in vitro*. Используемый в данном документе термин «культивирование» включает рост клеток, например, Т-клеток и/или NK-клеток, во время экспансии клеток или клеточной инженерии (например, трансдукции конструкцией для экспрессии CAR, TCR или TCRm). В некоторых аспектах

культивируемые клетки получают от субъекта, например, человека. В некоторых аспектах культивируемые клетки содержат Т-клетки или НК-клетки, полученные от человека. В некоторых аспектах Т-клетки и/или НК-клетки очищают перед культивированием. В некоторых аспектах Т-клетки и/или НК-клетки представляют собой опухоль-инфильтрирующие Т-клетки и/или НК-клетки. В некоторых аспектах культивирование клеток предназначено для увеличения количества культивируемых клеток, например, для повышения пролиферации клеток.

Используемый в данном документе термин «клеточная инженерия» относится к направленной модификации клетки, например, плюрипотентной клетки, мультипотентной клетки или иммунной клетки, описанной в данном документе. В некоторых аспектах клеточная инженерия включает вирусную генную инженерию, невирусную генную инженерию, введение рецепторов, позволяющих нацеливать на опухоль (например, TCR, TCRm и/или CAR), введение одного или более эндогенных генов, которые улучшение функции Т-клеток, введение одного или более синтетических генов, улучшающих функцию Т-клеток, или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин «стволовость», «подобный стволовой клетке», «подобный стволовым клеткам» или «менее дифференцированный» относится к клетке, например, плюрипотентной клетке, мультипотентной клетке или иммунной клетке (например, Т-клетке, НК-клетке или TIL), которые экспрессируют маркеры, соответствующие фенотипу находящихся на более раннем этапе развития клеток. Например, менее дифференцированная Т-клетка может экспрессировать один или более маркеров, характерных для клеток T_N или T_{SCM} . В некоторых аспектах «менее дифференцированная» или «подобная стволовой» Т-клетка экспрессирует CD45RA, CCR7 и CD62L и не экспрессирует CD45RO. В некоторых аспектах способы, описанные в данном документе, стимулируют клетки, например, плюрипотентную клетку, мультипотентную клетку или иммунную клетку (например, Т-клетку, НК-клетку или TIL), имеющие фенотип менее дифференцированных клеток. Не ограничиваясь каким-либо конкретным механизмом, в некоторых аспектах описанные в данном документе способы блокируют, ингибируют или ограничивают дифференцировку менее дифференцированных клеток, например, плюрипотентной клетки, мультипотентной клетки или иммунной клетки (например, Т-клетки, НК-клетки или TIL), что приводит к увеличению количества клеток, подобных стволовым, в культуре. Например, как правило, считается, что для эффективного контроля над опухолями предпочтительным является адоптивный перенос менее дифференцированных иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL, с фенотипом памяти клеток, подобных стволовым, или центральной памяти. См. Lynn, R.C., et al., *Nature* 576(7786): 293-300 (2019); и Gattinoni, L., et al., *Nat Med* 17(10): 1290-1297 (2011).

Стволовость характеризуется способностью к самообновлению, мультипотентностью и сохранением пролиферативного потенциала. В некоторых аспектах стволовость характеризуется определенной генной сигнатурой, например,

комбинированным профилем экспрессии множества генов. В некоторых аспектах генная сигнатура включает один или более генов, выбранных из ACTN1, DSC1, TSHZ2, MYB, LEF1, TIMD4, MAL, KRT73, SESN3, CDCA7L, LOC283174, TCF7, SLC16A10, LASS6, UBE2E2, IL7R, GCNT4, TAF4B, SULT1B1, SELP, KRT72, STXBP1, TCEA3, FCGBP, CXCR5, GPA33, NELL2, APBA2, SELL, VIPR1, FAM153B, PPFIBP2, FCER1G, GJB6, OCM2, GCET2, LRRN1, IL6ST, LRRC16A, IGSF9B, EFHA2, LOC129293, APP, PKIA, ZC3H12D, CHMP7, KIAA0748, SLC22A17, FLJ13197, NRCAM, C5orf13, GIPC3, WNT7A, FAM117B, BEND5, LGMN, FAM63A, FAM153B, ARHGEF11, RBM11, RIC3, LDLRAP1, PELI1, PTK2, KCTD12, LMO7, CEP68, SDK2, MCOLN3, ZNF238, EDAR, FAM153C, FAAH2, BCL9, C17orf48, MAP1D, ZSWIM1, SORBS3, IL4R, SERPINF1, C16orf45, SPTBN1, KCNQ1, LDHB, BZW2, NBEA, GAL3ST4, CRT3, MAP3K1, HLA-DOA, RAB43, SGTB, CNN3, CWH43, KLHL3, PIM2, RGMB, C16orf74, AEBP1, SNORD115-11, SNORD115-11, GRAP, и любой их комбинации (см., например, Gattinoni (2011)). В некоторых аспектах генная сигнатура включает один или более генов, выбранных из NOG, TIMD4, MYB, UBE2E2, FCER1G, HAVCR1, FCGBP, PPFIBP2, TPST1, ACTN1, IGF1R, KRT72, SLC16A10, GJB6, LRRN1, PRAGMIN, GIPC3, FLNB, ARRB1, SLC7A8, NUCB2, LRRC7, MYO15B, MAL, AEBP1, SDK2, BZW2, GAL3ST4, PITPNM2, ZNF496, FAM117B, C16orf74, TDRD6, TSPAN32, C18orf22, C3orf44, LOC129293, ZC3H12D, MLXIP, C7orf10, STXBP1, KCNQ1, FLJ13197, LDLRAP1, RAB43, RIN3, SLC22A17, AGBL3, TCEA3, NCRNA00185, FAM153B, FAM153C, VIPR1, MMP19, HBS1L, EEF2K, SNORA5C, UBASH3A, FLJ43390, RP6-213H19.1, INPP5A, PIM2, TNFRSF10D, SNRK, LOC100128288, PIGV, LOC100129858, SPTBN1, PROS1, MMP28, HES1, CACHD1, NSUN5C, LEF1, TTTY14, SNORA54, HSF2, C16orf67, NSUN5B, KIAA1257, NRG2, CAD, TARBP1, STRADB, MT1F, TMEM41B, PDHX, KDM6B, LOC100288322, UXS1, LGMN, NANOS2, PYGB, RASGRP2, C14orf80, XPO6, SLC24A6, FAM113A, MRM1, FBXW8, NDUFS2, KCTD12, и любой их комбинации (см., например, Gattinoni, L., et al., Nat Med 17(10): 1290-1297 (2011)).

При длительном воздействии антигена, например, при многих злокачественных новообразованиях, более дифференцированные иммунные клетки, например, эффекторные Т-клетки и Т-клетки эффекторной памяти, часто истощаются и теряют свою противоопухолевую функцию. Биомаркеры, например, маркеры Т-клеток, могут быть измерены с помощью любых способов. В некоторых аспектах Т-клетки идентифицируют с помощью окрашивания антителами с последующей проточной цитометрией с гейтированием.

Используемый в данном документе термин «тоничность» относится к измерению эффективного градиента осмотического давления на клеточной мембране. Тоничность можно выразить через осмоляльность раствора, например, среды. Используемый в данном документе раствор, например, среда, считается «изотоническим», когда концентрация растворенных веществ в среде эквивалентна концентрации растворенных веществ внутри клетки. Используемая в данном документе изотоническая среда имеет осмоляльность

около 280 мОсм/л. Используемый в данном документе раствор, например, среда, считается «гипотоническим», если концентрация растворенных веществ в растворе ниже, чем концентрация растворенных веществ в клетке. Используемый в данном документе гипотонический раствор имеет тоничность менее 280 мОсм/л. В некоторых аспектах гипотоническая среда имеет тоничность от по меньшей мере около 220 мОсм/л до менее около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах гипотоническая среда имеет тоничность от по меньшей мере около 230 мОсм/л до менее около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах гипотоническая среда имеет тоничность от по меньшей мере около 240 мОсм/л до менее около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах описанная в данном документе гипотоническая среда имеет тоничность около 250 мОсм/л. Используемый в данном документе раствор, например среда, считается «гипертоническим», если концентрация растворенных веществ в растворе выше, чем концентрация растворенных веществ в клетке. Используемый в данном документе термин «гипертонический раствор» имеет осмоляльность более 300 мОсм/л. В некоторых аспектах описанная в данном документе гипертоническая среда имеет осмоляльность около 320 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность раствора, например, среды, регулируют путем увеличения или уменьшения концентрации одного или более растворенных веществ, выбранных из ионов калия, ионов натрия, глюкозы и любой их комбинации. В некоторых аспектах тоничность раствора, например, среды, регулируют путем увеличения или уменьшения концентрации ионов калия и NaCl. В некоторых аспектах тоничность среды можно поддерживать, компенсируя увеличение содержания одного растворенного вещества уменьшением содержания второго растворенного вещества. Например, повышение концентрации ионов калия в среде без изменения концентрации ионов натрия может увеличить тоничность среды. Однако, если увеличить концентрацию ионов калия и уменьшить концентрацию ионов натрия, можно сохранить тоничность исходной среды. В контексте данного документа тоничность среды определяется суммой концентрации калия и концентрации NaCl, умноженной на два. См., например, таблицу 2.

В контексте данного документа термины «калий», «ионы калия», «катионы калия» и «K⁺» используются взаимозаменяемо для обозначения элементарного калия. Элементарный калий существует в растворе в виде положительного иона. Однако специалисту в данной области техники будет очевидно, что стандартные способы приготовления раствора, содержащего ионы калия, включают разбавление калий-содержащей соли (например, KCl) в растворе. Таким образом, раствор, например, среда, имеющая молярную (M) концентрацию ионов калия, может быть описана как имеющая равную молярную (M) концентрацию соли, содержащей калий.

В контексте данного документа термин «базовая» среда относится к любой исходной среде, в которую добавлен один или более дополнительных элементов, описанных в данном документе, например, калий, натрий, кальций, глюкоза, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 и любую их комбинацию. Базовой средой может быть любая среда для культивирования иммунных клеток, например, Т-клеток. В некоторых аспектах базовая

среда выбрана из сбалансированного солевого раствора (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS), модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), основной среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной питательной среды Глазго (GMEM), альфа-минимальной питательной среды (альфа-MEM), среды Дульбекко в модификации Искова (IMDM), M199, основной среды для экспансии Т-клеток OPTIMIZER™ CTS™ (ThermoFisher), OPTIMIZER™ Complete, IMMUNOCULT™ XF (STEMCELL™ Technologies), IMMUNOCULT™ XF, среды AIM V, TEXMACS™ и любой их комбинации. В некоторых аспектах базовая среда включает PRIME-XV T cell CDM. В некоторых аспектах базовая среда включает OPTIMIZER™. В некоторых аспектах базовая среда включает OPTIMIZER™ Pro. В некоторых аспектах базовая среда включает X-VIVO™ 15 (LONZA). В некоторых аспектах базовая среда включает IMMUNOCULT™. В некоторых аспектах базовая среда включает среду Клика. В некоторых аспектах базовая среда включает среду для экспансии TIL TRANSACT™. В некоторых аспектах базовая среда включает среду для быстрой экспансии TIL. В некоторых аспектах базовая среда не содержит сыворотку. В некоторых аспектах базовая среда дополнительно включает заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR). Например, в некоторых аспектах базовая среда включает OPTIMIZER™ Complete с добавлением ICSR, AIM V с добавлением ICSR, IMMUNOCULT™ XF с добавлением ICSR, RPMI с добавлением ICSR, TEXMACS™ с добавлением ICSR или любую их комбинацию. В некоторых аспектах подходящие базовые среды включают среду Клика, среду OpTimizer® (CTS®), среду для экспансии Т-клеток Stemline® (Sigma-Aldrich), среду AIM V® (CTS®), среду TexMACS® (Miltenyi Biotech), среду ImmunoCult® (Stem Cell Technologies), PRIME-XV® T-Cell Expansion XSFМ (Irvine Scientific), среду Искова и/или среду RPMI-1640. В некоторых аспектах базовая среда включает CTS™ OpTimizer™, не содержащую NaCl. В некоторых аспектах базовая среда содержит одну или более солей натрия в дополнение к NaCl, которую добавляют для контроля тоничности, например, NaCl добавляют в сочетании с ионами калия.

Используемый в данном документе термин «цитокин» относится к небольшим секретлируемым белкам, высвобождаемым клетками, которые оказывают специфическое влияние на взаимодействия и связи между клетками. Неограничивающие примеры цитокинов включают интерлейкины (например, интерлейкин (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, IL-21 и IL-23), интерфероны (IFN; например, IFN-α, IFN-β и IFN-γ), члены семейства факторов некроза опухоли (TNF) и члены семейства трансформирующего фактора роста (TGF). Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, Т-клеток и/или НК-клеток, в среде, содержащей цитокин. В некоторых аспектах цитокин представляет собой интерлейкин. В некоторых аспектах цитокин выбран из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 и любой их комбинации. IL-2 (UniProtKB - P60568) продуцируется Т-клетками в ответ на антигенную или митогенную стимуляцию. Известно, что IL-2 стимулирует пролиферацию Т-клеток и другие активности, имеющие

решающее значение для регуляции иммунного ответа. IL-7 (UniProtKB - P13232) представляет собой гемопоэтический фактор роста, способный стимулировать пролиферацию лимфоидных предшественников. Считается, что IL-7 играет роль в пролиферации на определенных стадиях созревания В-клеток. IL-15 (UniProtKB - P40933), как и IL-2, является цитокином, стимулирующим пролиферацию Т-лимфоцитов. IL-21 (UniProtKB - Q9HBE4) представляет собой цитокин с иммунорегуляторной активностью. Считается, что IL-21 способствует переходу от врожденного к адаптивному иммунитету и индуцирует продукцию IgG1 и IgG3 в В-клетках. IL-21 может также играть роль в пролиферации и созревании естественных клеток-киллеров (NK) в синергии с IL-15, а IL-21 может регулировать пролиферацию зрелых В- и Т-клеток в ответ на активирующие стимулы. В синергии с IL-15 и IL-18 IL-15 также стимулирует выработку гамма-интерферона в Т-клетках и NK-клетках, а IL-21 может также ингибировать активацию и созревание дендритных клеток во время опосредованного Т-клетками иммунного ответа.

Используемый в данном документе термин «выше, чем» означает больше, но не равно. Например, «выше 4 мМ» означает любое количество, превышающее 4 мМ, но не включающее 4 мМ.

В контексте данного документа термин «введение» относится к физическому введению терапевтического агента или композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки. Различные пути введения терапевтического агента, описанного в данном документе, (например, Т-клетки или NK-клетки, культивируемые, как описано в данном документе), включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии.

В контексте данного документа выражение «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, интратрахеальную, легочную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутрижелудочковую, интравитреальную, эпидуральную и интраспинальную инъекцию и инфузию, а также с использованием электропорации *in vivo*.

Альтернативно, терапевтический агент, описанный в данном документе (например, Т-клетка или NK-клетка, культивируемая, как описано в настоящем документе), можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или большего количества продолжительных периодов.

Используемый в данном документе термин «антиген» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или

гаптен. В контексте данного документа термин «когнатный антиген» относится к антигену, который распознает иммунная клетка (например, Т-клетка) и тем самым индуцирует активацию иммунной клетки (например, запуская внутриклеточные сигналы, которые индуцируют эффекторные функции, такие как выработка цитокинов, и/или пролиферацию клетки).

Термин «злокачественное новообразование» относится к широкой группе разных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом патологических клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные части тела по лимфатической системе или кровотоку. Используемый в данном документе термин «злокачественное новообразование» относится к первичному, метастатическому и рецидивирующему злокачественному новообразованию.

Термин «гематологическое злокачественное новообразование» или «гематологический рак» относится к злокачественным новообразованиям и опухолям кроветворной и лимфоидной тканей у млекопитающих. Неограничивающие примеры гематологических злокачественных новообразований включают опухоли, поражающие ткани крови, костный мозг, лимфатические узлы и лимфатическую систему, включая острый лимфобластный лейкоз (ALL), хроническую лимфоцитарную лимфому (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический миелогенный лейкоз (CIVIL), острый моноцитарный лейкоз (AMoL), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Гематологические злокачественные новообразования также называют «гемобластозами». Злокачественные новообразование в виде гемобластозов включают, но не ограничиваются ими, лейкемии, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные новообразования.

«Солидная опухоль», как используется в данном документе, относится к аномальной массе ткани. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Неограничивающие примеры солидных опухолей включают саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Тканевая структура солидной опухоли включает взаимозависимые тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых диспергированы раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из рака коры надпочечников, распространенного рака, рака анального канала, апластической анемии, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, метастазов в кости, опухолей головного мозга, рака головного мозга, рака молочной железы, детского рака, рака неизвестной первичной локализации, болезни Кастлемана, рака шейки матки, рака толстой/прямой кишки, рака эндометрия, рака пищевода, опухоли семейства Юинга, рака глаза, рака желчного пузыря, карциноидных опухолей желудочно-кишечного тракта,

стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта, гестационной трофобластической болезни, болезни Ходжкина, саркомы Капоши, почечно-клеточной карциномы, рака гортани и гортаноглотки, острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфолейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза, рака печени, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, карциноидной опухоли легкого, лимфомы кожи, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, рака полости носа и околоносовых пазух, рака носоглотки, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака полости рта и ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака полового члена, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы мягких тканей у взрослых, базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи, меланомы, рака тонкой кишки, рака желудка, рака яичек, рака горла, рака тимуса, рака щитовидной железы, саркомы матки, рака влагалища, рака вульвы, макроглобулинемии Вальденстрема, опухоли Вильмса и вторичных злокачественных новообразований, вызванных лечением злокачественного новообразования. В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из хондросаркомы, фибросаркомы, лимфосаркомы, меланосаркомы, миксосаркомы, остеосаркомы, саркомы Абемети, инфильтрирующей липомы, липосаркомы, альвеолярной саркомы мягких тканей, амелобластосаркомы, ботриоидной саркомы, хлорлейкоза, хориокарциномы, эмбриональной саркомы, саркомы опухоли Вильмса, саркомы эндометрия, стромальной саркомы, саркомы Юинга, фасциальной саркомы, фибробластической саркомы, гигантоклеточной саркомы, гранулоцитарной саркомы, саркомы Ходжкина, идиопатической множественной геморрагической саркомы, иммунобластной саркомы В-клеток, лимфомы, иммунобластной саркомы Т-клеток, саркомы Дженсена, саркомы Капоши, саркомы Купфера, ангиосаркомы, лейкосаркомы, злокачественной мезенхимомы, паростальной саркомы, ретикулоцитарной саркомы, саркомы Руса, саркомы серозной кисты, синовиальной саркомы или телеангиэктальтической саркомы. В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из акральной ентигинозной меланомы, амеланотической меланомы, доброкачественной ювенильной меланомы, меланомы Клаудмана, меланомы S91, меланомы Хардинга-Пасси, ювенильной меланомы, меланомы типа злокачественного лентиго, злокачественной меланомы, метастатической меланомы, узловой меланомы, подногтевой меланомы или поверхностной распространяющейся меланомы. В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из ацинарной аденокарциномы, аденокарциномы, аденокистозной карциномы, аденоидо-кистозной карциномы, аденоматозной карциномы, карциномы коры надпочечника, авеолярной карциномы, аденоматоза легкого, базальноклеточной карциномы, базально-клеточной карциномы, базалоидной карциномы, базоспиноцеллюлярной карциномы, бронхоальвеолярной карциномы, бронхиолярной карциномы, бронхогенной карциномы, мозговидной карциномы, холангиоцеллюлярного

рака, хориокарциномы, перстневидно-клеточного рака, комедонной карциномы, карциномы тела, решетчатой карциномы, распространенной карциномы плевры, рака кожи, цилиндрической карциномы, протоковой карциномы, карциномы из эпителия протоков, твердой карциномы, эмбрионального рака, медуллярной карциномы, эпидермоидной карциномы, карциномы эпителия аденоидов, экзофитной карциномы, рака из язвы, фиброзной карциномы, слизеподобной карциномы, слизеобразующего рака, гигантоклеточной карциномы, карциномы из гигантских клеток, ацинарной аденокарциномы, гранулезоклеточной опухоли, базально-клеточного рака, гематоидной карциномы, злокачественной карциномы, аденомы из клеток Гюртле, гиалоидной карциномы, гипернефроидной карциномы, детской тератокарциномы, внутриэпителиального рака, внутриэпидермальной карциномы, внутриэпителиального рака, карциномы Кромпечера, карциномы из клеток Кульчицкого, крупноклеточного рака, чечевицеобразной карциномы, хрусталиковой карциномы, липоматозной карциномы, лобулярной карциномы, лимфоэпителиальной карциномы, медуллярной карциномы, костномозговой карциномы, меланотической карциномы, карциномы неба, слизеобразующего рака, слизеобразующей карциномы, карциномы слизистой, слизеобразующего плоскоклеточного рака, карциномы слизистой, карциномы слизистой, миксоматозной карциномы, носоглоточной карциномы, овсяно-клеточного рака, оссифицирующей карциномы, остеоидной карциномы, папиллярной карциномы, околопортальной карциномы, преинвазивного рака, карциномы из щипцовых клеток, флегмонозной карциномы, светлоклеточного рака почки, карциномы из резервных клеток, саркомоподобного рака, карциномы слизистой носа, фиброкарциномы, карциномы мошонки, слизистого рака, недифференцированного рака, мелкоклеточного рака, соленоидной карциномы, рака из сферических клеток, псевдосаркомы, губчатого рака, плоскоклеточной карциномы, плоскоклеточного рака, нитевидной карциномы, карциномы гемангиомы, карциномы из гладких мышечных волокон и сосудистой ткани, переходноклеточного рака, бугристой карциномы, тубулярного рака, туберозной карциномы, бородавчатого рака или ворсинчатой карциномы. В некоторых аспектах злокачественное новообразование выбрано из лейкоза, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, множественной миеломы, нейробластомы, рака молочной железы, рака яичников, рака легкого, рабдомиосаркомы, первичного тромбоцитоза, первичной макроглобулинемии, мелкоклеточных опухолей легких, первичных опухолей головного мозга, рака желудка, рака толстой кишки, злокачественной инсулиномы поджелудочной железы, злокачественного карциноида, рака мочевого пузыря, предраковых поражений кожи, рака яичка, лимфомы, рака щитовидной железы, папиллярного рак щитовидной железы, нейробластомы, нейроэндокринного рака, рака пищевода, рака мочеполового тракта, злокачественной гиперкальциемии, рака шейки матки, рака эндометрия, рака коры надпочечников, рака предстательной железы, рака Мюллера, рака яичников, рака брюшины, рака маточной трубы или папиллярно-серозной карциномы матки.

Используемый в данном документе термин «иммунный ответ» относится к

биологическому ответу внутри позвоночного против чужеродных агентов, который защищает организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредован действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и систему комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из тела позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки или клетки Th, такой как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетка, или ингибирование клетки Treg. В контексте данного документа термины «Т-клетка» и «Т-лимфоциты» взаимозаменяемы и относятся к любым лимфоцитам, продуцируемым или процессируемым вилочковой железой. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой CD4⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой NKT-клетку.

Используемый в данном документе термин «противоопухолевый иммунный ответ» относится к иммунному ответу против опухолевого антигена.

«Субъект» включает любого человека или отличное от человека животное. Термин «отличное от человека животное» включает, но не ограничивается ими, позвоночных, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека. Термины «субъект» и «пациент» применяются в данном документе взаимозаменяемо. В контексте данного документа фраза «субъект, нуждающийся в этом» включает субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которым было бы полезно, например, введение Т-клеток, культивируемых, как описано в данном документе, для контроля роста опухоли.

Термин «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» относится к количеству агента (например, Т-клеток или NK-клеток, культивируемых, как описано в данном документе), которое обеспечивает желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этим результатом может быть снижение, уменьшение интенсивности, временное облегчение, уменьшение, отсрочка и/или облегчение одного или более проявлений, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение биологической системы. Что касается солидных опухолей, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы заставить опухоль уменьшиться и/или снизить скорость роста опухоли (например, подавить рост опухоли), или предотвратить или отсрочить другую нежелательную пролиферацию клеток. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития опухоли. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, достаточное для

предотвращения или задержки рецидива опухоли. Эффективное количество можно вводить за одно или более введений.

Эффективное количество композиции (например, клеток, культивируемых, как описано в данном документе) может, например, (i) снижать количество раковых клеток; (ii) уменьшить размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, в некоторой степени замедлять и может останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и может останавливать метастазирование опухоли); (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвратить или отсрочить возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных со злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество композиции, описанной в данном документе (например, Т-клеток, культивируемых, как описано в данном документе), которое, как клинически доказано, оказывает значительное уменьшение злокачественного новообразования или замедление прогрессирования (регрессии) злокачественного новообразования, например, распространенной солидной опухоли. Способность терапевтического агента по настоящему изобретению (например, Т-клеток, культивируемых, как описано в данном документе) способствовать регрессии заболевания можно оценить с использованием различных способов, известных квалифицированному практикующему врачу, например, у субъектов-людей во время клинических исследований, в системах животных моделей, прогнозирующих эффективность применения у людей, или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

Термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности композиции, описанной в данном документе (например, клеток, культивируемых, как описано в данном документе), способствовать регрессии злокачественного новообразования у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на уровне клеток, органов и/или организма (побочные эффекты), возникающим в результате введения композиции, описанной в данном документе, (например, клеток, культивируемых, как описано в данном документе).

В контексте данного документа термины «химерный антигенный рецептор» и «CAR» относятся к рекомбинантному слитому белку, который имеет антигенспецифический внеклеточный домен, связанный с внутриклеточным доменом, который направляет клетку на осуществление специализированной функции при связывании антигена с внеклеточным доменом. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор, описанный в данном документе, содержит химерный полипептид по настоящему изобретению.

Термины «искусственный Т-клеточный рецептор», «химерный Т-клеточный

рецептор» и «химерный иммунорецептор» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо с термином «химерный антигенный рецептор». Химерные антигенные рецепторы отличаются от других антигенсвязывающих агентов своей способностью как связывать МНС-независимый антиген, так и передавать сигналы активации через свой внутриклеточный домен.

Антигенспецифический внеклеточный домен химерного антигенного рецептора распознает и специфически связывает антиген, как правило, экспрессируемый на поверхности антиген злокачественного новообразования. Антигенспецифический внеклеточный домен специфически связывает антиген, когда, например, он связывает антиген с константой аффинности или аффинностью взаимодействия (K_D) от около 0,1 пМ до около 10 мкМ, например, от около 0,1 пМ до около 1 мкМ или около от 0,1 пМ до около 100 нМ. Способы определения аффинности взаимодействия известны в данной области техники. Антигенспецифический внеклеточный домен, пригодный для применения в CAR по настоящему изобретению, может представлять собой любой антигенсвязывающий полипептид, большое разнообразие которых известно в данной области техники. В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный Fv (scFv). Другие домены распознавания на основе антител, такие как VHH cAb (вариабельные домены антител верблюдовых) и их гуманизированные версии, VH IgNAR (вариабельные домены антител акул) и их гуманизированные версии, VH sdAb (вариабельные домены однодоменных антител) и вариабельные домены «верблюжьих» антител также подходят для применения в CAR по настоящему изобретению. В некоторых аспектах домены распознавания на основе Т-клеточного рецептора (TCR), такие как одноцепочечный TCR (scTv, т.е. одноцепочечный двухдоменный TCR, содержащий $V\alpha.V\beta$), также подходят для применения в TCR по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к гетеродимеру, состоящему из 2 различных трансмембранных полипептидных цепей: α -цепи и β -цепи, каждая из которых состоит из константной области, которая закрепляет цепь внутри мембраны Т-клеточной поверхности, и вариабельной области, которая распознает и связывается с антигеном, презентируемым МНС. Комплекс TCR связан с 6 полипептидами, образующими 2 гетеродимера, CD3 $\gamma\epsilon$ и CD3 $\delta\epsilon$, и 1 гомодимер CD3 ζ , которые вместе образуют комплекс CD3. В терапии на основе Т-клеток со сконструированными Т-клеточными рецепторами используется модификация Т-клеток, которая сохраняет эти комплексы для специфического нацеливания на антигены, экспрессируемые конкретными опухолевыми клетками. В контексте данного документа термин «TCR» включает природные TCR и сконструированные TCR.

В контексте данного документа термин «сконструированный TCR» или «сконструированный Т-клеточный рецептор» относится к Т-клеточному рецептору (TCR), сконструированному для специфического связывания с желаемой аффинностью с главным комплексом гистосовместимости (МНС)/пептидным антигеном-мишенью, который выбирается, клонируется и/или впоследствии вводится в популяцию иммунных

клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП.

«Имитатор TCR» или «TCRm» относится к типу антитела, которое распознает эпитопы, содержащие как пептид, так и молекулу МНС-I, аналогично распознаванию таких комплексов TCR на Т-клетках.

В контексте данного документа термины «μг» и «μМ» используются взаимозаменяемо с «мкг» и «мкМ», соответственно.

Различные аспекты, описанные в данном документе, более подробно описаны в следующих подразделах.

II. Способы осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к способам культивирования клеток *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых аспектах способы по настоящему изобретению включают культивирование или помещение клеток, например, плюрипотентной клетки, мультипотентной клетки или иммунной клетки (например, Т-клетки, НК-клетки или ТП) в условия культивирования, при этом культура (например, тоничность среды, цитокины и/или любая их комбинация) способна ограничивать или предотвращать дифференцировку клеток, тем самым влияя или улучшая их применение в клеточной терапии.

Среды для культивирования клеток пригодны для экспансии *in vitro* клеточных продуктов, используемых для экспансии и активации клеток для лечения различных заболеваний. Одной из самых неотложных неудовлетворенных потребностей является экспансия клеток, которые можно использовать в терапии, например, клеток, которые могут разрушать раковые клетки. Метастатические солидные опухоли являются причиной более 500000 смертей только в Соединенных Штатах Америки. Известно, что Т-лимфоциты способны убивать опухоли в условиях, когда другие доступные методы лечения неэффективны. Например, хирургия, химиотерапия, лучевая терапия и «таргетная» терапия или терапия синтетическими препаратами неэффективны для многих распространенных типов метастатических злокачественных новообразований, таких как рак толстой кишки, молочной железы, легкого, поджелудочной железы, предстательной железы, желчных протоков и других гистологических типах. Иммуноterapia рака на основе клеток может представлять собой курабельную терапию в этих гистологических типах.

Эффективность клеточной иммунотерапии зависит от персистенции, мультипотентности и асимметричного деления клеток *in vivo* (фенотипические характеристики стволовости Т-клеток). Среда, используемая при культивировании и/или конструировании терапевтических клеток, может сильно влиять на метаболические, эпигенетические и фенотипические свойства клеток. Используемые в настоящее время составы сред не претерпели значительных изменений примерно за 40 лет (см. Moore et al., JAMA 199(8): 519-24 (1967), которая полностью включена в данный документ путем ссылки)). Однако в данном документе надежные доклинические данные демонстрируют, что концентрация ионов, особенно калия (K⁺), питательных веществ и/или цитокинов

может значительно влиять на мультипотентность Т-клеток во время манипуляций *ex vivo*. Этот эффект является многофакторным и зависит от мишени терапевтических клеток, функции клеток в микроокружении опухоли и качества терапевтических клеток перед переносом. В данном документе описаны стратегии стимулирования противоопухолевых стволовых клеток, например, до адоптивного переноса.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), в среде, содержащей повышенную концентрацию ионов калия (например, более около 40 мМ, более около 45 мМ, более около 50 мМ, более около 55 мМ, более около 60 мМ, более около 65 мМ или более около 70 мМ) относительно стандартной культуральной среды для иммунных клеток. В некоторых аспектах среда с повышенным содержанием калия является гипотонической или изотонической.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения выхода иммунных клеток и/или стволовых клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* при одновременном повышении стволовости иммунных клеток и/или стволовых клеток человека, включающему культивирование иммунных клеток человека и /или стволовых клеток в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, где общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения популяции иммунных клеток и/или стволовых клеток человека для иммунотерапии, включающему культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения стволовости иммунных клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* для иммунотерапии, включающему культивирование иммунных клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ.

В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению включает помещение, выращивание или культивирование клеток, например, иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП, в среде, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 50 мМ. В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению включает помещение, выращивание или культивирование клеток, например, Т-клеток, в среде, содержащей ионы калия в концентрации выше около 40 мМ, при этом среда является гипотонической или изотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 50 мМ. В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению

включает помещение, выращивание или культивирование клеток, например, Т-клеток, в среде, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, при этом среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения популяции иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) или TCR, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП, включающему помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 50 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения популяции иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) или TCR, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП, включающему помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, при этом среда не является гипертонической, например, когда среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения популяции иммунных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) или TCR, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП, включающему помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ. В некоторых аспектах среда является гипотонической или изотонической. Среду можно приготовить, добавив достаточное количество соли калия. Тоничность среды можно изменить, контролируя концентрацию NaCl в среде относительно концентрации ионов калия. В некоторых аспектах общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах настоящее изобретение также предусматривает, что клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП), выращенные в среде с высокой концентрацией ионов калия (например, выше около 5 мМ, например, выше 40 мМ, например, между 55 мМ и 70 мМ), но являющейся изотонической или гипотонической, способны сохранять фенотип клеток, подобных стволовым, с минимальной дифференцировкой, чем клетки, выращенные в среде, которая является гипертонической. Таким образом, в некоторых аспектах среда не является гипертонической после добавления соли калия. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит интерлейкин (IL)-2, IL-21, IL-7, IL-15 или любую их комбинацию. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ионы натрия, ионы кальция, глюкозу или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах популяция клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), культивируемых с использованием способов, описанных в данном документе, демонстрирует повышенное количество клеток, подобных стволовым относительно популяции клеток, культивируемых с использованием стандартных способов, например, в среде, содержащей менее 5 мМ ионов калия, или в гипертонических условиях. В

некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП), демонстрируют повышенную экспрессию маркеров, характерных для клеток, подобных стволовым, по сравнению с исходной популяцией клеток. В некоторых аспектах исходная популяция клеток включает клетки, полученные от субъекта-человека. В некоторых аспектах исходная популяция клеток включает Т-клетки, полученные от субъекта-человека. В некоторых аспектах исходная популяция Т-клеток включает клетки T_N , клетки T_{SCM} , клетки T_{CM} , клетки T_{EM} или любую их комбинацию.

Повышенную мультипотентность клеток можно измерить с использованием любых способов, известных в данной области техники. В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют путем окрашивания антителами с последующей проточной цитометрией с гейтированием. В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют по аутофаговому потоку. В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют по поглощению глюкозы. В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют по поглощению жирных кислот. В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют по митохондриальной биомассе. В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют с помощью количественного определения/анализа экспрессии РНК (например, микроматричного анализа, количественной ПЦР (Taqman), РНК-секвенирования, секвенирования РНК одиночных клеток, или любых их комбинаций). В некоторых аспектах стволовость клеток измеряют с помощью анализа метаболизма (например, анализа метаболизма морского конька, анализа скорости закисления внеклеточной среды (ECAR), анализа скорости потребления кислорода (OCR), анализа запасной дыхательной способности и/или анализа трансмембранного потенциала митохондрий (TMRM)). В некоторых аспектах стволовость измеряют с использованием одного или более функциональных анализов *in vivo* (например, анализ персистенции клеток, противоопухолевой способности, противоопухолевого клиренса, вирусного клиренса, мультипотентности и любой их комбинации).

В некоторых аспектах статус дифференцировки клеток, например, плюрипотентных клеток, мультипотентных клеток и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), характеризуется повышенным количеством клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для менее дифференцированных клеток. В некоторых аспектах увеличение количества Т-клеток, подобных стволовым, характеризуется увеличением количества Т-клеток, экспрессирующих маркеры, типичные для клеток T_N и/или T_{SCM} . В определенных аспектах увеличение количества Т-клеток, подобных стволовым, характеризуется увеличением количества Т-клеток, экспрессирующих маркеры, типичные для клеток T_{SCM} . В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые экспрессируют CD45RA. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые экспрессируют CCR7. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые экспрессируют CD62L. В некоторых аспектах Т-клетки

демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые экспрессируют CD28. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые экспрессируют CD95. В некоторых аспектах Т-клетки не экспрессируют CD45R0. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые являются CD95⁺, CD45RA⁺, CCR7⁺, и CD62L⁺. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество клеток, которые экспрессируют TCF7. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые являются CD95⁺, CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, и TCF7⁺. В некоторых аспектах Т-клетки экспрессируют CD3. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые являются CD3⁺, CD95⁺, CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, и TCF7⁺. В некоторых аспектах Т-клетки экспрессируют CD27. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество Т-клеток, которые являются CD27⁺, CD3⁺, CD95⁺, CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, и TCF7⁺. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество клеток T_{SCM}. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество клеток T_N. В некоторых аспектах Т-клетки демонстрируют повышенное количество клеток T_{SCM} и T_N.

В некоторых аспектах количество клеток, подобных стволовым, в культуре увеличивается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на по меньшей мере около 100% по отношению к количеству клеток, подобных стволовым, перед культивированием. В некоторых аспектах количество клеток, подобных стволовым, в культуре увеличивается в по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 2,5 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 3,5 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 4,5 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз или в по меньшей мере около 20 раз по отношению к количеству клеток, подобным стволовым, до культивирования.

В некоторых аспектах после культивирования Т-клеток в соответствии со способами, описанными в данном документе, количество Т-клеток, подобных стволовым, составляет по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15% от общего числа CD8⁺ Т-клеток в культуре.

В некоторых аспектах после культивирования Т-клеток в соответствии со способами, описанными в данном документе, количество Т-клеток, подобных стволовым, составляет по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере

около 10%, по меньшей мере около 15% от общего числа CD4⁺ Т-клеток в культуре.

В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или TIL), культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, демонстрируют повышенную эффективность трансдукции. В некоторых аспектах больший процент клеток экспрессирует целевой трансген, например, кодирующий CAR, TCR или TCR α , после трансдукции, при этом клетки культивируют в соответствии со способами, описанными в данном документе, по сравнению с клетками, аналогично трансдуцированными и культивируемыми с использованием стандартных способов. В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или TIL), трансдуцируют с использованием вирусного вектора. В некоторых аспектах вирусный вектор содержит AAV. В некоторых аспектах вирусный вектор содержит ретровирус. В некоторых аспектах вирусный вектор содержит лентивирус. В некоторых аспектах больший процент клеток, культивируемых в соответствии со способами, описанными в данном документе, экспрессирует CAR или TCR после лентивирусной трансдукции клеток по сравнению с аналогично трансдуцированными клетками, культивируемыми с использованием стандартных способов. В некоторых аспектах эффективность трансдукции увеличивается по меньшей мере в 1,5 раза по сравнению с аналогично трансдуцированными клетками, культивируемыми с использованием стандартных способов. В некоторых аспектах эффективность трансдукции увеличивается по меньшей мере в 2 раза по сравнению с аналогично трансдуцированными клетками, культивируемыми с использованием стандартных способов.

В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или TIL), трансдуцируют перед культивированием в соответствии со способами, описанными в данном документе. В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или TIL), трансдуцируют после культивирования в соответствии со способами, описанными в данном документе. В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или TIL), культивируют в соответствии со способами, описанными в данном документе, например, в гипотонической или изотонической среде, содержащей по меньшей мере 50 мМ ионов калия, до, во время и после трансдукции.

В определенных аспектах при адоптивном переносе клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL, культивируемых в соответствии со способами, описанными в данном документе, перенесенные клетки демонстрируют меньшее клеточное истощение по сравнению с клетками, культивируемыми с использованием стандартных условий культивирования. В определенных аспектах при адоптивном переносе культивируемых клеток перенесенные клетки сохраняются в течение более длительного периода времени

in vivo по сравнению с клетками, культивируемыми с использованием стандартных условий культивирования. В некоторых аспектах перенесенные клетки, например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП, обладают большей эффективностью *in vivo*, например, активностью по уничтожению опухолей, по сравнению с клетками, культивируемыми с использованием стандартных условий культивирования. В некоторых аспектах требуется более низкая доза клеток, культивируемых в соответствии со способами, описанными в данном документе, для получения ответа, например, уменьшения объема опухоли, у субъекта по сравнению с клетками, культивируемыми с использованием стандартных условий культивирования.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), в среде, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, при этом среда является гипотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), в среде, содержащей ионы калия в концентрации выше 40 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), в среде, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), в среде, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, при этом среда является гипотонической или изотонической. В некоторых аспектах клетки, например Т-клетки, НК-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, сразу после выделения у субъекта. В некоторых аспектах клетки, например Т-клетки, НК-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время экспансии клеток. В некоторых аспектах клетки, например, Т-клетки, НК-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время конструирования клеток, например, во время трансдукции конструкцией, кодирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки, например, Т-клетки, НК-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, после конструирования клеток, например, после трансдукции конструкцией, кодирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки, например, Т-клетки, НК-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время экспансии и конструирования. В определенных аспектах клетки, например, Т-

клетки, NK-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время вирусной генной инженерии. В определенных аспектах клетки, например, Т-клетки, NK-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время невирусной генной инженерии. В определенных аспектах клетки, например, Т-клетки, NK-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время введения рецепторов для обеспечения опухоль-специфического нацеливания (например, TCR, TCRm и/или CAR). В определенных аспектах клетки, например, Т-клетки, NK-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, во время введения одного или более эндогенных генов, которые улучшают функцию Т-клеток. В определенных аспектах клетки, например, Т-клетки, NK-клетки или ТП, культивируют в среде, описанной в данном документе, например, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере примерно 50 мМ, во время введения одного или более синтетических генов, которые улучшают функцию Т-клеток.

В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 5 мМ, по меньшей мере около 10 мМ, по меньшей мере около 15 мМ, по меньшей мере около 20 мМ, по меньшей мере около 25 мМ, по меньшей мере около 30 мМ, по меньшей мере около 35 мМ, по меньшей мере около 40 мМ или по меньшей мере около 45 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 50 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 5 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ или около 45 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 40 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 45 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 50 мМ.

В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 55 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 65 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, по меньшей мере около 75 мМ, по меньшей мере около 80 мМ, по меньшей мере около 85 мМ, по меньшей мере около 90 мМ, по меньшей мере около 95 мМ, по меньшей мере около 100 мМ, по меньшей мере около 105 мМ, по меньшей мере около 110 мМ, по меньшей мере около 115 мМ, по меньшей мере около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ, около 100 мМ, около 105 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 55 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 65 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 70 мМ.

В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 100 мМ до около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 100 мМ до около 115 мМ, от около 100 мМ до около 110 мМ или от около 100 мМ до около 105 мМ. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах

В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 50 мМ до около 90 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 90 мМ до около 50 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 50 мМ до около 80 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 90 мМ до около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 60 мМ до около 90 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 90 мМ до около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 60 мМ до около 80 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 80 мМ до около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 70 мМ до около 90 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 70 мМ до около 50 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 70 мМ до около 80 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 70 мМ до около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 80 мМ до около 90 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 60 мМ до около 50 мМ. В некоторых аспектах общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

[illegible]

около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет от около 115 мМ до около 120 мМ, а концентрация NaCl составляет от менее чем около 25 мМ до около 20 мМ. В некоторых аспектах общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 40 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 40 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 41 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 41 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 42 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 42 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 43 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 43 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых

аспектах концентрация ионов калия превышает около 44 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 44 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 45 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 45 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 46 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 46 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 47 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 47 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 48 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 48 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 49 мМ, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 49 мМ, при этом среда является гипотонической.

[illegible]

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 60 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 61 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 61 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 62 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия

составляет около 62 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 63 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 63 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 64 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 64 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 65 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 65 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 66 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 66 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 67 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 67 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 68 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 68 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 69 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 69 мМ. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической.

[illegible]

аспектах концентрация ионов калия составляет около 66 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 67 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 67 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 68 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 68 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 69 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 69 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ.

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 70 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 70 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 71 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 71 мМ, при этом общая

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 80 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 80 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 81 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 81 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 82 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 82 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 83 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 83 мМ. В

[illegible]

аспектах концентрация ионов калия превышает около 87 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 87 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 88 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 88 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 89 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 89 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ.

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 90 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 90 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 91 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 91 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 92 мМ, при этом общая

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 100 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 100 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 101 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 101 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 102 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 102 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 103 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 103 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 104 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 104 мМ. В некоторых

[illegible]

аспектах концентрация ионов калия составляет около 107 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 108 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 108 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 109 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 109 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ.

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 110 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 110 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 111 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 111 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 112 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 112 мМ, при этом общая

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 121 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 121 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 122 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 122 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 123 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 123 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 124 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 124 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 125 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 125 мМ. В некоторых аспектах концентрация

[illegible]

аспектах концентрация ионов калия составляет около 127 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 128 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 128 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 129 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 129 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия превышает около 130 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов калия составляет около 130 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах среда, содержащая высокую концентрацию ионов калия, может быть приготовлена путем добавления в среду достаточного количества соли калия. В некоторых аспектах неограничивающие примеры соли калия включают аминетрихлорплатинат калия, аквапентахлоррутенат калия, дигидрат бис(оксалато)платината (II) калия, бисульфат калия, борогидрид калия, бромид калия, карбонат калия, хлорид калия, хромат калия, дихромат калия, дицианоаргентат калия, дицианоаурат калия, фторид калия, фторсульфат калия, гексахлороиридат калия, гексахлороосмат калия, гексахлоропалладат калия, гексахлороплатинат калия, гексахлорхенат калия, гексацианохромат калия, гексацианоферрат калия, гидрат гексацианорутената (II) калия, гексафторантимонат калия, гексафторникелат калия, гексафторфосфат калия, гексафтортитанат калия, гексафторцирконат калия, гексагидроксоантимонат калия, гексайодоплатинат калия, гексайодорхенат калия, гидроксид калия, йодат калия, йодид калия, манганат калия, метаванадат калия, молибдат калия, нитрат калия, нитрозодисульфат калия, дигидрат осмата (VI) калия, пентахлоронитрозилрутенат калия, перхлорат калия, перренат калия, перрутенат калия, персульфат калия, фосфат калия дибазовый, фосфат калия монобазовый, пирофосфат калия, селеноцианат калия, селеноцианат калия, тригидрат станната калия, сульфат калия, гидрат теллурата калия, теллурид калия, тетрагидрат тетрабората калия, тетрабромоеурат калия, тетрабромопалладат калия, тетрахлорпалладат калия, тетрахлорплатинат калия, тетрацианопалладат калия, тетрацианоплатинат калия, тетрафторборат калия, тетранитроплатинат калия, тетратионат калия, п-толуенэтиосульфат калия и трехзамещенный моногидрат гидроксицитрата калия. В определенных аспектах соль калия включает хлорид калия (KCl). В определенных аспектах соль калия включает глюконат калия. В определенных аспектах соль калия включает цитрат калия. В определенных аспектах соль калия включает гидроксицитрат калия.

В некоторых аспектах среда содержит ионы калия в концентрации, описанной в

В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность около 262 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность около 263 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность около 264 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность около 265 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, примерно 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность от около 255 мОсмоль до около 265 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность от около 260 мОсмоль до около 270 мОсмоль. В некоторых аспектах среда

содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность от около 261 мОсмоль до около 263 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 81 мМ, около 82 мМ, около 83 мМ, около 84 мМ или около 85 мМ ионов калия, и среда имеет осмоляльность от около 263 мОсмоль до около 265 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда дополнительно содержит агент для экспансии клеток. В контексте данного документа термин «агент для экспансии клеток» относится к агенту, например, малой молекуле, полипептиду или любой их комбинации, который способствует росту и пролиферации культивируемых клеток *in vitro* и/или *ex vivo*, например, плюрипотентным, мультипотентным, и/или иммунным клеткам (например, Т-клеткам, НК-клеткам и/или ТП). В некоторых аспектах агент для экспансии клеток содержит ингибитор PI3K. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ингибитор АКТ. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ингибитор PI3K и ингибитор АКТ. В некоторых аспектах ингибитор PI3K включает LY294002. В некоторых аспектах ингибитор PI3K включает IC87114. В некоторых аспектах ингибитор PI3K включает иделалисиб (см., например, Peterson et al., Blood Adv. 2(3):210-23 (2018)). В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ингибитор GSK3B. В некоторых аспектах ингибитор GSK3B включает TWS119. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит ингибитор ACLY. В некоторых аспектах ингибитор ACLY включает трехзамещенный моногидрат гидроксицитрата калия. В некоторых аспектах ингибитор PI3K включает гидроксицитрат. В некоторых аспектах ингибитор PI3K включает пиктилисиб. В некоторых аспектах ингибитор PI3K включает CAL-101. В некоторых аспектах ингибитор АКТ включает MK2206, A443654 или AKTi-VIII (CAS 612847-09-3).

В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП), культивируют в среде, описанной в данном документе, для всей культуры *ex vivo*, например, с момента выделения Т-клеток из субъекта путем выращивания, экспансии, конструирования и до введения. В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП), культивируют в среде, описанной в данном документе, в течение периода экспансии. В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП), культивируют в среде, описанной в данном документе, в течение периода экспансии. В некоторых аспектах клетки, например, плюрипотентные, мультипотентные и/или иммунные клетки (например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТП), культивируют в среде, описанной в данном документе, до тех пор, пока общее количество жизнеспособных клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП) составляет по меньшей мере около 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , или 5×10^6 клеток.

П.А. Натрий

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных или иммунных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и (ii) ионы натрия в концентрации менее около 115 мМ, при этом среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, NK-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ и (ii) ионы натрия в концентрации менее около 115 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования Т-клеток, включающим помещение Т-клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) ионы натрия в концентрации менее около 115 мМ. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической.

В некоторых аспектах целевую концентрацию натрия достигают, начиная с базовой среды, содержащей более высокую концентрацию ионов натрия, и разбавляя раствор для достижения целевой концентрации ионов натрия. В некоторых аспектах целевая концентрация натрия достигается путем повышения концентрации ионов натрия путем добавления одной или более солей натрия. Неограничивающие примеры солей натрия включают (мета)периодат натрия, гидрат арсенитартрата натрия, азид натрия, бензилоксид натрия, бромид натрия, карбонат натрия, хлорид натрия, хромат натрия, циклогексанбутират натрия, этанэтиолат натрия, фторид натрия, фторфосфат натрия, формиат натрия, гидрат гексахлороиридата (III) натрия, гексагидрат гексахлороиридата (IV) натрия, гексахлороплатинат (IV) натрия гексагидрат, гексахлорходат (III) натрия, гексафторалюминат натрия, гексафторантимонат (V) натрия, гексафтоарсенат (V) натрия, гексафторферрат (III) натрия, гексафторфосфат натрия, гексафторсиликат натрия, гексагидроксиплатинат (IV) натрия, гексаметафосфат натрия, дифторид натрия, гидрогенсульфат натрия, гидрогенцианамид натрия, гидроксид натрия, йодид натрия, тетрагидрат метабората натрия, нонагидрат метасиликата натрия, метаванадат натрия, молибдат натрия, нитрат натрия, нитрит натрия, оксалат натрия, моногидрат пербората натрия, перкарбонат натрия, перхлорат натрия, периодат натрия, перманганат натрия, перренат натрия, фосфат натрия, пирофосфат натрия, селенат натрия, селенит натрия, станнат натрия, сульфат натрия, теллурид натрия, тетраборат натрия, тетраалюминат натрия, тетрахлораурат (III) натрия, тетрахлорпалладат (II) натрия, тетрахлорплатинат (II) натрия, трехзамещенный тиофосфата натрия, тиосульфат натрия, пентагидрат тиосульфата натрия, оксифторид иттрия, тринатрий триметафосфат и любые их комбинации. В определенных аспектах соль натрия включает хлорид натрия (NaCl). В определенных аспектах соль натрия включает глюконат натрия. В определенных аспектах соль натрия включает бикарбонат натрия. В определенных аспектах соль натрия включает

В некоторых аспектах концентрация ионов натрия составляет около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ или около 90 мМ. В определенных аспектах концентрация ионов натрия составляет около 40 мМ. В определенных аспектах концентрация ионов натрия составляет около 45 мМ. В определенных аспектах концентрация ионов натрия составляет около 50 мМ. В определенных аспектах концентрация ионов натрия составляет около 55 мМ. В

определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	55,6	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	59,3	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	60	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	63,9	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	65	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	67,6	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	70	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	72,2	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	75	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	76	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	80	мМ.	В
определенных	аспектах	концентрация	ионов	натрия	составляет	около	80,5	мМ.	

[illegible]

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и около 75 мМ ионов натрия. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых

аспектах среда является изотонической.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ и (ii) NaCl в концентрации менее около 100 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования Т-клеток, включающим помещение Т-клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) NaCl в концентрации менее около 90 мМ.

II.B. Сахариды

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и (ii) сахарид, где среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ и (ii) сахарид. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) сахарид. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) сахарид; где общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах целевую концентрацию сахарада достигают, начиная с базовой среды, содержащей более высокую концентрацию сахарада, и разбавляя раствор для достижения целевой концентрации сахарада. В некоторых аспектах целевая концентрация сахарада достигается посредством повышения концентрации сахарада путем добавления сахарада до тех пор, пока не будет достигнута желаемая концентрация.

В некоторых аспектах сахарид представляет собой моносахарид, дисахарид или полисахарид. В некоторых аспектах сахарид выбран из глюкозы, фруктозы, галактозы, маннозы, мальтозы, сахарозы, лактозы, трегалозы и любой их комбинации. В некоторых аспектах сахарид представляет собой глюкозу. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и (ii) глюкозу. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ и (ii) глюкозу. В

некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и (ii) маннозу. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) маннозу. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ и (ii) глюкозу; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации выше 50 мМ и (ii) глюкозу; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 40 мМ и (ii) маннозу; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) маннозу; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

[illegible]

аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет от около 17,5 мМ до около 18 мМ.

В некоторых аспектах концентрация сахараида, например, глюкозы, составляет около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 10,5 мМ, около 11 мМ, около 11,5 мМ, около 12 мМ, около 12,5 мМ, около 13 мМ, около 13,5 мМ, около 14 мМ, около 14,5 мМ, около 15 мМ, около 15,5 мМ, около 16 мМ, около 16,5 мМ, около 17 мМ, около 17,5 мМ, около 18 мМ, около 18,5 мМ, около 19 мМ, около 19,5 мМ, около 20 мМ, около 20,5 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

[illegible]

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и около 17,7 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и около 17,7 мМ глюкозы, и среда имеет осмоляльность около 254,7 мОсмор.

В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и около 17,2 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах

среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и около 17,2 мМ глюкозы, и среда имеет осмоляльность около 255,2 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и около 16,8 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и около 16,8 мМ глюкозы, и среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 257,2 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и около 16,3 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и около 16,3 мМ глюкозы, и среда имеет осмоляльность около 257,5 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и около 15,9 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и около 15,9 мМ глюкозы, и среда имеет осмоляльность около 259,7 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и около 15,4 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и около 15,4 мМ глюкозы, и среда имеет осмоляльность около 260 мОсмоль.

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и около 15 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и около 15 мМ глюкозы, и среда имеет осмоляльность около 262,26 мОсмоль.

II.C. Кальций

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и (ii) ионы натрия, при этом среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ и (ii) ионы натрия. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) ионы натрия. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду,

содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 40 мМ и (ii) NaCl; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТНЛ), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) NaCl; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах целевую концентрацию кальция достигают, начиная с базовой среды, содержащей более высокую концентрацию ионов кальция и разбавляя раствор для достижения целевой концентрации ионов кальция. В некоторых аспектах целевая концентрация кальция достигается путем повышения концентрации ионов кальция путем добавления одной или более солей кальция. Неограничивающие примеры солей кальция включают бромид кальция, карбонат кальция, хлорид кальция, цианамид кальция, фторид кальция, гидрид кальция, гидроксид кальция, йодат кальция, йодид кальция, нитрат кальция, нитрит кальция, оксалат кальция, тетрагидрат перхлората кальция, однозамещенный фосфат кальция, трехзамещенный фосфат кальция, сульфат кальция, тетрагидрат тиоцианата кальция, гидроксиапатит и любую их комбинацию. В некоторых аспектах соль кальция включает хлорид кальция (CaCl_2). В некоторых аспектах соль кальция включает глюконат кальция.

В некоторых аспектах концентрация ионов кальция меньше, чем в базовой среде. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция выше, чем в базовой среде. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет более около 0,4 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 2,8 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 2,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 2,0 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,9 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,8 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,7 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,6 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,4 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,3 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,2 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,1 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет менее чем около 1,0 мМ.

В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет от около 0,4 мМ до около 2,8 мМ, от около 0,4 мМ до около 2,7 мМ, от около 0,4 мМ до около 2,5 мМ, от около 0,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,0 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,1 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,3 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,4 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,6 мМ до

[illegible][illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 0,6 мМ, около 0,7 мМ, около 0,8 мМ, около 0,9 мМ, примерно 1,0 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ,

110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и около 1,4 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и около 1,4 мМ ионов кальция, и среда имеет осмоляльность около 259,7 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия, около 1,4 мМ ионов кальция и NaCl; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и около 1,3 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и около 1,3 мМ ионов кальция, и среда имеет осмоляльность около 260 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия, около 1,3 мМ ионов кальция и NaCl; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и около 1,2 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и около 1,2 мМ ионов кальция, и среда имеет осмоляльность около 262,26 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия, около 1,2 мМ ионов кальция и NaCl; при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

II.D. Тоничность

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клетки, например, плюрипотентной клетки, мультипотентной клетки или иммунной клетки (например, Т-клетки, НК-клетки или TIL), в среде, имеющей более высокую концентрацию ионов калия, чем в обычной среде (например, более около 5 мМ ионов калия), при этом среда не является гипертонической. Неожиданно было обнаружено, что культивирование плюрипотентных/мультипотентных/иммунных клеток в негипертонической среде с высокой концентрацией ионов калия (например, более 5 мМ ионов калия) приводит к увеличению количества клеток, подобных стволовым, (например, менее дифференцированных или недифференцированных) в культуре. Этот эффект наиболее выражен, если (i) среда имеет высокую концентрацию калия (например, более 5 мМ, например, более 50 мМ) и среда является гипотонической или изотонической. Таким образом, хотя увеличение содержания ионов калия в культуральной среде могло бы в противном случае повысить тоничность, описанные в данном документе данные позволяют предположить, что увеличение количества ионов калия само по себе не так эффективно для стимулирования свойств клеток, подобных стволовым, в популяции клеток, как повышение содержания ионов калия в гипотонических или изотонических условиях.

В некоторых аспектах настоящего изобретения регулируется тоничность среды. В некоторых аспектах тоничность среды ниже, чем в базовой среде. В некоторых аспектах тоничность среды выше, чем в базовой среде. В некоторых аспектах тоничность среды такая же, как в базовой среде.

Среда, используемая в данном изобретении, может быть гипотонической или изотонической. На тоничность среды может влиять ряд факторов, в том числе концентрация ионов калия в среде. В некоторых аспектах повышенная концентрация ионов калия сочетается с увеличением или уменьшением концентрации одного или более других факторов. В некоторых аспектах это сочетание влияет на тоничность среды. В некоторых аспектах концентрация ионов калия увеличивается, тогда как концентрация ионов натрия, например, NaCl, снижается.

В некоторых аспектах среды, подходящие для настоящих сред, могут быть приготовлены на основе функции ионов калия и тоничности. См. таблицу 2. Например, в некоторых аспектах, если среда, подходящая для настоящего изобретения, является гипотонической (например, менее 280 мОсм) и содержит по меньшей мере около 50 мМ ионов калия, а концентрация NaCl, достаточная для поддержания среды гипотонической, может быть определена на основе следующей формулы: концентрация NaCl=(желаемая тоничность (280)/2) - концентрация ионов калия (т.е. концентрация NaCl (мМ) равна или ниже (140 - концентрация ионов калия)). В некоторых аспектах гипотоническая среда, описанная в данном документе, имеет общую концентрацию ионов калия и NaCl от 110 мМ до 140 мМ. Поэтому для гипотонической среды концентрация ионов калия может быть установлена на уровне от 50 мМ до 90 мМ, а концентрация ионов натрия может быть от 90 мМ до 50 мМ или ниже, при условии, что общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах гипотоническая среда, описанная в данном документе, имеет общую концентрацию ионов калия и NaCl от 115 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах гипотоническая среда, описанная в данном документе, имеет общую концентрацию ионов калия и NaCl от 120 мМ до 140 мМ.

В некоторых аспектах среда является изотонической (от 280 мОсм до 300 мОсм) и содержит концентрацию ионов калия от около 50 мМ до 70 мМ. Соответствующую концентрацию ионов натрия можно снова рассчитать по формуле: концентрация NaCl=(желаемая тоничность/2) - концентрация ионов калия. Например, если концентрация ионов калия составляет 50 мМ, а желаемая тоничность составляет 300 мОсм, концентрация натрия может составлять 100 мМ.

В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность 280 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 1 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 2 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 3 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 4 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 5 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 6$

мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 7 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 8 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 9 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 10 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 280 мОсм/л до около 285 мОсм/л , от около 280 мОсм/л до около 290 мОсм/л , от около 280 мОсм/л до около 295 мОсм/л , от около 280 мОсм/л до около 300 мОсм/л , от около 280 мОсм/л до около 305 мОсм/л , от около 280 мОсм/л до около 310 мОсм/л , от около 280 мОсм/л до около 315 мОсм/л или от около 280 мОсм/л до менее чем 320 мОсм/л . В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 285 мОсм/л , около 290 мОсм/л , около 295 мОсм/л , около 300 мОсм/л , около 305 мОсм/л , около 310 мОсм/л или около 315 мОсм/л .

[illegible]

мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 257 мОсм/л до около 258 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 258 мОсм/л до около 259 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 260 мОсм/л до около 261 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 261 мОсм/л до около 262 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 262 мОсм/л до около 263 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 263 мОсм/л до около 264 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 264 мОсм/л до около 265 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 220 мОсм/л до около 280 мОсм/л; измеряется путем сложения концентрации ионов калия и концентрации NaCl и умножения на два.

В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 100 мОсм/л, около 125 мОсм/л, около 150 мОсм/л, около 175 мОсм/л, около 200 мОсм/л, около 210 мОсм/л, около 220 мОсм/л, около 225 мОсм/л, около 230 мОсм/л, около 235 мОсм/л, около 240 мОсм/л, около 245 мОсм/л, около 250 мОсм/л, около 255 мОсм/л, около 260 мОсм/л, около 265 мОсм/л, около 270 мОсм/л или около 275 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность измеряют путем сложения концентрации ионов калия и концентрации NaCl и умножения на два.

В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 250 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 262,26 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 260 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 259,7 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 257,5 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 257,2 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 255,2 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 254,7. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 255 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 260 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность измеряют путем сложения концентрации ионов калия и концентрации NaCl и умножения на два.

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ ионов натрия; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ ионов натрия; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii); и среда имеет осмоляльность около 254,7 мОсморь. В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ NaCl; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ NaCl; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; и (iii) около 1,8 мМ ионов кальция.

В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и (i) около 76 мМ ионов натрия; (ii) около 17,2 мМ глюкозы; (iii) около 1,7 мМ ионов кальция; или (iv)

около 70 мМ ионов калия и (i) около 63,9 мМ NaCl; (ii) около 15,9 мМ глюкозы; и (iii) около 1,4 мМ ионов кальция.

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ ионов натрия; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ ионов натрия; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii); и среда имеет осмоляльность около 260 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ NaCl; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ NaCl; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; и (iii) около 1,3 мМ ионов кальция.

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ ионов натрия; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ ионов натрия; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii); и среда имеет осмоляльность около 262,26 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ NaCl; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ NaCl; (ii) около 15 мМ глюкозы; и (iii) около 1,2 мМ ионов кальция.

Осмоляльность среды может быть отрегулирована, например, до изотонического или гипотонического состояния, описанного в данном документе, в любой момент времени. В некоторых аспектах осмоляльность среды может быть отрегулирована, например, до изотонического или гипотонического состояния, описанного в данном документе, перед добавлением клеток в среду. В некоторых аспектах клетки культивируют в гипотонической или изотонической среде перед конструированием клеток, например, перед трансдукцией конструкцией, экспрессирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки культивируют в гипотонической или изотонической среде во время конструирования клеток, например, во время трансдукции конструкцией, экспрессирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки культивируют в гипотонической или изотонической среде после конструирования клеток, например, после трансдукции конструкцией, экспрессирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки культивируют в гипотонической или изотонической среде на протяжении экспансии клеток.

II.E. Цитокины

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам

культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, как описано в данном документе, и (ii) цитокин, при этом среда является гипотонической или изотонической. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации выше 40 мМ, как описано в данном документе, и (ii) цитокин. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, как описано в данном документе, и (ii) цитокин. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам увеличения количества менее дифференцированных иммунных клеток, например, подобных стволовым Т-клеток, НК-клеток или ТП, например, клеток, имеющих один или более фенотипов и/или функций T_{SCM} -подобных клеток, в иммунных клетках *ex vivo* или *in vitro*, включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) калий в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, как описано в настоящем документе, и (ii) цитокин, при этом среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам увеличения количества менее дифференцированных иммунных клеток, например, стволовых Т-клеток, НК-клеток или ТП, например, клеток, имеющих один или более фенотипов и/или функций T_{SCM} -подобных клеток, в иммунных клетках *ex vivo* или *in vitro*, включающим помещение клеток в среду, содержащую (i) калий в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, как описано в данном документе, и (ii) цитокин. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах цитокин выбран из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 и любой их комбинации.

Цитокин можно добавлять в среду в любой момент. В некоторых аспектах цитокин добавляют в среду перед добавлением в среду клеток. В некоторых аспектах клетки культивируют в среде, содержащей (i) калий в концентрации, описанной в данном документе, и (ii) цитокин до конструирования клеток, например, до трансдукции конструкцией, экспрессирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки культивируют в среде, содержащей (i) калий в концентрации, описанной в данном документе, и (ii) цитокин во время конструирования клеток, например, во время трансдукции конструкцией, экспрессирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки культивируют в среде, содержащей (i) калий в концентрации, описанной в данном документе, и (ii) цитокин после конструирования клеток, например, после трансдукции конструкцией, экспрессирующей CAR или TCR. В некоторых аспектах клетки

культивируют в среде, содержащей (i) калий в концентрации, описанной в данном документе, и (ii) цитокин во время экспансии клеток.

В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-2. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-2. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-2. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7 и IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7 и IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-2, и среда не содержит IL-7 и IL-15. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-2 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-2 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-2 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-7 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-7 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-7 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 5 мМ ионов калия и (ii) IL-15 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) более 40 мМ ионов калия и (ii) IL-15 и IL-21. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и (ii) IL-15 и IL-21. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит NaCl, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способу увеличения числа

менее дифференцированных иммунных клеток, например, подобных стволовым Т-клеток, НК-клеток или ТП, например, клеток, имеющих T_{SCM}-подобный фенотип, в иммунных клетках *ex vivo* или *in vitro*, включающий культивирование клеток в среде, содержащей ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, при этом среда содержит IL-2. В некоторых аспектах среда не содержит IL-7 и/или IL-15. В некоторых аспектах количество менее дифференцированных клеток, например, подобных стволовым Т-клеток, НК-клеток или ТП, например, клеток, имеющих T_{SCM}-подобный фенотип, после культивирования в среде выше, чем количество менее дифференцированных клеток культивируют в среде, содержащей IL-2, IL-7 и IL-15.

В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 0,1 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 13 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 12 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 11 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 9 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 8 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 7 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 6 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 5 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 4 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 3 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 2 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 15 нг/мл или от около 15 нг/мл до около 20 нг/мл IL-2.

В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 0,1 нг/мл, по меньшей мере около 0,5 нг/мл, по меньшей мере около 1 нг/мл, по меньшей мере около 2 нг/мл, по меньшей мере около 3 нг/мл, по меньшей мере около 4 нг/мл, по меньшей мере около 5 нг/мл, по меньшей мере около 6 нг/мл, по меньшей мере около 7 нг/мл, по меньшей мере около 8 нг/мл, по меньшей мере около 9 нг/мл, по меньшей мере около 10 нг /мл, по меньшей мере около 11 нг/мл, по меньшей мере около 12 нг/мл, по меньшей мере около 13 нг/мл, по меньшей мере около 14 нг/мл, по меньшей мере около 15 нг/мл, по меньшей мере около 16 нг/мл, по меньшей мере около 17 нг/мл, по меньшей мере около 18 нг/мл, по меньшей мере около 19 нг/мл или по меньшей мере около 20 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 1,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 2,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 3,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 4,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 5,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 6,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 7,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 8,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 9,0 нг/мл IL-2. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 10 нг/мл IL-2.

В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 0,1 нг/мл. В некоторых аспектах среда содержит от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл,

В некоторых аспектах среда содержит более 40 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 45 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 40 мМ ионов калия и около 50 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 55 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 60 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 65 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 70 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-7, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 75 мМ ионов калия и около 10 нг/мл IL-2, и около 1

содержит по меньшей мере около 60 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 65 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 70 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 75 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 80 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 85 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 90 мМ ионов калия и около 1 нг/мл IL-15, и около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 70 мМ ионов калия, (ii) около 60 мМ натрия, (iii) около 1,4 мМ кальция, (iv) около 16 мМ глюкозы, (v) около 1 нг/мл IL-15 и (vi) около 1 нг/мл IL-21, при этом среда является гипотонической.

[illegible]

мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 90 мМ ионов калия, NaCl и около 10 нг/мл IL-2, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 70 мМ ионов калия, (ii) около 60 мМ NaCl, (iii) около 1,4 мМ кальция, (iv) около 16 мМ глюкозы и (v) около 10 нг/моль/мл IL-2.

[illegible]

В некоторых аспектах среда содержит более 40 мМ ионов калия, NaCl и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ и 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 45 мМ ионов калия, NaCl и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ и 140 мМ. В

калия, NaCl и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-21, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ и 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 85 мМ ионов калия, NaCl и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-21, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ и 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит по меньшей мере около 90 мМ ионов калия, NaCl и около 10 нг/мл IL-2, и около 1 нг/мл IL-21, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ и 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит (i) по меньшей мере около 70 мМ ионов калия, (ii) около 60 мМ NaCl, (iii) около 1,4 мМ кальция, (iv) около 16 мМ глюкозы, (v) около 10 нг/мл IL-2 и (vi) около 1 нг/мл IL-21.

[illegible]

[illegible]

В некоторых аспектах среда содержит более 40 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110

мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия, NaCl, около 200 МЕ/мл IL-2, около 1200 МЕ/мл IL-7, около 200 МЕ/мл IL-15, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl в среде составляет от 110 мМ до 140 мМ.

II.F. Базовая среда

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, при этом среда является гипотонической или изотонической. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ и NaCl в концентрации менее 100 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и NaCl в концентрации менее 90 мМ. В некоторых аспектах среду готовят путем добавления ионы калия в базовую среду. Можно использовать любую базовую среду, известную в данной области техники, которая используется для культивирования клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL).

В некоторых аспектах базовая среда дополнительно содержит одну или более незаменимых аминокислот. В некоторых аспектах базовая среда содержит одну или более незаменимых аминокислот, выбранных из L-аргинина, L-цистина, L-изолейцина, L-лейцина, L-лизина, L-метионина, L-фенилаланина, L-треонина, L-триптофана, L-гистидина, L-тирозина, L-валина и L-глутамина или любой их комбинации. В некоторых аспектах базовая среда содержит L-глутамин.

В некоторых аспектах базовая среда содержит по меньшей мере около 0,01 мМ одной или более незаменимых аминокислот. В некоторых аспектах базовая среда содержит от около 0,01 мМ до около 10 мМ одной или более незаменимых аминокислот. В некоторых аспектах базовая среда содержит от около 0,01 мМ до около 10 мМ, от около 0,01 мМ до около 9 мМ, от около 0,01 мМ до около 8 мМ, от около 0,01 мМ до около 7 мМ, от около 0,01 мМ до около 6 мМ, от около 0,01 мМ до около 5 мМ, от около 0,01 мМ до около 4 мМ, от около 0,01 мМ до около 3 мМ, от около 0,01 мМ до около 2 мМ, от около 0,01 мМ до около 1 мМ, от около 0,1 мМ до около 10 мМ, от около 0,1 мМ до около 9 мМ, от около 0,1 мМ до около 8 мМ, от около 0,1 мМ до около 7 мМ, от около 0,1 мМ до около 6 мМ, от около 0,1 мМ до около 5 мМ, от около 0,1 мМ до около 4 мМ, от около 0,1 мМ до около 3 мМ, от около 0,1 мМ до около 2 мМ, от около 0,1 мМ до около 1 мМ, от около 1 мМ до около 10 мМ, от около 1 мМ до около 9 мМ, от около 1 мМ до около 8 мМ, от около 1 мМ до около 7 мМ, от около 1 мМ до около 6 мМ, от около 1 мМ до около 5 мМ, от около 1 мМ до около 4 мМ, от около 1 мМ до около 3 мМ или от около 1 мМ до около 2 мМ одной или более незаменимых аминокислот.

В некоторых аспектах базовая среда содержит по меньшей мере около 0,01 мМ, по меньшей мере около 0,1 мМ, по меньшей мере около 0,5 мМ, по меньшей мере около 1,0 мМ, по меньшей мере около 2 мМ, по меньшей мере около 3 мМ, по меньшей мере около 4 мМ, по меньшей мере около 5 мМ, по меньшей мере около 6 мМ, по меньшей мере около 7 мМ, по меньшей мере около 8 мМ, по меньшей мере около 9 мМ, по меньшей мере около 10 мМ, по меньшей мере около 11 мМ, по меньшей мере около 12 мМ, по меньшей мере около 13 мМ, по меньшей мере около 14 мМ, или по меньшей мере около 15 мМ, или по меньшей мере около 50 мМ одной или более незаменимых аминокислот.

В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,01 мМ, около 0,05 мМ, около 0,1 мМ, около 0,2 мМ, около 0,3 мМ, около 0,4 мМ, около 0,5 мМ, около 0,6 мМ, около 0,7 мМ, около 0,8 мМ, около 0,9 мМ, около 1 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ, около 1,9 мМ, около 2,0 мМ, около 2,1 мМ, около 2,2 мМ, около 2,3 мМ, около 2,4 мМ, около 2,5 мМ, около 2,6 мМ, около 2,7 мМ, около 2,8 мМ, около 2,9 мМ, около 3,0 мМ, около 3,1 мМ, около 3,2 мМ, около 3,3 мМ, около 3,4 мМ, около 3,5 мМ, около 3,6 мМ, около 3,7 мМ, около 3,8 мМ, около 3,9 мМ, около 4,0 мМ, около 4,1 мМ, около 4,2 мМ, около 4,3 мМ, около 4,4 мМ, около 4,5 мМ, около 4,6 мМ, около 4,7 мМ, около 4,8 мМ, около 4,9 мМ, около 5,0 мМ, около 5,1 мМ, около 5,2 мМ, около 5,3 мМ, около 5,4 мМ, около 5,5 мМ, около 5,6 мМ, около 5,7 мМ, около 5,8 мМ, около 5,9 мМ, около 6,0 мМ,

мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 1,25 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 1,259 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 1,28 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 1,3 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,3 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,34 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,35 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,36 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,37 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит менее около 0,3 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит менее около 0,29 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит менее около 0,28 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда содержит менее около 0,278 мМ аммиака. В некоторых аспектах базовая среда не содержит аммиак.

В некоторых аспектах базовая среда содержит лактат. В некоторых аспектах базовая среда не содержит лактат.

В некоторых аспектах базовая среда содержит калий, например, базовая среда содержит калий до добавления калия, как описано в данном документе. В некоторых аспектах базовая среда содержит менее около 10 мМ ионов калия. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 0,1 мМ, около 0,2 мМ, около 0,3 мМ, около 0,4 мМ, около 0,5 мМ, около 0,6 мМ, около 0,7 мМ, около 0,8 мМ, около 0,9 мМ, около 1,0 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ, около 1,9 мМ, около 2,0 мМ, около 2,1 мМ, около 2,2 мМ, около 2,3 мМ, около 2,4 мМ, около 2,5 мМ, около 2,6 мМ, около 2,7 мМ, около 2,8 мМ, около 2,9 мМ, около 3,0 мМ, около 3,1 мМ, около 3,2 мМ, около 3,3 мМ, около 3,4 мМ, около 3,5 мМ, около 3,6 мМ, около 3,7 мМ, около 3,8 мМ, около 3,9 мМ, около 4,0 мМ, около 4,1 мМ, около 4,2 мМ, около 4,3 мМ, около 4,4 мМ, около 4,5 мМ, около 4,6 мМ, около 4,7 мМ, около 4,8 мМ, около 4,9 мМ, около 5,0 мМ, около 5,1 мМ, около 5,2 мМ, около 5,3 мМ, около 5,4 мМ, около 5,5 мМ, около 5,6 мМ, около 5,7 мМ, около 5,8 мМ, около 5,9 мМ или около 6,0 мМ ионов калия. В некоторых аспектах базовая среда содержит около 4 мМ ионов калия.

В некоторых аспектах базовая среда выбрана из сбалансированного солевого раствора (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS), модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), основной среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной питательной среды Глазго (GMEM), альфа-минимальной питательной среды (альфа-MEM), среды Дульбекко в модификации Искова (IMDM), M199, основной среды для экспансии Т-клеток OpTmizer™ CTS™ (ThermoFisher), OPTMIZER™ Complete, IMMUNOCULT™ XF (STEMCELL™ Technologies), IMMUNOCULT™ XF, среды AIM V, TEXMACS™ и любой их комбинации. В некоторых аспектах базовая среда включает PRIME-XV T cell CDM. В некоторых аспектах базовая среда включает OPTMIZER™. В некоторых аспектах базовая среда включает OPTMIZER™ Pro. В некоторых аспектах базовая среда включает X-VIVO™ 15 (LONZA).

В некоторых аспектах базовая среда включает IMMUNOCULT™. В некоторых аспектах базовая среда не содержит сыворотку. В некоторых аспектах базовая среда дополнительно включает заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR). Например, в некоторых аспектах базовая среда включает OPTMIZER™ Complete с добавлением ICSR, AIM V с добавлением ICSR, IMMUNOCULT™ XF с добавлением ICSR, RPMI с добавлением ICSR, TEXMACS™ с добавлением ICSR или любую их комбинацию. В конкретных аспектах базовая среда содержит OPTMIZER™ Complete.

II.G. Клетки

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, включающим помещение клеток в гипотоническую или изотоническую среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ, как описано в данном документе. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации выше 40 мМ, как описано в данном документе. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток, включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ, как описано в данном документе.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток (например, иммунных клеток человека и/или стволовых клеток, описанных в данном документе), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 40 мМ и NaCl в концентрации менее 100 мМ, как описано в данном документе. Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам культивирования клеток (например, иммунных клеток человека и/или стволовых клеток, описанных в данном документе), включающим помещение клеток в среду, содержащую ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и NaCl в концентрации менее 90 мМ, как описано в данном документе.

Клетки, которые помещают в среду, могут представлять собой клетки, собранные и/или выделенные у субъекта, нуждающегося в терапии. В некоторых аспектах клетки, помещенные в среду, были сконструированы до культивирования. В некоторых аспектах клетки, помещенные в среду, подвергали экспансии. Клетки, помещенные в среду, можно назвать исходными (первичными, т.е. образец пациента, образец продукта афереза, лейкоцитарная пленка). Клетки, полученные в результате их культивирования в средах, описанных в данном документе, можно назвать результирующими (культивируемыми) клетками.

Описанные в данном документе способы обеспечивают условия культивирования, которые способствуют формированию фенотип менее дифференцированных клеток у культивируемых плюрипотентных или мультипотентных клеток. Как таковые, способы и среды, описанные в данном документе, применимы для культивирования клеток мультипотентного (например, плюрипотентного) типа. В некоторых аспектах клетка, которую можно культивировать с использованием описанных в данном документе

способов, представляет собой мультипотентную клетку. В некоторых аспектах клетки представляют собой плюрипотентные клетки. В определенных аспектах плюрипотентные клетки включают эмбриональные стволовые клетки (ESC). В некоторых аспектах плюрипотентные клетки включают индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых аспектах клетки представляют собой гемопоэтические стволовые клетки.

В некоторых аспектах клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых аспектах исходные иммунные клетки выделяют из человека. В некоторых аспектах исходные иммунные клетки выделяют у человека для аллогенной клеточной терапии. В некоторых аспектах исходные иммунные клетки выделяют у человека для аутологичной клеточной терапии. В некоторых аспектах клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых аспектах клетки представляют собой NK-клетки. В некоторых аспектах клетки представляют собой TIL. В некоторых аспектах клетки представляют собой Treg. В некоторых аспектах клетки, например, Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, выделяют из организма человека. В некоторых аспектах иммунные клетки представляют собой опухоль-инфильтрирующие Т-клетки или опухоль-инфильтрирующие NK-клетки. В некоторых аспектах сконструированы клетки, например, Т-клетки, NK-клетки и/или TIL. В некоторых аспектах иммунные клетки, например Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, сконструированы таким образом, чтобы они содержали химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах иммунные клетки, например Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, сконструированы таким образом, чтобы они содержали сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR).

В некоторых аспектах клетки, например Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, конструируют перед культивированием в соответствии со способами, описанными в данном документе. В некоторых аспектах клетки, например, Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, конструируют после культивирования в соответствии со способами, описанными в данном документе. В некоторых аспектах клетки, например Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, культивируют в соответствии со способами, описанными в данном документе, например, в гипотонической или изотонической среде, содержащей по меньшей мере 50 мМ ионов калия, до, во время, и после конструирования клеток. В некоторых аспектах клетки, например Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых аспектах клетки, например Т-клетки, NK-клетки и/или TIL, сконструированы для экспрессии сконструированного Т-клеточного рецептора (TCR). В некоторых аспектах культивирование клеток, например Т-клеток, NK-клеток и/или TIL, в условиях, описанных в данном документе, например, в гипотонической или изотонической среде, содержащей по меньшей мере около 50 мМ ионов калия, приводит к более высокой эффективности трансдукции. В некоторых аспектах эффективность трансдукции по меньшей мере в около 2 раза выше в клетках, например, Т-клетках, NK-клетках и/или TIL, культивируемых в гипотонической или изотонической среде, содержащей по меньшей мере около 60 мМ ионов калия, в

соответствии со способами, описанными в данном документе, по сравнению с клетками, например, Т-клетками, NK-клетками и/или ТП, культивируемыми в среде, содержащей 4 мМ ионов калия или менее. В некоторых аспектах эффективность трансдукции по меньшей мере в около 2,5 раза выше в клетках, например, Т-клетках, NK-клетках и/или ТП, культивируемых в гипотонической или изотонической среде, содержащей по меньшей мере около 65 мМ ионов калия, в соответствии со способами, описанными в данном документе, по сравнению с клетками, например, Т-клетками, NK-клетками и/или ТП, культивируемыми в среде, содержащей 4 мМ ионов калия или менее.

В некоторых аспектах клетка содержит конструкцию, экспрессирующую антигенный рецептор и/или другой дополнительный полипептид. В некоторых аспектах антигенный рецептор содержит антитело, сконструированное антитело, такое как scFv, CAR, сконструированный TCR, имитатор TCR (например, антитело - рецептор Т-клетки (abTCR) или химерное антитело - рецептор Т-клетки (caTCR)) или химерный сигнальный рецептор (CSR). Например, TCR может содержать сконструированный TCR, в котором антигенсвязывающий домен TCR (например, альфа/бета TCR или гамма/дельта TCR) заменен доменом антитела (с или без константных доменов антител); затем сконструированный TCR становится специфичным к антигену антитела, сохраняя при этом сигнальные функции TCR. Химерный сигнальный рецептор может содержать (1) внеклеточный связывающий домен (например, внеклеточный домен природного/модифицированного рецептора, внеклеточный домен природного/модифицированного лиганда, scFv, нанотело, Fab, DARPIn и аффитело), (2) трансмембранный домен и (3) внутриклеточный сигнальный домен (например, домен, который активирует факторы транскрипции или рекрутирует и/или активирует JAK/STAT, киназы, фосфатазы и убиквитин, SH3, SH2 и PDZ). См., например, EP340793B1, WO 2017/070608, WO 2018/200582, WO 2018/200583, WO 2018/200585, и Xu et al., Cell Discovery (2018) 4:62.

В некоторых аспектах антигенный рецептор нацелен на представляющий интерес антиген (например, опухолевый антиген или антиген патогена). Антигены могут включать, без ограничения, AFP (альфа-фетопротеин), $\alpha v \beta 6$ или другой интегрин, BCMA, B7-H3, B7-H6, Braf, CA9 (карбоангидразу 9), CCL-1 (лиганд 1 хемокина, содержащего мотив C-C), CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD47, CD56, CD66e, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD98, CD123, CD138, CD171, CD352, CEA (карциноэмбриональный антиген), клаудин 18.2, клаудин 6, c-MET, DLL3 (дельта-подобный белок 3), DLL4, ENPP3 (член семейства эктонуклеотид-пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 3), EPCAM, EPG-2 (эпителиальный гликопротеин 2), EPG-40, эфрин B2, EPHa2 (рецептор эфрина A2), димеры ERBB, рецептор эстрогена, ETBR (рецептор эндотелина B), FAP- α (белок активации фибробластов α), фетальный AchR (фетальный рецептор ацетилхолина), FBP (фолат-связывающий белок), FCRL5, FR- α (фолатный рецептор альфа), GCC (гуанилциклазу C), GD2, GD3, GPC2 (глипикан-2), GPC3, gp100 (гликопротеин 100), GPNMB (гликопротеин

NMB), GPRC5D (сопряженный с G-белком рецептор 5D), HER2, HER3, HER4, поверхностный антиген гепатита В, HLA-A1 (человеческий лейкоцитарный антиген A1), HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2), HMW-MAA (человеческий меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой), IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), Ig-каппа, Ig-лямбда, IL-22Ra (рецептор IL-22 альфа), IL-13Ra2 (рецептор IL-13 альфа 2), KDR (рецептор с доменом, содержащим киназную вставку), молекулу клеточной адгезии LI (LI-CAM), Liv-1, LRRC8A (член А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8), Льюис Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1 (melan A), мышиний цитомегаловирус (MCMV), MCSP (меланома-ассоциированный хондроитинсульфатный протеогликан), мезотелин, муцин 1 (MUC1), MUC16, комплексы МНС/пептид (например, HLA-A в комплексе с пептидами, полученными из AFP, KRAS, NY-ESO, MAGE-A, и WT1), NCAM (нейрональную молекулу клеточной адгезии), нектин-4, лиганды NKG2D (члена D группы 2 натуральных киллеров), NY-ESO, онкофетальный антиген, PD-1, PD-L1, PRAME (предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы), прогестероновый рецептор, PSA (простатспецифический антиген), PSCA (антиген стволовых клеток предстательной железы), PSMA (простатспецифический мембранный антиген), ROR1, ROR2, SIRP α (сигнальный регуляторный белок альфа), SLIT, SLITRK6 (NTRK-подобный белок 6), STEAP1 (шестой трансмембранный эпителиальный антиген простаты 1), сурвивин, TAG72 (опухолеассоциированный гликопротеин 72), TPBG (трофобластический гликопротеин), Trop-2, VEGFR1 (рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов), VEGFR2, и антигены HIV, HBV, HCV, HPV, и других патогенов.

В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на hTERT. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на KRAS. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на Braf. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на TGF β RII. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на MAGE A10/A4. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на AFP. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на PRAME. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на MAGE A1. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на WT-1. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на NY-ESO. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на PRAME. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на NY-ESO. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19.

В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на BCMA. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD147. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19 и CD22. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19 и CD28. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD20. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD20 и CD19. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD22. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD30. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CEA. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на DLL3. В некоторых аспектах

рецептор антигена нацелен на EGFRvIII. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на GD2. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на HER2. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на IL-1RAP. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на мезотелин. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на метотелин. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на NKG2D. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на PSMA. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на TnMUC1.

II.G.1. Химерный антигенный рецептор (CAR)

В некоторых аспектах клетка, например, Т-клетка, НК-клетка и/или ТП, содержит CAR. В некоторых аспектах клетка, которая может быть получена для экспрессии CAR (например, CAR Т-клеткой), представляет собой, например, CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах CAR-экспрессирующая клетка, описанная в данном документе, представляет собой CAR-Т-клетку, например, моно CAR-Т-клетку, CAR-Т-клетку с отредактированным геномом, двойную CAR-Т-клетку или тандемную CAR-Т-клетку. Примеры таких CAR Т-клеток представлены в международной заявке № PCT/US2019/044195.

В некоторых аспектах CAR специфически связывает (т.е. мишень) один или более антигенов, экспрессированных на опухолевой клетке, такой как злокачественная В-клетка, злокачественная Т-клетка или злокачественная плазматическая клетка.

В некоторых аспектах CAR специфически связывается (т.е. нацеливается) на антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюиса Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатного рецептора альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатного рецептора альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белка спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутанта p53, простеина, сурвивина, теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутанта Ras, hTERT, точек разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитого гена ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточной части белка APRIL или любых их комбинаций.

В некоторых аспектах CAR нацелен на BCMA. В некоторых аспектах CAR нацелен

на CD147. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19. В некоторых аспектах CAR нацелен на ROR1. В некоторых аспектах CAR нацелен на GPC3. В некоторых аспектах CAR нацелен на GPC2. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19 и CD22. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19 и CD28. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD20. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD20 и CD19. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD22. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD30. В некоторых аспектах CAR нацелен на CEA. В некоторых аспектах CAR нацелен на DLL3. В некоторых аспектах CAR нацелен на EGFRvIII. В некоторых аспектах CAR нацелен на GD2. В некоторых аспектах CAR нацелен на HER2. В некоторых аспектах CAR нацелен на IL-1RAP. В некоторых аспектах CAR нацелен на мезотелин. В некоторых аспектах CAR нацелен на метотелин. В некоторых аспектах CAR нацелен на NKG2D. В некоторых аспектах CAR нацелен на PSMA. В некоторых аспектах CAR нацелен на TnMUC1.

В некоторых аспектах CAR содержит антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген в комплексе с МНС. В некоторых аспектах CAR содержит антигенсвязывающий домен из TCR α , например, любого TCR α , описанного в данном документе.

II.G.2. Клетки со сконструированным Т-клеточным рецептором (TCR)

В некоторых аспектах иммунная клетка, например, Т-клетка, НК-клетка или TIL, описанная в данном документе, содержит Т-клеточный рецептор (TCR), например, сконструированный TCR. В некоторых аспектах TCR специфически связывается с опухолевым антигеном. В контексте данного документа термин «сконструированный TCR» или «сконструированный Т-клеточный рецептор» относится к Т-клеточному рецептору (TCR), сконструированному для специфического связывания с желаемой аффинностью с главным комплексом гистосовместимости (МНС)/пептидным антигеном-мишенью, который выбирается, клонируется и/или впоследствии вводится в популяцию иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или TIL. В некоторых аспектах TCR специфически связывает неоантиген, идентифицированный у пациента со злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. мишень) один или более антигенов, экспрессированных на опухолевой клетке, такой как злокачественная В-клетка, злокачественная Т-клетка или злокачественная плазматическая клетка.

В определенных аспектах сконструированная клетка по настоящему изобретению может экспрессировать Т-клеточный рецептор (TCR), нацеленный на антиген. В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут быть нацелены на основные типы: общие опухолеассоциированные антигены (общие ТАА) и уникальные опухолеассоциированные антигены (уникальные ТАА) или опухолеспецифические антигены. К первым можно отнести, но не ограничиваясь этим, раково-тестикулярные (СТ) антигены, сверхэкспрессированные антигены и антигены дифференцировки, а ко вторым можно отнести, но не ограничиваясь этим, неоантигены и онковирусные антигены. Белок Е6 вируса папилломы человека (HPV) и белок Е7 HPV относятся к

категории онковирусных антигенов.

В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут нацеливаться на антиген СТ, например, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), включая, но не ограничиваясь этим, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9.23, MAGE-A10, и MAGE-A12. В некоторых аспектах, клетки со сконструированным TCR могут быть нацелены на гликопротеин (gp100), антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1), и/или тирозиназу, которые в основном обнаруживаются в меланомах и нормальных меланоцитах. В некоторых аспектах, клетки со сконструированными TCR могут быть нацелены на опухоль Вильмса 1 (WT1), т.е. один из видов сверхэкспрессированного антигена, который высоко экспрессируется в большинстве острых миелоидных лейкозов (AML), острых лимфоидных лейкозах, почти каждом типе солидных опухолей и нескольких критических тканях, таких как ткани сердца. В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут нацеливаться на мезотелин, другой вид сверхэкспрессированного антигена, который в высокой степени экспрессируется в мезотелиоме, но также присутствует в мезотелиальных клетках некоторых тканей, включая трахею.

В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут нацеливаться на любой неоантиген, который может образовываться в результате случайных соматических мутаций, специфичных для отдельных опухолей. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) раковый антиген, выбранный из группы, состоящей из AFP, Braf, CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюиса Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатного рецептора альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатного рецептора альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белка спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутанта p53, протеина, сурвивина, теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутанта Ras, hTERT, точек разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитого гена ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточной части белка APRIL или любых их комбинаций.

В определенных аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на)

hTERT. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) KRAS. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) Braf. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) TGFβRII. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) MAGE A10/A4. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) AFP. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) PRAME. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) MAGE A1. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) WT-1. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) NY-ESO. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) PRAME. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) NY-ESO. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) CD19. В определенных аспектах TCR специфически связывает неоантиген, идентифицированный у пациента со злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах TCR содержит внутриклеточный гамма/дельта домен. В некоторых аспектах TCR представляет собой антитело-рецептор Т-клетки (AbTCR) (см., например, Xu et al., Cell Discovery 4:62 (2018), который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

II.G.3. Имитаторы Т-клеточных рецепторов (TCRm)

В некоторых аспектах иммунная клетка, например, Т-клетка, НК-клетка и/или TIL, описанная в данном документе, содержит миметик Т-клеточного рецептора (TCRm), также известный как TCR-подобное антитело. TCRm представляют собой тип антител, которые распознают эпитопы, содержащие как пептид, так и молекулу MHC-I, аналогично распознаванию таких комплексов TCR на Т-клетках (см., например, Traneska et al., Front. Immunol. 8(1001):1-12 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с опухолевым антигеном. В определенных аспектах TCRm специфически связывает неоантиген, идентифицированный у пациента со злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах TCRm специфически связывает (т.е. мишень) один или более антигенов, экспрессированных на опухолевой клетке, такой как злокачественная В-клетка, злокачественная Т-клетка или злокачественная плазматическая клетка. В некоторых аспектах TCRm представляет собой моноклональное антитело. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с WT1. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с фрагментом WT1. В некоторых аспектах TCRm содержит ESK1 (см., например, Ataie et al., J. Mol. Biol. 428(1):194-205 (2016), который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с MAGE-A1. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с РНК-геликазой p68/HLA-A*02:01. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с hCG-b/HLAA*02:01. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с Her2-E75/HLA-A*02:01. В некоторых аспектах TCRm

специфически связывается с PR-1 в контексте HLA-A*02:01 (см., например, *Oncoimmunology* 5(1):e1049803 (June 2015), который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с нонамерным пептидом, производным сурвивина-2В, AYACNTSTL (SV2B80-88), презентируемым HLA-A*24 (SV2B80-88/HLA-A*24) (см., например, Kurosawa et al., *Nature Scientific Reports* 9(9827):1-11 (2019), который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых аспектах TCRm специфически связывает один или более опухолеассоциированных пептидов PRAME/антигенов HLA-I (см., например, *J Clin Invest.* 127(7):2705-18 (2017), который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с тирозиназой. В некоторых аспектах TCRm специфически связывает каталитическую субъединицу теломеразы. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с гликопротеином 100 (gp100). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с муцином 1 (MUC1). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с обратной транскриптазой теломеразы человека (hTERT). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с NYESO-1. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с MART-1. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с PRAME.

В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с вирусным антигеном. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с Env183/A2 (Hep B/HLA-A*02:01). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с KP14/1 и KP15/11 (gp160/HLAA*02:01 оболочки HIV). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с RL36A (вирус Западного Нила/мышинный H-2Db). В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с вирусным эпитопом, полученным из HTLV. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с вирусным эпитопом, полученным из гриппа. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с вирусным эпитопом, полученным из CMV. В некоторых аспектах TCRm специфически связывается с вирусным эпитопом, полученным из HIV.

III. Композиции по настоящему изобретению

III.A. Среда для культивирования клеток

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к гипотонической или изотонической среде для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 5 мМ ионов калия, как описано в данном документе. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к среде для культивирования клеток, содержащей более 40 мМ ионов калия, как описано в данном документе. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к среде для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 50 мМ ионов калия, как описано в данном документе. В некоторых аспектах среда является гипотонической. В некоторых аспектах среда является изотонической.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к среде для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и менее

[illegible][illegible]

В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 0,6 мМ, около 0,7 мМ, около 0,8 мМ, около 0,9 мМ, примерно 1,0 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ, около 1,9 мМ или около 2,0 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 0,6 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 0,7 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 0,8

мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 0,9 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,0 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,1 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,2 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,3 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,4 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,6 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,7 мМ. В некоторых аспектах концентрация ионов кальция составляет около 1,8 мМ.

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и около 1,8 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 90 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и около 1,7 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 85 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и около 1,6 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда имеет осмоляльность около 257,2 мОсморь. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 80 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и около 1,5 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 75 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и около 1,4 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 70 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и около 1,3 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 65 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и около 1,2 мМ ионов кальция. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 60 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит сахарид. В некоторых аспектах сахарид представляет собой моносахарид, дисахарид или полисахарид. В некоторых аспектах сахарид выбран из глюкозы, фруктозы, галактозы, маннозы, мальтозы, сахарозы, лактозы, трегалозы и любой их комбинации. В некоторых аспектах сахарид представляет собой глюкозу. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) глюкозу. В некоторых аспектах среда содержит (i) ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и (ii) маннозу. В некоторых аспектах среда содержит более одного сахара. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и галактозу. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и фруктозу. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и маннозу. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и мальтозу. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и сахарозу. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и лактозу. В некоторых аспектах среда содержит глюкозу и трегалозу.

В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет менее около 4,29 г/л. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы,

[illegible]

В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 10,5 мМ, около 11 мМ, около 11,5 мМ, около 12 мМ, около 12,5 мМ, около 13 мМ, около 13,5 мМ, около 14 мМ, около 14,5 мМ, около 15 мМ, около 15,5 мМ, около 16 мМ, около 16,5 мМ, около 17 мМ, около 17,5 мМ, около 18 мМ, около 18,5 мМ, около 19 мМ, около 19,5 мМ, около 20 мМ, около 20,5 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 13 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 13,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 14 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 14,5 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 15 мМ. В некоторых аспектах

концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 15,4 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 15,9 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 16,3 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 16,8 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 17,2 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара, например, глюкозы, составляет около 17,7 мМ.

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и около 17,7 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 90 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и около 17,2 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 85 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и около 16,8 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 80 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и около 16,3 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 75 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и около 15,9 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 70 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и около 15,4 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 65 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и около 15 мМ глюкозы. В некоторых аспектах среда дополнительно содержит менее 60 мМ NaCl.

В некоторых аспектах среда является изотонической. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 280 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность 280 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 1 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 2 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 3 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 4 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 5 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 6 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 7 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 8 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 9 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность $280 \text{ мОсм/л} \pm 10 \text{ мОсм/л}$. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 280 мОсм/л до около 285 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 290 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 295 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 300 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 305 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 310 мОсм/л, от около 280 мОсм/л до около 315 мОсм/л или от около 280 мОсм/л до менее чем 320 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 285 мОсм/л, около 290 мОсм/л, около 295 мОсм/л, около 300 мОсм/л, около 305 мОсм/л, около 310 мОсм/л или около 315 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность измеряют путем сложения концентраций ионов калия и NaCl и умножения на два.

мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 261 мОсм/л до около 262 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 262 мОсм/л до около 263 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 263 мОсм/л до около 264 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность от около 264 мОсм/л до около 265 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность измеряют путем сложения концентраций ионов калия и NaCl и умножения на два.

В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 100 мОсм/л, около 125 мОсм/л, около 150 мОсм/л, около 175 мОсм/л, около 200 мОсм/л, около 210 мОсм/л, около 220 мОсм/л, около 225 мОсм/л, около 230 мОсм/л, около 235 мОсм/л, около 240 мОсм/л, около 245 мОсм/л, около 250 мОсм/л, около 255 мОсм/л, около 260 мОсм/л, около 265 мОсм/л, около 270 мОсм/л или около 275 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность измеряют путем сложения концентраций ионов калия и NaCl и умножения на два.

В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 250 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 262,26 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 260 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 259,7 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 257,5 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 257,2 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 255,2 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 254,7. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 255 мОсм/л. В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 260 мОсм/л. В некоторых аспектах тоничность измеряют путем сложения концентраций ионов калия и NaCl и умножения на два.

В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ ионов натрия; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 254,7 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 50 мМ ионов калия и (i) около 80,5 мМ NaCl; (ii) около 17,7 мМ глюкозы; (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и (i) около 76 мМ ионов натрия; (ii) около 17,2 мМ глюкозы; (iii) около 1,7 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 255,2 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и (i) около 76 мМ ионов натрия; (ii) около 17,2 мМ глюкозы; (iii) и около 1,7 мМ ионов кальция; при этом среда имеет тоничность около 255,2 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 55 мМ ионов калия и (i) около 76 мМ NaCl; (ii) около 17,2 мМ глюкозы; (iii) около 1,7 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и (i) около 72,2 мМ ионов натрия; (ii) около 16,8 мМ глюкозы; (iii) около 1,6 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 257,2 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и (i) около 72,2 мМ ионов натрия; (ii) около 16,8 мМ глюкозы; и (iii) около 1,6 мМ ионов кальция; при

этом среда имеет тоничность около 257,2 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 60 мМ ионов калия и (i) около 72,2 мМ NaCl; (ii) около 16,8 мМ глюкозы; (iii) около 1,6 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и (i) около 67,6 мМ ионов натрия; (ii) около 16,3 мМ глюкозы; (iii) около 1,5 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 257,5 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и (i) около 67,6 мМ ионов натрия; (ii) около 16,3 мМ глюкозы; и (iii) около 1,5 мМ ионов кальция; при этом среда имеет тоничность около 257,5 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 65 мМ ионов калия и (i) около 67,6 мМ NaCl; (ii) около 16,3 мМ глюкозы; (iii) около 1,5 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и (i) около 63,9 мМ ионов натрия; (ii) около 15,9 мМ глюкозы; (iii) около 1,4 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 259,7 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и (i) 63,9 мМ ионов натрия; (ii) около 15,9 мМ глюкозы; и (iii) около 1,4 мМ ионов кальция; при этом среда имеет тоничность около 259,7 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 70 мМ ионов калия и (i) около 63,9 мМ NaCl; (ii) около 15,9 мМ глюкозы; (iii) около 1,4 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ ионов натрия; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 260 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) 59,3 мМ ионов натрия; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; и (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; при этом среда имеет тоничность около 260 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 75 мМ ионов калия и (i) около 59,3 мМ NaCl; (ii) около 15,4 мМ глюкозы; (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ ионов натрия; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii). В некоторых аспектах среда имеет тоничность около 262,26 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ ионов натрия; (ii) около 15 мМ глюкозы; и (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; при этом среда имеет тоничность около 262,26 мОсмоль. В некоторых аспектах среда содержит около 80 мМ ионов калия и (i) около 55,6 мМ NaCl; (ii) около 15 мМ глюкозы; (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

III.B. Клетки, полученные в соответствии со способами

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к композиции клеток, содержащей одну или несколько плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТП), культивируемых в соответствии со способами, описанными в данном документе. Некоторые аспекты настоящего изобретения

относятся к способу к композиции клеток, полученной с помощью способа увеличения выхода иммунных клеток и/или стволовых клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* при одновременном повышении стволовости иммунных клеток и/или стволовых клеток человека, включающего культивирование иммунных клеток человека и/или стволовых клеток в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 100 мМ до 30 мМ, где общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к клеточной композиции, полученной с помощью способа получения популяции иммунных клеток и/или стволовых клеток человека для иммунотерапии, включающего культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 100 мМ до 30 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к композиции клеток, полученной с помощью способа повышения стволовости иммунных клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* для иммунотерапии, включающего культивирование иммунных клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 100 мМ до 30 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ.

Клетки, культивируемые в соответствии со способами и/или в среде, которые описаны в данном документе, имеют повышенное количество менее дифференцированных клеток по сравнению с сопоставимыми клетками, культивируемыми в соответствии со стандартными способами. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, демонстрируют повышенную экспрессию одного или нескольких маркеров, типичных для фенотипа клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, проявляют повышенную эффективность трансдукции. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, проявляют повышенную жизнеспособность *in vivo* при трансплантации субъекту. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, проявляют повышенную клеточную активность. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, демонстрируют пониженное истощение клеток. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, проявляют повышенную персистенцию *in vivo* при трансплантации субъекту. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, проявляют повышенную активность *in vivo* при трансплантации субъекту. В некоторых аспектах клетки, культивируемые в соответствии со способами, описанными в данном документе, проявляют более устойчивый ответ *in vivo* при трансплантации субъекту. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека.

В некоторых аспектах по меньшей мере около 5% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 10% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 15% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 20% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 25% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 30% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 35% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 40% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 45% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах по меньшей мере около 50% клеток в клеточной композиции имеют фенотип клеток, подобных стволовым.

[illegible]

[illegible]

имеющих фенотип клеток, подобных стволовым, в композиции клеток увеличивается по меньшей мере примерно в 500 раз по сравнению с количеством клеток в композиции клеток до культивирования. В некоторых аспектах количество клеток, имеющих фенотип клеток, подобных стволовым, в композиции клеток увеличивается по меньшей мере примерно в 1000 раз по сравнению с количеством клеток в композиции клеток до культивирования.

В некоторых аспектах композиция клеток содержит иммунные клетки, например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТИЛ. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые не экспрессируют CD45R0. В некоторых аспектах клеточная композиция имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD45RA. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CCR7. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD62L. В некоторых аспектах клеточная композиция имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют TCF7. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD3. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD27. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95 и CD45RA. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95, CD45RA и CCR7. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95, CD45RA, CCR7 и CD62L. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95, CD45RA, CCR7, CD62L и TCF7. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95, CD45RA, CCR7, CD62L, TCF7 и CD27. В некоторых аспектах композиция клеток имеет повышенный процент иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, которые экспрессируют CD95, CD45RA, CCR7, CD62L, TCF7 и CD27 и которые не экспрессируют CD45R0.

В некоторых аспектах композиция клеток содержит одну или более иммунных клеток, например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ, полученных с помощью генной

инженерии. В некоторых аспектах композиция клеток содержит одну или более иммунных клеток, например, Т-клеток, NK-клеток и/или ТП, которые сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). Любой CAR, описанный в данном документе, например, в разделе II.G.1. выше, можно использовать в клетках из композиции клеток.

В некоторых аспектах композиция клеток содержит одну или более иммунных клеток, например, Т-клеток, NK-клеток и/или ТП, которые сконструированы для экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR), например, сконструированного TCR. Любой TCR, описанный в данном документе, например, в разделе II.G.2. выше, можно использовать в клетках из композиции клеток.

В некоторых аспектах композиция клеток содержит одну или более иммунных клеток, например, Т-клеток, NK-клеток и/или ТП, которые сконструированы для экспрессии TCRm. Любой TCRm, описанный в данном документе, например, в разделе II.G.3. выше, можно использовать в клетках из композиции клеток.

В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе (например, выход конечного клеточного продукта для применения в качестве терапии), содержит по меньшей мере около 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , или 5×10^9 клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , или 5×10^9 клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 12×10^{10} , 13×10^{10} , 14×10^{10} , или 15×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 1×10^6 клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 1×10^6 клеток, подобных стволовым. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 1×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 2×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 3×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 4×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 5×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном

документе, содержит по меньшей мере около 6×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 7×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 8×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 9×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 10×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 11×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 12×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 13×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 14×10^{10} клеток. В некоторых аспектах композиция клеток, полученная с помощью любого способа, описанного в данном документе, содержит по меньшей мере около 15×10^{10} клеток. В некоторых аспектах выход клеток представляет собой общее количество CD3+ клеток.

IV. Способы получения среды для культивирования клеток

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к описанным в данном документе способам получения среды для культивирования клеток. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения гипотонической или изотонической среды для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 5 мМ ионов калия. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения среды для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 50 мМ ионов калия. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам получения среды для культивирования клеток, содержащей по меньшей мере около 50 мМ ионов калия и менее 90 мМ NaCl. В некоторых аспектах среду готовят путем модификации имеющейся в продаже среды, например, базовой среды, описанной в данном документе, ионом калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и одним или более ионами натрия, ионами кальция, сахарами (например, глюкозой) и цитокином (например, IL-2, IL-7, IL-15, и/или IL-21).

В некоторых аспектах базовая среда представляет собой любую основную среду, описанную в данном документе, например базовую среду, описанную выше в разделе II.F. В некоторых аспектах базовая среда содержит ионы калия в концентрации менее 5 мМ. В некоторых аспектах базовая среда содержит ионы калия в концентрации менее 50 мМ. В некоторых аспектах базовая среда содержит один или более из ионов натрия, ионов кальция, сахара (например, глюкозы) и цитокина (например, IL-2, IL-7, IL-15, и/или IL-

21).

В некоторых аспектах базовая среда выбрана из сбалансированного солевого раствора (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS), модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), основной среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной питательной среды Глазго (GMEM), альфа-минимальной питательной среды (альфа-MEM), среды Дульбекко в модификации Искова (IMDM), M199, основной среды для экспансии Т-клеток OPTMIZER™ CTST™ (ThermoFisher), OPTMIZER™ Complete, IMMUNOCULT™ XF (STEMCELL™ Technologies), IMMUNOCULT™ XF, среды AIM V, TEXMACS™ и любой их комбинации. В некоторых аспектах базовая среда включает PRIME-XV T cell CDM. В некоторых аспектах базовая среда включает OPTMIZER™. В некоторых аспектах базовая среда включает OPTMIZER™ Pro. В некоторых аспектах базовая среда включает X-VIVO™ 15 (LONZA). В некоторых аспектах базовая среда включает IMMUNOCULT™. В некоторых аспектах базовая среда не содержит сыворотку. В некоторых аспектах базовая среда дополнительно включает заменитель сыворотки для иммунных клеток (ICSR). Например, в некоторых аспектах базовая среда включает OPTMIZER™ Complete с добавлением ICSR, AIM V с добавлением ICSR, IMMUNOCULT™ XF с добавлением ICSR, RPMI с добавлением ICSR, TEXMACS™ с добавлением ICSR или любую их комбинацию. В конкретных аспектах базовая среда содержит OPTMIZER™ Complete.

В некоторых аспектах способ приготовления среды для культивирования клеток, описанный в данном документе, включает добавление ионов калия в базовую среду до тех пор, пока не будет достигнута желаемая концентрация ионов калия. В некоторых аспектах ионы калия добавляют в базовую среду путем добавления в среду достаточного количества соли калия. В некоторых аспектах неограничивающие примеры соли калия включают аминетрихлорплатинат калия, аквапентахлоррутенат калия, дигидрат бис(оксалато)платината (II) калия, бисульфат калия, борогидрид калия, бромид калия, карбонат калия, хлорид калия, хромат калия, дихромат калия, дицианоаргентат калия, дицианоаурат калия, фторид калия, фторсульфат калия, гексахлороиридат калия, гексахлороосмат калия, гексахлоропалладат калия, гексахлороплатинат калия, гексахлорхенат калия, гексацианохромат калия, гексацианоферрат калия, гидрат гексацианорутената (II) калия, гексафторантимонат калия, гексафторникелат калия, гексафторфосфат калия, гексафтортитанат калия, гексафторцирконат калия, гексагидроксоантимонат калия, гексайодоплатинат калия, гексайодорхенат калия, гидроксид калия, йодат калия, йодид калия, манганат калия, метаванадат калия, молибдат калия, нитрат калия, нитрозодисульфат калия, дигидрат осмата (VI) калия, пентахлоронитрозилрутенат калия, перхлорат калия, перренат калия, перрутенат калия, персульфат калия, фосфат калия дибазовый, фосфат калия монобазовый, пирофосфат калия, селеноцианат калия, селеноцианат калия, тригидрат станната калия, сульфат калия, гидрат теллуриата калия, теллурид калия, тетрагидрат тетрабората калия, тетрабромоеаурат калия, тетрабромопалладат калия, тетрахлорпалладат калия, тетрахлорплатинат калия,

тетрацианопалладат калия, тетрацианоплатинат калия, тетрафторборат калия, тетранитроплатинат калия, тетратионат калия, п-толуенэтиосульфат калия и трехзамещенный моногидрат гидроксицитрата калия. В определенных аспектах соль калия включает хлорид калия (KCl). В определенных аспектах соль калия включает цитрат калия. В определенных аспектах соль калия включает гидроксицитрат калия.

В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 мМ и ионы натрия, при этом среда является гипотонической или изотонической. В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и ионы натрия. В некоторых аспектах способ приготовления среды для культивирования клеток, описанный в данном документе, включает добавление ионов натрия в базовую среду до тех пор, пока не будет достигнута желаемая концентрация ионов натрия. В некоторых аспектах ион натрия добавляют в базовую среду путем добавления одной или более солей натрия. Неограничивающие примеры солей натрия включают (мета)периодат натрия, гидрат арсенилтартрата натрия, азид натрия, бензилоксид натрия, бромид натрия, карбонат натрия, хлорид натрия, хромат натрия, циклогексанбутират натрия, этанэтиолат натрия, фторид натрия, фторфосфат натрия, формиат натрия, гидрат гексахлороиридата (III) натрия, гексагидрат гексахлороиридата (IV) натрия, гексахлороплатинат (IV) натрия гексагидрат, гексахлорходат (III) натрия, гексафторалюминат натрия, гексафторантимонат (V) натрия, гексафтоарсенат (V) натрия, гексафторферрат (III) натрия, гексафторфосфат натрия, гексафторсиликат натрия, гексагидроксиплатинат (IV) натрия, гексаметафосфат натрия, дифторид натрия, гидрогенсульфат натрия, гидрогенцианамид натрия, гидроксид натрия, йодид натрия, тетрагидрат метабората натрия, нонагидрат метасиликата натрия, метаванадат натрия, молибдат натрия, нитрат натрия, нитрит натрия, оксалат натрия, моногидрат пербората натрия, перкарбонат натрия, перхлорат натрия, периодат натрия, перманганат натрия, перренат натрия, фосфат натрия, пирофосфат натрия, селенат натрия, селенит натрия, станнат натрия, сульфат натрия, теллурид натрия, тетраборат натрия, тетраалюминат натрия, тетрахлораурат (III) натрия, тетрахлорпалладат (II) натрия, тетрахлорплатинат (II) натрия, трехзамещенный тиофосфата натрия, тиосульфат натрия, пентагидрат тиосульфата натрия, оксифторид иттрия, тринатрий триметафосфат и любые их комбинации. В определенном аспекте соль натрия включает хлорид натрия (NaCl). В определенных аспектах соль натрия включает бикарбонат натрия. В определенных аспектах соль натрия включает гидроксицитрат натрия. В определенных аспектах соль натрия включает фосфат натрия. В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 мМ и NaCl в концентрации менее чем 90 мМ. В некоторых аспектах способ приготовления среды для культивирования клеток, описанный в данном документе, включает добавление NaCl к базовой среде до тех пор, пока не будет достигнута желаемая концентрация ионов натрия, при этом общая концентрация калия и NaCl составляет более

110 mM и менее 140 mM.

В некоторых аспектах желаемая концентрация ионов натрия ниже, чем у базовой среды. Следовательно, в некоторых аспектах желаемая концентрация ионов натрия достигается путем разбавления базовой среды подходящим раствором, в котором отсутствуют ионы натрия или который имеет более низкую концентрацию ионов натрия.

В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 mM и ионы кальция, при этом среда является гипотонической или изотонической. В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 mM и ионы кальция. В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 mM, NaCl в концентрации менее 90 mM и ионы кальция. В некоторых аспектах способ приготовления среды для культивирования клеток, описанный в данном документе, включает добавление ионов кальция в базовую среду до тех пор, пока не будет достигнута желаемая концентрация ионов кальция. В некоторых аспектах ионы кальция добавляют в базовую среду путем добавления одной или более солей кальция. Неограничивающие примеры солей кальция включают бромид кальция, карбонат кальция, хлорид кальция, цианамид кальция, фторид кальция, гидрид кальция, гидроксид кальция, йодат кальция, йодид кальция, нитрат кальция, нитрит кальция, оксалат кальция, тетрагидрат перхлората кальция, однозамещенный фосфат кальция, трехзамещенный фосфат кальция, сульфат кальция, тетрагидрат тиоцианата кальция, гидроксиапатит и любую их комбинацию. В некоторых аспектах соль кальция включает хлорид кальция (CaCl_2).

В некоторых аспектах желаемая концентрация ионов кальция ниже, чем в базовой среде. Следовательно, в некоторых аспектах желаемая концентрация ионов кальция достигается путем разбавления базовой среды подходящим раствором, в котором отсутствуют ионы кальция или который имеет более низкую концентрацию ионов кальция.

В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 5 mM и сахарид, например, глюкозу, при этом среда является гипотонической или изотонической. В некоторых аспектах настоящего изобретения среда для культивирования клеток содержит ионы калия в концентрации по меньшей мере около 50 mM и сахарид, например, глюкозу. В некоторых аспектах способ получения среды для культивирования клеток, описанный в настоящем документе, включает добавление сахара, например, глюкозы, к базовой среде до тех пор, пока не будет достигнута желаемая концентрация сахара, например, глюкозы. Неограничивающие примеры сахаридов включают глюкозу, фруктозу, галактозу, маннозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, трегалозу и любую их комбинацию. В некоторых аспектах сахарид включает глюкозу.

В некоторых аспектах желаемая концентрация сахара, например, глюкозы, ниже,

чем в базовой среде. Следовательно, в некоторых аспектах желаемая концентрация сахараида, например, глюкозы, достигается путем разбавления базовой среды подходящим раствором, не содержащим сахараида, например, глюкозы, или имеющим более низкую концентрацию сахараида, например, глюкозы.

В некоторых аспектах тоничность среды регулируют для достижения целевой осмоляльности. В некоторых аспектах целевая осмоляльность среды ниже осмоляльности базовой среды. В некоторых аспектах целевая осмоляльность среды выше осмоляльности базовой среды. В некоторых аспектах целевая осмоляльность среды такая же, как и осмоляльность базовой среды.

Среда может быть гипотонической, изотонической или гипертонической. На тоничность среды может влиять ряд факторов, в том числе концентрация ионов калия в среде. В некоторых аспектах повышенная концентрация ионов калия сочетается с увеличением или уменьшением концентрации одного или более других факторов. В некоторых аспектах это сочетание влияет на тоничность среды. В некоторых аспектах концентрация ионов калия увеличивается, тогда как концентрация ионов натрия снижается. В некоторых аспектах концентрация ионов калия увеличивается, в то время как концентрация сахараида, например, глюкозы, снижается. В некоторых аспектах концентрация ионов калия увеличивается, тогда как концентрация ионов кальция снижается. В некоторых аспектах концентрация ионов калия повышается, тогда как концентрации ионов натрия и сахараида, например, глюкозы, снижаются. В некоторых аспектах концентрация ионов калия увеличивается, тогда как концентрация ионов натрия и ионов кальция снижается. В некоторых аспектах концентрация ионов калия увеличивается, тогда как концентрация ионов натрия, сахараида (например, глюкозы) и ионов кальция снижается. В некоторых аспектах концентрацию ионов калия, ионов натрия и/или сахараида (например, глюкозы) регулируют для получения целевой тоничности.

IV. Способы лечения

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к популяции клеток, например, плюрипотентных, мультипотентных и/или иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток и/или ТИЛ), культивируемых в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых аспектах клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых аспектах клетки представляют собой НК-клетки. В некоторых аспектах иммунные клетки, например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТИЛ, выделяют у субъекта-человека. В некоторых аспектах иммунные клетки представляют собой опухоль-инфильтрирующие Т-клетки или опухоль-инфильтрирующие НК-клетки. В некоторых аспектах сконструированы иммунные клетки, например Т-клетки, НК-клетки и/или ТИЛ. В некоторых аспектах иммунные клетки, например Т-клетки, НК-клетки и/или ТИЛ, сконструированы таким образом, чтобы они содержали химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах иммунные клетки, например Т-клетки, НК-клетки и/или

ТН, сконструированы таким образом, чтобы они содержали сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых аспектах TCR распознает неоантиген, идентифицированный у пациента со злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах иммунная клетка, например, Т-клетки, НК-клетки и/или ТН, содержит CAR. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку. В некоторых аспектах Т-клетка представляет собой клетку Th1, Th2, Th17 или Tc17. В некоторых аспектах CAR-экспрессирующая клетка представляет собой CAR-Т-клетку, например, моно CAR-Т-клетку, CAR-Т-клетку с отредактированным геномом, двойную CAR-Т-клетку или тандемную CAR-Т-клетку. Примеры таких CAR Т-клеток представлены в международной заявке № PCT/US2019/044195.

В некоторых аспектах клетка содержит конструкцию, экспрессирующую антигенный рецептор и/или другой дополнительный полипептид. В некоторых аспектах антигенный рецептор содержит антитело, сконструированное антитело, такое как scFv, CAR, сконструированный TCR, имитатор TCR (например, антитело - рецептор Т-клетки (abTCR) или химерное антитело - рецептор Т-клетки (caTCR)) или химерный сигнальный рецептор (CSR). Например, TCR может содержать сконструированный TCR, в котором антигенсвязывающий домен TCR (например, альфа/бета TCR или гамма/дельта TCR) заменен доменом антитела (с или без константных доменов антител); затем сконструированный TCR становится специфичным к антигену антитела, сохраняя при этом сигнальные функции TCR. Химерный сигнальный рецептор может содержать (1) внеклеточный связывающий домен (например, внеклеточный домен природного/модифицированного рецептора, внеклеточный домен природного/модифицированного лиганда, scFv, нанотело, Fab, DARPIn и аффитело), (2) трансмембранный домен и (3) внутриклеточный сигнальный домен (например, домен, который активирует факторы транскрипции или рекрутирует и/или активирует JAK/STAT, киназы, фосфатазы и убиквитин, SH3, SH2 и PDZ). См., например, EP340793B1, WO 2017/070608, WO 2018/200582, WO 2018/200583, WO 2018/200585, и Xu et al., Cell Discovery (2018) 4:62.

В некоторых аспектах антигенный рецептор нацелен на представляющий интерес антиген (например, опухолевый антиген или антиген патогена). Антигены могут включать, без ограничения, AFP (альфа-фетопротеин), $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ или другой интегрин, BCMA, Braf, B7-H3, B7-H6, CA9 (карбоангидразу 9), CCL-1 (лиганд 1 хемокина, содержащего мотив C-C), CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD47, CD56, CD66e, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD98, CD123, CD138, CD171, CD352, CEA (карциноэмбриональный антиген), клаудин 18.2, клаудин 6, c-MET, DLL3 (дельта-подобный белок 3), DLL4, ENPP3 (член семейства эктонуклеотид-пирофосфатазы/фосфодиэстеразы 3), EpCAM, EPG-2 (эпителиальный гликопротеин 2), EPG-40, эфрин B2, EPHa2 (рецептор эфрина A2), димеры ERBB, рецептор эстрогена, ETBR (рецептор эндотелина B), FAP- α (белок активации фибробластов α), фетальный AchR (фетальный рецептор ацетилхолина), FBP (фолат-

связывающий белок), FCRL5, FR- α (фолатный рецептор альфа), GCC (гуанилциклазу C), GD2, GD3, GPC2 (глипикан-2), GPC3, gp100 (гликопротеин 100), GPNMB (гликопротеин NMB), GPRC5D (сопряженный с G-белком рецептор 5D), HER2, HER3, HER4, поверхностный антиген гепатита В, HLA-A1 (человеческий лейкоцитарный антиген A1), HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2), HMW-MAA (человеческий меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой), IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), Ig-каппа, Ig-лямбда, IL-22Ra (рецептор IL-22 альфа), IL-13Ra2 (рецептор IL-13 альфа 2), KDR (рецептор с доменом, содержащим киназную вставку), молекулу клеточной адгезии LI (LI-CAM), Liv-1, LRRC8A (член А семейства содержащего богатые лейцином повторы белка 8), Льюис Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1 (melan A), мышиний цитомегаловирус (MCMV), MCSP (меланома-ассоциированный хондроитинсульфатный протеогликан), мезотелин, муцин 1 (MUC1), MUC16, комплексы МНС/пептид (например, HLA-A в комплексе с пептидами, полученными из AFP, KRAS, NY-ESO, MAGE-A, и WT1), NCAM (нейрональную молекулу клеточной адгезии), нектин-4, лиганды NKG2D (члена D группы 2 натуральных киллеров), NY-ESO, онкофетальный антиген, PD-1, PD-L1, PRAME (предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы), прогестероновый рецептор, PSA (простатспецифический антиген), PSCA (антиген стволовых клеток предстательной железы), PSMA (простатспецифический мембранный антиген), ROR1, ROR2, SIRP α (сигнальный регуляторный белок альфа), SLIT, SLITRK6 (NTRK-подобный белок 6), STEAP1 (шестой трансмембранный эпителиальный антиген простаты 1), сурвивин, TAG72 (опухолеассоциированный гликопротеин 72), TPBG (трофобластический гликопротеин), Trop-2, VEGFR1 (рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов), VEGFR2, и антигены HIV, HBV, HCV, HPV, и других патогенов.

В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на hTERT. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на KRAS. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на Braf. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на TGF β RII. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на MAGE A10/A4. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на AFP. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на PRAME. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на MAGE A1. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на WT-1. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на NY-ESO. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на PRAME. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на NY-ESO. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19.

В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на BCMA. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD147. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19 и CD22. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD19 и CD28. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD20. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD20 и CD19. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CD22. В некоторых аспектах

рецептор антигена нацелен на CD30. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на CEA. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на DLL3. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на EGFRvIII. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на GD2. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на HER2. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на IL-1RAP. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на мезотелин. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на метотелин. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на NKG2D. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на PSMA. В некоторых аспектах рецептор антигена нацелен на TnMUC1.

В некоторых аспектах CAR специфически связывает (т.е. мишень) один или более антигенов, экспрессированных на опухолевой клетке, такой как злокачественная В-клетка, злокачественная Т-клетка или злокачественная плазматическая клетка. В некоторых аспектах CAR специфически связывается (т.е. нацеливается) на антиген, выбранный из группы, состоящей из CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-1 IRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюиса Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатного рецептора альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gplOO, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатного рецептора альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белка спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутанта p53, протеина, сурвивина, теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутанта Ras, hTERT, точек разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитого гена ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточной части белка APRIL или любых их комбинаций.

В некоторых аспектах CAR нацелен на BCMA. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD147. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19 и CD22. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD19 и CD28. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD20. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD20 и CD19. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD22. В некоторых аспектах CAR нацелен на CD30. В некоторых аспектах CAR нацелен на CEA. В некоторых аспектах CAR нацелен на DLL3. В некоторых аспектах CAR нацелен на EGFRvIII. В некоторых аспектах CAR нацелен на GD2. В некоторых аспектах CAR нацелен на HER2. В некоторых

аспектах CAR нацелен на IL-1RAP. В некоторых аспектах CAR нацелен на мезотелин. В некоторых аспектах CAR нацелен на метотелин. В некоторых аспектах CAR нацелен на NKG2D. В некоторых аспектах CAR нацелен на PSMA. В некоторых аспектах CAR нацелен на TnMUC1.

В некоторых аспектах иммунная клетка, например, Т-клетка, НК-клетка и/или ТП, описанная в данном документе, содержит Т-клеточный рецептор (TCR), например, сконструированный TCR. В некоторых аспектах сконструированный TCR специфически связывается с опухолевым антигеном. В контексте данного документа термин «сконструированный TCR» или «сконструированный Т-клеточный рецептор» относится к Т-клеточному рецептору (TCR), сконструированному для специфического связывания с желаемой аффинностью с главным комплексом гистосовместимости (МНС)/пептидным антигеном-мишенью, который выбирается, клонируется и/или впоследствии вводится в популяцию Т-клеток.

В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. мишень) один или более антигенов, экспрессированных на опухолевой клетке, такой как злокачественная В-клетка, злокачественная Т-клетка или злокачественная плазматическая клетка.

В некоторых аспектах сконструированная клетка по настоящему изобретению экспрессирует Т-клеточный рецептор (TCR), нацеленный на антиген. В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR нацелены на общие опухолеассоциированные антигены (общие ТАА). В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR нацелены на уникальные опухолеассоциированные антигены (уникальные ТАА). В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR нацелены на опухолеспецифические антигены. В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут нацеливаться на антиген СТ, например, меланома-ассоциированный антиген (MAGE), включая, но не ограничиваясь этим, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9.23, MAGE-A10, и MAGE-A12. В некоторых аспектах, клетки со сконструированным TCR могут быть нацелены на гликопротеин (gp100), антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками (MART-1), и/или тирозиназу, которые в основном обнаруживаются в меланомах и нормальных меланоцитах. В некоторых аспектах, клетки со сконструированными TCR могут быть нацелены на опухоль Вильмса 1 (WT1), т.е. один из видов сверхэкспрессированного антигена, который высоко экспрессируется в большинстве острых миелоидных лейкозов (AML), острых лимфоидных лейкозах, почти каждом типе солидных опухолей и нескольких критических тканях, таких как ткани сердца. В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут нацеливаться на мезотелин, другой вид сверхэкспрессированного антигена, который в высокой степени экспрессируется в мезотелиоме, но также присутствует в мезотелиальных клетках некоторых тканей, включая трахею.

В некоторых аспектах клетки со сконструированным TCR могут нацеливаться на любой неоантиген, который может образовываться в результате случайных соматических мутаций, специфичных для отдельных опухолей. В некоторых аспектах TCR

специфически связывает (т.е. нацеливается на) раковый антиген, выбранный из группы, состоящей из AFP, CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелина, IL-1 IRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, Льюиса Y, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатного рецептора альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазы, PAP, ELF2M, эфрина B2, рецептора IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназы, EphA2, фукозил-GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатного рецептора альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловой кислоты, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаина, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белка спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственного антигена 1, p53, мутанта p53, простеина, сурвивина, теломеразы, PCTA-1/галектина 8, MelanA/MART1, мутанта Ras, hTERT, точек разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитого гена ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогенового рецептора, циклина B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратной транскриптазы теломеразы человека, RU1, RU2, кишечной карбоксилэстеразы, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточной части белка APRIL или любых их комбинаций.

В определенных аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) hTERT. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) KRAS. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) Braf. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) TGF β RII. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) MAGE A10/A4. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) AFP. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) PRAME. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) MAGE A1. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) WT-1. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) NY-ESO. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) PRAME. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) NY-ESO. В некоторых аспектах TCR специфически связывает (т.е. нацеливается на) CD19. В некоторых аспектах TCR специфически связывает неоантиген, идентифицированный у пациента со злокачественным новообразованием.

В некоторых аспектах клетку, например, плюрипотентную клетку, мультипотентную клетку или иммунную клетку (например, Т-клетку, НК-клетку или TIL), вводят нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых аспектах клетку, например, плюрипотентную клетку, мультипотентную клетку или иммунную клетку (например, Т-клетку, НК-клетку или TIL), полученную с использованием способов, описанных в

данном документе, вводят субъекту для лечения злокачественного новообразования, например, опухоли. В некоторых аспектах способ лечения включает введение субъекту эффективного количества клеточной композиции по настоящему изобретению, например, клетки, полученной в соответствии со способами, описанными в данном документе, например, Т-клетки, экспрессирующей химерный полипептид или TCR, описанные в данном документе.

В настоящем изобретении также предложен способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на целевую популяцию клеток или ткань у субъекта, включающий введение эффективного количества композиции клеток по настоящему изобретению, например, клетки, полученной в соответствии с описанными способами в данном документе, например, Т-клетки, экспрессирующей химерный полипептид или TCR, описанные в данном документе.

В настоящем изобретении также предложен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту композиции клеток по настоящему изобретению, например, клетки, полученной в соответствии со способами, описанными в данном документе, например, Т-клетки, экспрессирующей химерный полипептид или TCR, описанные в данном документе.

В некоторых аспектах клетка, вводимая в композицию клеток по настоящему изобретению, представляет собой Т-клетку. В некоторых аспектах клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

В некоторых аспектах введение клеточной композиции по настоящему изобретению (например, иммунной клетки, такой как Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученную в соответствии со способами, описанными в данном документе), уменьшает объем опухоли у субъекта по сравнению с эталонным объемом опухоли. В некоторых аспектах эталонный объем опухоли представляет собой объем опухоли у субъекта до введения сконструированной клетки. В дополнительных аспектах эталонный объем опухоли представляет собой объем опухоли у соответствующего субъекта, которому не вводили ее. В некоторых аспектах объем опухоли у субъекта уменьшается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на по меньшей мере около 100% после введения по сравнению с эталонным объемом опухоли.

В некоторых аспектах лечение опухоли включает уменьшение массы опухоли у субъекта. В некоторых аспектах введение клеточной композиции по настоящему изобретению (например, иммунной клетки, такой как Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученную в соответствии со способами, описанными в данном документе) может снизить массу опухоли у субъекта при введении субъекту. В некоторых аспектах масса опухоли уменьшается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%,

по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или на по меньшей мере около 100% после введения по сравнению с эталонной массой опухоли. В некоторых аспектах эталонная масса опухоли представляет собой массу опухоли у субъекта до введения композиции клеток по настоящему изобретению. В дополнительных аспектах эталонная масса опухоли представляет собой массу опухоли у соответствующего субъекта, которому не вводили ее.

В некоторых аспектах введение композиции клеток по настоящему изобретению (например, иммунной клетки, например, Т-клетки, экспрессирующей CAR или TCR, полученной в соответствии со способами, описанными в данном документе) субъекту, например, имеющему опухоль, может увеличить количество и/или процент TIL (например, CD4⁺ или CD8⁺) в опухоли и/или микроокружении опухоли (TME) у субъекта. В определенных аспектах количество и/или процентное содержание TILs в опухоли и/или TME увеличивается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 110%, по меньшей мере около 120%, по меньшей мере около 130%, по меньшей мере около 140%, по меньшей мере около 150%, по меньшей мере около 160%, по меньшей мере около 170%, по меньшей мере около 180%, по меньшей мере около 190%, по меньшей мере около 200%, по меньшей мере около 210%, по меньшей мере около 220%, по меньшей мере около 230%, по меньшей мере около 240%, по меньшей мере около 250%, по меньшей мере около 260%, по меньшей мере около 270%, по меньшей мере около 280%, по меньшей мере около 290% или на по меньшей мере около 300% или более по сравнению с эталоном (например, соответствующее значение у субъекта, который не получал композицию клеток по настоящему изобретению, или у того же субъекта до введения композиции клеток по настоящему изобретению).

В некоторых аспектах введение композиции клеток по настоящему изобретению (например, иммунной клетки, например, Т-клетки, экспрессирующей CAR или TCR, полученной в соответствии со способами, описанными в данном документе) субъекту, например, имеющему опухоль, может увеличить продолжительность иммунного ответа у субъекта по отношению к продолжительности иммунного ответа у субъекта, получающего аналогичную клеточную терапию, включающую клетки, полученные в соответствии со стандартными способами, например, культивируемые в среде, не содержащей ионов калия в концентрации по меньшей мере 50 mM. В некоторых аспектах продолжительность иммунного ответа увеличивается на по меньшей мере около 10%, по

меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 100%, по меньшей мере около 150%, по меньшей мере около 200%, по меньшей мере около 300%, по меньшей мере около 400%, по меньшей мере около 500% или на по меньшей мере около 1000% или более по сравнению с эталоном (например, у субъекта, получающего аналогичную клеточную терапию, включающую клетки, полученные в соответствии со стандартными способами, например, культивируемые в среде, не содержащей ионов калия в концентрации по меньшей мере 50 мМ). В некоторых аспектах продолжительность иммунного ответа увеличивается в по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз или по меньшей мере около 10 раз или более по сравнению с эталоном (например, у субъекта, получающего аналогичную клеточную терапию, включающую клетки, полученные в соответствии со стандартными способами, например, культивируемые в среде, не содержащей ионов калия в концентрации по меньшей мере 50 мМ).

В дополнение к вышеизложенному, введение композиции клеток по настоящему изобретению (например, иммунной клетки, например, Т-клетки, экспрессирующей CAR или TCR, полученной в соответствии с описанными в данном документе способами) может оказывать другие эффекты, которые могут способствовать лечению опухоли.

Как описано в данном документе, композиция клеток по настоящему изобретению (например, иммунная клетка, например, Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученная в соответствии со способами, описанными в данном документе) может быть использована для лечения различных типов злокачественного новообразования, например, опухоли, происходящей из злокачественного новообразования, включающего рак молочной железы, рак головы и шеи, рак матки, рак головного мозга, рак кожи, рак почки, рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак глаза, рак желудка (гастральный рак), рак желудочно-кишечного тракта, рак яичников, карциному, саркому, лейкоз, лимфому, миелому или их комбинацию.

В некоторых аспектах композиция клеток по настоящему изобретению (например, иммунная клетка, например, Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученная в соответствии со способами, описанными в данном документе) может быть использована в комбинации с другими терапевтическими агентами (например, противораковыми агентами и/или иммуномодулирующими агентами). Соответственно, в некоторых аспектах способ лечения опухоли, описанный в данном документе, включает введение композиции клеток по настоящему изобретению в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

В некоторых аспектах композиция клеток по настоящему изобретению (например, иммунная клетка, например, Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученная в

соответствии со способами, описанными в данном документе) может быть применена в комбинации с одним или более противораковыми агентами, так что мишенью могут быть несколько элементов иммунного пути. В некоторых аспектах противораковое средство содержит ингибитор иммунных контрольных точек (т. е. блокирует передачу сигналов через конкретный путь иммунных контрольных точек).

Неограничивающие примеры ингибиторов иммунных контрольных точек, которые можно использовать в настоящих способах, включают антагонист CTLA-4 (например, антитело к CTLA-4), антагонист PD-1 (например, антитело к PD-1, антитело к PD-L1), антагонист TIM-3 (например, антитело к TIM-3) или их комбинации. В некоторых аспектах ингибитор контрольной точки представляет собой антагонист PD-1. В некоторых аспектах ингибитор контрольной точки представляет собой антитело к PD-1. В некоторых аспектах ингибитор контрольной точки представляет собой антитело к PD-L1. Исчерпывающий и не ограничивающий список комбинированных методов лечения подробно описан в другом месте этой заявки.

В некоторых аспектах композицию клеток по настоящему изобретению (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии с описанными в данном документе способами) вводят субъекту до или после введения дополнительного терапевтического агента. В других аспектах композицию клеток по настоящему изобретению (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии с описанными в данном документе способами) вводят субъекту одновременно с дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых аспектах композицию клеток по настоящему изобретению (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии со способами, описанными в данном документе) и дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемый носитель. В других аспектах композицию клеток по настоящему изобретению (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии со способами, описанными в данном документе) и дополнительный терапевтический агент вводят одновременно в виде отдельных композиций.

В некоторых аспектах субъект представляет собой животное, отличное от человека, такое как крыса или мышь. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека.

В некоторых аспектах композиция клеток, описанная в данном документе (например, иммунная клетка, например, Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученная в соответствии со способами, описанными в данном документе), может быть использована в комбинации с другими терапевтическими агентами (например, противораковыми агентами и/или иммуномодулирующими агентами). Соответственно, в некоторых аспектах способ лечения опухоли, описанный в данном документе, включает введение композиции клеток по настоящему изобретению (например, иммунной клетки, например, Т-клетки, экспрессирующей CAR или TCR, полученной в соответствии со

способами, описанными в данном документе) в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами субъекту. Такие агенты могут включать, например, химиотерапевтическое лекарственное средство, таргетную противораковую терапию, онколитический препарат, цитотоксический агент, иммунную терапию, цитокин, хирургическую процедуру, радиационную процедуру, активатор костимулирующей молекулы, ингибитор иммунной контрольной точки, вакцину, клеточную иммунотерапию или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах композиция клеток, описанная в данном документе (например, иммунная клетка, например, Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученная в соответствии со способами, описанными в данном документе), может использоваться в комбинации со стандартным лечением (например, хирургическим вмешательством, лучевой терапией и химиотерапией). Описанные в данном документе способы также можно использовать в качестве поддерживающей терапии, например, терапии, предназначенной для предотвращения возникновения или рецидива опухолей.

В некоторых аспектах композиция клеток по настоящему изобретению (например, иммунная клетка, например, Т-клетка, экспрессирующая CAR или TCR, полученная в соответствии со способами, описанными в данном документе) может быть применена в комбинации с одним или более противораковыми агентами, так что мишенью могут быть несколько элементов иммунного пути. Неограничивающие примеры таких комбинаций включают: терапию, которая усиливает презентацию опухолевого антигена (например, вакцину на основе дендритных клеток, клеточные вакцины, секретирующие GM-CSF, CpG-олигонуклеотиды, имиквимод); терапию, которая ингибирует негативную иммунную регуляцию, например, путем ингибирования пути CTLA-4 и/или PD-1/PD-L1/PD-L2 и/или истощения или блокирования Treg или других иммуносупрессивных клеток (например, супрессорных клеток миелоидного происхождения); терапию, которая стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, агонистами, которые стимулируют путь CD-137, OX-40 и/или CD40 или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапию, системно повышающую частоту противоопухолевых Т-клеток; терапию, которая истощает или ингибирует Treg, например, Treg в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем истощения анти-CD25 частицами *ex vivo*; терапию, влияющую на функцию миелоидных супрессорных клеток в опухоли; терапию, повышающую иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); адоптивный перенос Т-клеток или NK-клеток, включая генетически сконструированные клетки, например, клетки, сконструированные для экспрессии химерного антигенного рецептора (терапию CAR-T); терапию, которая ингибирует метаболический фермент, например, индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтетазу оксида азота; терапию, которая устраняет/предотвращает анемию или истощение Т-клеток; терапию, которая вызывает активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в опухолевом очаге; введение иммуностимулирующих цитокинов; блокирование иммуносупрессивных цитокинов; или

любую их комбинацию.

В некоторых аспектах противораковое средство содержит ингибитор иммунных контрольных точек (т. е. блокирует передачу сигналов через конкретный путь иммунных контрольных точек). Неограничивающие примеры ингибиторов иммунных контрольных точек, которые можно использовать в настоящих способах, включают антагонист CTLA-4 (например, антитело к CTLA-4), антагонист PD-1 (например, антитело к PD-1, антитело к PD-L1), антагонист TIM-3 (например, антитело к TIM-3) или их комбинации. Неограничивающие примеры таких ингибиторов иммунных контрольных точек включают следующее: антитело к PD1 (например, ниволумаб (OPDIVO[®]), пембролизумаб (KEYTRUDA[®]; МК-3475), пидилизумаб (CT-011), PDR001, MEDI0680 (AMP-514), TSR-042, REGN2810, JS001, AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, BGB-A317, BI 754091, SHR-1210 и их комбинации); антитело к PD-L1 (например, атезолизумаб (TECENTRIQ[®]; RG7446; MPDL3280A; RO5541267), дурвалумаб (MEDI4736, IMFINZI[®]), BMS-936559, авелумаб (BAVENCIO[®]), LY3300054, CX-072 (Proclaim-CX-072), FAZ053, KN035, MDX-1105 и их комбинации); и антитело к CTLA-4 (например, ипилимумаб (YERVOY[®]), тремелиумаб (тицилимумаб; CP-675, 206), AGEN-1884, ATOR-1015 и их комбинации).

В некоторых аспектах противораковый агент включает активатор иммунных контрольных точек (т. е. способствует сигналингу через конкретный путь иммунных контрольных точек). В определенных аспектах активатор иммунной контрольной точки включает агонист OX40 (например, антитело к OX40), агонист LAG-3 (например, антитело к LAG-3), агонист 4-1BB (CD137) (например, антитело к CD137), GITR, агонист (например, антитело к GITR), агонист TIM3 (например, к против TIM3) или их комбинации.

В некоторых аспектах композицию клеток, описанную в данном документе, (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии с описанными в данном документе способами) вводят субъекту до или после введения дополнительного терапевтического агента. В других аспектах композицию клеток, описанную в данном документе, (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии с описанными в данном документе способами) вводят субъекту одновременно с дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых аспектах композицию клеток, описанную в данном документе, (например, иммунную клетку, например, Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученная в соответствии со способами, описанными в данном документе) и дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемый носитель. В других аспектах композицию клеток, описанную в данном документе, (например, иммунную клетку, такую как Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии со способами, описанными в данном документе), и дополнительный терапевтический агент вводят одновременно в виде отдельных композиций. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент и

композицию клеток, описанную в данном документе, (например, иммунную клетку, например Т-клетку, экспрессирующую CAR или TCR, полученную в соответствии со способами, описанными в данном документе) вводят последовательно.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения аутоиммунного заболевания, включающим введение клетки, например, клетки Treg, культивируемой в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения воспалительной патологии, включающим введение клетки, например, клетки Treg, культивируемой в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах воспалительная патология включает синдром высвобождения цитокинов. В некоторых аспектах воспалительная патология включает сепсис. В некоторых аспектах воспалительная патология включает болезнь «трансплантат против хозяина». В некоторых аспектах сконструирована клетка, например, клетка Treg.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Способы

Приготовление среды: кондиционированная Т-клетками среда (TCM), была дополнена заменителем сыворотки для иммунных клеток (Thermo Fisher), 2 mM L-глутамина (Gibco), 2 mM глутамакса (Gibco), раствором заменимых аминокислот MEM (Gibco), пируватом натрия (Gibco), IL-2, 200 ME/мл; IL-7 120 ME/мл; IL-15, 20 ME/мл.

Для гипотонической кондиционированной среды среду TCM с различными концентрациями натрия, калия, глюкозы и кальция регулировали добавлением NaCl, глюкозы и RPMI, не содержащей кальция. После добавления не содержащей NaCl RPMI определенного состава к TCM конечные концентрации находились в диапазоне: NaCl (40-80 mM), KCl (40-80 mM), кальций (0,5-2,8 mM), глюкоза (10-24 mM) и осмоляльность (~250-260 мОсмоль). См. таблицу 1.

Таблица 1. Гипотоническая кондиционированная среда с различными концентрациями калия, натрия, глюкозы и кальция

Среда	К (mM)	NaCl (mM)	Глюкоза (mM)	Са (mM)	Осмоляль ность (мОсмоль)	Тонич ность* (мОсмоль)
Базовая среда	4	118,4 7	~24 mM	~2,8 mM	245	245
Гипер К	80 mM	55,6 mM	15 mM	1,2 mM	~262,26	271,2
Гипер К	75	59,3	15,4	1,3	~260	268,6
Гипер К	70	63,9	15,9	1,4	~259,7	267,8
Гипер К	65	67,6	16,3	1,5	~257,5	265,2

Гипер К	60	72,2	16,8	1,6	~257,2	264,4
Гипер К	55	76	17,2	1,7	~255,2	262
Гипер К	50	80,5	17,7	1,8	~254,7	261
RPMI Gibco+ICSR	5,34	103	11,1	0,4		216,7
RPMI 1640+ 50 мМ К+	55,34	103				316,7

*Тоничность рассчитывается по следующей формуле: $2 \times X$ (концентрация К+концентрация NaCl)

Мы также проверили влияние тоничности на Т-клетки, поддерживая условия постоянной тоничности (250 мОсмоль - гипотоническая, 280 мОсмоль - изотоническая, 320 мОсмоль - гипертоническая) с различными концентрациями калия. Конечные концентрации в гипотонических условиях, NaCl (35-75 мМ), KCl (50-90 мМ), конечные концентрации в изотонических условиях NaCl (50-90 мМ), KCl (50-90 мМ), конечные концентрации в гипертонических условиях NaCl (70-110 мМ), KCl (50-90 мМ). См. таблицу 2.

Таблица 2. Гипотонические, изотонические, гипертонические растворы с различными концентрациями калия и NaCl

Тоничность*	мОсмоль	К (мМ)	NaCl (мМ)
Гипотонический	250	50	75
		60	65
		70	55
		80	45
		90	35
Изотонический	280	50	90
		60	80
		70	70
		80	60
		90	50
Гипертонический	320	50	110
		60	100
		70	90
		80	80
		90	70

* Тоничность рассчитывается по формуле: Тоничность= $([K] + [NaCl]) \times 2$

где «[K]» представляет собой концентрацию калия, а «[NaCl]» представляет собой концентрацию хлорида натрия в среде.

Культура клеток и трансдукция: Криоконсервированные CD4 и CD8 клетки здорового донора активировали с помощью TransAct (Miltenyi) в кондиционированной Т-клетками среде, TCM, базовой среде или гипотонической кондиционированной среде. Через 24 часа после активации в TCM или гипотонической кондиционированной среде Т-клетки трансдуцировали лентивирусными частицами для введения химерного антигенного рецептора (CAR к CD19) в планшеты Grex (Wilson Wolf). На следующий день после трансдукции к Т-клеткам добавляли свежую среду, чтобы разбавить TransAct и завершить активацию Т-клеток. В зависимости от роста и плотности клеток Т-клетки подпитывали теплой 2X цитокиновой средой путем аспирации половины среды в планшете Grex. На 7-й день клетки собирали, подсчитывали и анализировали на экспрессию маркеров стволовости с помощью проточной цитометрии.

Анализ внутриклеточных цитокинов: на 7-й день Т-клетки промывали и помещали в контрольную среду и подвергали 5-часовой повторной стимуляции форболмиристатацетатом (PMA) и иономицином в присутствии брефельдина А для измерения внутриклеточных цитокинов, IL-2, IFN γ , и TNF α . Т-клетки окрашивали поверхностными антителами в буфере для FACS, содержащем раствор фиксируемого красителя LIVE/DEAD. Клетки окрашивали соответствующими антителами к внутриклеточным цитокинам после фиксации и пермеабиллизации. Количественную оценку экспрессии внутриклеточных цитокинов выполняли с помощью проточной цитометрии.

Измерение экспрессии CAR при фенотипе стволовости с помощью проточной цитометрии: на 7-й день живые Т-клетки из соответствующих комбинаций условий оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки сначала промывали буфером для окрашивания клеток и окрашивали анти-CCR7 в течение 15 минут при 37°C. После этого к клеткам добавляли 2х мастер-микс антител к нескольким другим антигенам (как подробно описано ниже) и инкубировали в течение 20 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для окрашивания клеток и пермеабиллизировали с помощью набора для окрашивания foxp3 (ebioscience) в соответствии с протоколом производителя. После фиксации клетки окрашивали на TCF7 в течение двадцати минут при 4°C, после чего клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на Aurora (Cytex). Ниже приведен перечень антител, используемых для оценки маркеров стволовости: CD8 (BD-№563795), CD4 (BD-№ 612936), CD27 (BD-№612829), CD3 (Thermo-№ 612893), CD28 (Biolegend- №302936), CD62L, CAR-EGFR (Thermo-№352911), CD45RO (BD-№564290), CD39 (Biolegend- №328236), TCF7 (Cell signaling -№14456), CCR7 (BD-№562381), CD127 (Bio legend- №351324), CD45RA (BD-№560673)

Пример 2. Результаты

Множественные способы манипулирования компонентами среды могут привести к значительным изменениям получаемого Т-клеточного продукта. В целом, мы осуществляли манипуляции одним или более из следующих параметров: тоничность, неорганические соли, питательные вещества (глюкоза) и/или содержание цитокинов как

последовательно, так и параллельно. Мы начали с манипулирования тоничностью разбавителя, чтобы оценить его роль во влиянии на окончательную стволовость Т-клеток, что оценивалось по нескольким поверхностным маркерам. Чтобы обобщить стволовость конечной популяции Т-клеток, мы изобразили схему гейтирования в проточной цитометрии для количественного определения относительной популяции желаемой субпопуляции Т-клеток с наивысшей степенью относительной стволовости (**Фиг. 1А**). Изображенная схема проточной цитометрии является общепринятым аналогом предполагаемой стволовости, метаболической функции и поведения полученных Т-клеток *in vivo* (**Фиг. 1В**).

Мы количественно оценили эффект этих воздействий по относительному количеству Т-клеток, которые были CD3⁺, CD45RO⁺, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, и TCF7⁺, по оценке с помощью подсчета клеток и полихроматической проточной цитометрии (**Фиг. 2А-2F**). В тандеме с тоничностью мы одновременно изменяли Na⁺, K⁺, и Ca²⁺, поскольку все они, как отмечается, играют роль в контроле судьбы и функции Т-клеток (Trebak & Kinet, Nature reviews (2019), Verkhatsky et al, Exp. Physio (2019)). Хлорид дополнительно изменяли совместно с изменениями описанных катионных ионов. Мы обнаружили, что относительно «гипотонический» раствор с повышенной концентрацией калия, более низкой концентрацией Na и пониженной концентрацией Ca приводит к образованию наибольшего количества клеток, подобных стволовым, (**Фиг. 2А-2F**). В частности, культура Т-клеток в гипотонической среде (< 280 мОсм/л), содержащей 50 мМ, 55 мМ или 60 мМ калия, имела по меньшей мере 1-кратное увеличение и до 2,5-кратного увеличения (как правило, ближе к верхнему пределу диапазона) в относительном количестве клеток, подобных стволовым, по сравнению с Т-клетками, культивируемыми в контрольных средах. Кроме того, культура Т-клеток в гипотонической среде, содержащей 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ или 90 мМ калия, имела по меньшей мере 2,5-кратное увеличение и до 15-кратного увеличения (как правило, по меньшей мере 4-5-кратное увеличение) в относительном количестве клеток, подобных стволовым, по сравнению с Т-клетками, культивируемыми в контрольных средах. Аналогично, Т-клетки, культивируемые в изотонической среде (~270-300 мОсм/л), содержащей 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ или 70 мМ калия, имела по меньшей мере 1-кратное увеличение и до 2,5-кратного увеличения (как правило, ближе к верхнему пределу диапазона) в относительном количестве клеток, подобных стволовым, по сравнению с Т-клетками, культивируемыми в контрольных средах.

Повышенные уровни калия, как правило, коррелируют с приемлемым или даже улучшенным выходом клеток в определенной степени. В частности, Т-клетки, культивируемые в гипотонической среде или изотонической среде, содержащей 50 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ или 75 мМ калия, имели терапевтически приемлемый выход клеток по сравнению с Т-клетками, культивируемыми в контрольной среде. И наоборот, повышение концентрации K⁺ выше 70-75 мМ было воспроизводимо снижало выход клеток у нескольких доноров (**Фиг. 2D-2F**).

Во время этих титрований дополнительно регулировали концентрацию глюкозы. Сообщалось, что ограничение питательных веществ способствует стволовости и продолжительности жизни Т-клеток, а ингибирование гликолиза способствует стволовости. Наоборот, более высокие концентрации глюкозы способствуют эффекторной функции и одновременной потере стволовости. В соответствии с этим состав среды, который демонстрировал наиболее желаемый профиль Т-клеток, имел более низкую концентрацию глюкозы. Таким образом, мы делаем вывод, что среда с измененным составом с наиболее желаемым клеточным продуктом, состоящая из наибольшего количества Т-клеток, подобных стволовым, является гипотонической, умеренно гиперкалиемической, гипонатриемической, гипокальциемической и гипогликемической по сравнению с условиями контрольной среды.

При титровании ионных солей в гипотонических условиях культивирования (**Фиг. 3А**) мы обнаружили повышенную экспрессию $CD45RA^+$ вместе с молекулами для хоминга в лимфоузлы $CCR7^+$ $CD62L^+$, и ассоциированным с персистенцией Т-клеток маркером $CD27$ (**Фиг. 3В-3D**). В таблице 1 показаны все среды с калием (50-90 мМ), хлоридом натрия (50-90 мМ), глюкозой (15-20 мМ), кальцием (1,2-2,0 мМ), осмоляльностью и тоничностью. В таблицу 1 также включены контрольные среды, например, гипертоническая среда с повышенным содержанием калия (55,3 мМ) в базовой среде RPMI, которая содержит около 103 мМ NaCl (данные для этого эксперимента не показаны). По сравнению с контрольными условиями гипотоническая среда с повышенным содержанием калия приводила к увеличению на ~30-50% экспрессии $CD45RA^+$, $CCR7^+$, увеличению на ~30-50% экспрессии $CD45RA^+$, $CD62L^+$ и увеличению на ~10-20% $CCR7^+CD27^+$ клеток (**Фиг. 3В-3D**). $CD39$ представляет собой экто-АТФ/АДФазу, экспрессируемую на активированных Т-клетках и участвующую в эффекторной дифференцировке, истощении и апоптозе Т-клеток. Повышенная экспрессия $CD39$ является показателем ускоренного старения и соответствующей потери фенотипа клеток, подобных стволовым. По сравнению с контрольными условиями гипотоническая кондиционированная среда приводила к снижению экспрессии $CD39^+$ примерно на 20-30% (**Фиг. 3Е**). Эти результаты демонстрируют, что повышенный уровень калия обогащает менее дифференцированные клетки, предотвращая истощение Т-клеток. Результаты также демонстрируют, что гипотоническое кондиционирование увеличивает экспрессию $TCF7$ и снижает экспрессию $CD39$ в CAR^+ Т-клетках (**Фиг. 3Е**). Фактор транскрипции $TCF7$ играет важную роль в поддержании фенотипа клеток, подобных стволовым Т-клеткам, и способности к самообновлению и продуцированию большего количества эффекторных Т-клеток. По сравнению с контрольными условиями среда с повышенным содержанием калия в диапазоне от 60 мМ до 80 мМ приводила к повышению экспрессии $TCF7^+$ на ~20-40% (**Фиг. 3F-3G**). Эти результаты демонстрируют, что гипотоническое кондиционирование продуктов CAR-T или Т-клеток связано со способностью выживать и сохраняться после адоптивного переноса.

Культивирование в гипотоническом кондиционировании не влияло на выход или

жизнеспособность Т-клеток во время экспансии *in vitro* (Фиг. 4А-4В). Выход и жизнеспособность Т-клеток были одинаковыми у нескольких доноров, что свидетельствует о том, что гипотоническую среду можно эффективно использовать для получения клеточных продуктов, содержащих менее дифференцированные клетки, с использованием реагентов клинической чистоты.

Поскольку кондиционирование с повышенным содержанием калия обогащало менее дифференцированные клетки, мы затем попытались проверить популяции T_{SCM} с использованием специфических поверхностных маркеров и факторов транскрипции, которые точно определяют «подобные стволовым» Т-клетки (Фиг. 1А) (см., например, Gattinoni et al, Nature Medicine 2011). Наши результаты показали, что гипотоническое кондиционирование обогащает CD45RO⁺CCR7⁺ CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺TCF7⁺ как в CD4, так и в CD8 CAR⁺ Т-клетках (Фиг. 5А-5В). По сравнению с контрольными условиями гипотонические кондиционированные среды повышали эффективность трансдукции примерно в 2-3 раза (Фиг. 6). Используя эти строгие критерии, мы обнаружили, что повышенный уровень калия увеличивает количество популяций клеток, подобных стволовым, в 3-8 раз по сравнению с контрольными условиями (Фиг. 7).

Предыдущие отчеты демонстрирует, что приобретение полных эффекторных функций *in vitro* снижает эффективность адоптивно перенесенных Т-клеток, при этом продукция IFN γ на клетку является надежным аналогом этого приобретения эффекторной функции (Gattinoni et al, JCI 2005). И наоборот, Т-клетки с сохраненной способностью к продукции IL-2 представляют собой популяцию с сохраненной способностью к стволовости (Gattinoni et al., JCI (2005); Wang et al., STM (2012)). Поэтому мы оценили судьбу эффекторных функций популяций Т-клеток, созданных с использованием гипотонических кондиционированных сред. По сравнению с контрольными условиями, в гипотонической кондиционированной среде сохранялись рецепторы для хоминга в лимфоузел с повышенной экспрессией IL-2 в 3 раза и сниженной экспрессией IFN γ в 3 раза (Фиг. 8А-8С). Противоположные эффекты IFN γ и IL-2 имеют решающее значение для поддержания менее дифференцированного состояния во время экспансии Т-клеток *in vitro*. Это явление наблюдается как в CD4 субпопуляциях, так и в CD8 субпопуляциях без потери экспрессии CCR7 (Фиг. 8А-8В).

Предыдущие отчеты демонстрируют, что, хотя IL-2 очень полезен для производства большого количества активированных Т-клеток, после воздействия IL-2 *in vitro* наблюдается одновременная быстрая дифференцировка и потеря стволовости (Waldmann et al, Nat Rev Immunol, 2006). Напротив, предыдущие отчеты (Hinrichs et al, Blood, 2008) показали, что использование альтернативных цитокинов с общей гамма-цепью может привести к аналогичному выходу клеток при сравнительном сохранении стволовости Т-клеток. С этой целью мы проверили, могут ли титрованные количества различных комбинаций этих цитокинов обеспечить дополнительное преимущество для наших сред, приготовленных иначе, в отношении стволовости Т-клеток и общего выхода клеток. Наши результаты показали, что комбинации IL-7 и IL-21 было достаточно для

обогащения продуктов менее дифференцированных клеток (**Фиг. 9А-9В**). Комбинации этих цитокинов оказывали минимальное влияние на обогащение наивных клеток по сравнению со стандартными условиями культивирования. Однако, используя специфические маркеры, включая $CD45RO^+CCR7^+CD45RA^+CD62L^+CD27^+CD28^+TCF7^+$, наши результаты демонстрируют, что по сравнению со стандартными условиями культивирования IL-7, IL-21 с повышенным содержанием калия и гипотоническими условиями культивирования приводили к относительно более высокому числу (в ~ 20 раз больше) подобных стволовым клеткам в продуктах клеток со сконструированным CAR (**Фиг. 10А-10В**).

Эффекты культивирования Т-клеток со сконструированным CAR в гипотонической среде с повышенным содержанием калия также наблюдались в рекомбинантных TCR-модифицированных иммунных клетках. Т-клетки трансфицировали TCR к NY-ESO-1 и культивировали в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, как описано выше. Культивирование таких TCR-модифицированных иммунных клеток в гипотонической среде с повышенным содержанием калия приводило к аналогичному выходу клеток (~ 150 миллионов клеток), жизнеспособности (более или равной 90%) и фенотипу клеток, подобных стволовым, (~ 50% $CD3^+$ клеток экспрессировали CCR7 и CD45RA) в виде CAR-Т-клеток, культивируемых в аналогичных гипотонических условиях с повышенным содержанием калия (данные не показаны).

Пример 3. Характеристика CAR Т-клеток, культивируемых в гипотонической среде

Т-клетки, совместимые с $CD4^+$ и $CD8^+$ донорами, культивировали в контрольной среде или гипотонической среде с повышенным содержанием калия, как описано выше, в каждую из которых добавляли 200 МЕ/мл IL-2, 1200 МЕ/мл IL-7 и 200 МЕ/мл IL-15 (R&D systems) и активировали с помощью Transact (Miltenyi Biotec). Через 24 или 48 часов после активации клетки трансдуцировали лентивирусом, кодирующим химерный антигенный рецептор к ROR1 (CAR). Т-клетки ресуспендировали в концентрации $2,5 \times 10^6$ живых Т-клеток/мл либо в контрольной среде, либо в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, с добавлением 200 МЕ/мл IL-2, 1200 МЕ/мл IL-7 и 200 МЕ/мл IL-15. После инкубации в течение ночи клетки переносили в планшеты G-REX® (Wilson Wolf) для экспансии в течение 7 дней после активации перед криоконсервацией для последующего использования в анализах, описанных ниже.

Культивирование в гипотонической среде с повышенным содержанием калия существенно улучшает удержание менее дифференцированных Т-клеток в процессе продукции. Такие подобные стволовым Т-клетки также имеют более высокой способностью к пролиферации при стимуляции мишени и способностью уничтожать опухолевые клетки (данные не показаны).

На 7-й день после экспансии 1×10^6 CAR Т-клеток на группу стимулировали смесью РМА и иономицина, а затем ингибиторами аппарата Гольджи (Biolegend, согласно инструкциям производителя). Продукцию цитокинов оценивали с помощью внутриклеточного окрашивания и проточной цитометрии путем измерения

живых/CD3+/CAR+ субпопуляций, а затем сравнивая IL-2+, IFN γ +, IL-2+/IFN γ + двойные положительные и двойные отрицательные субпопуляции.

Т-клетки CAR, размножающиеся в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, демонстрируют повышенное содержание IL-2+ и дважды положительных Т-клеток IL-2+/IFN γ + по сравнению с Т-клетками CAR, размножающимися в контрольной среде (**Фиг. 11**; среднее значение для трех уникальных доноров). Этот цитокиновый профиль согласуется с анализом поверхностных маркеров, при котором культивирование клеток в гипотонической среде с повышенным содержанием калия приводит к образованию популяции CAR-Т-клеток, которая имеет больше менее дифференцированных и подобных стволовым Т-клеток. Продукция IL-2 в Т-клетках свидетельствует о менее дифференцированных Т-клетках по сравнению с продукцией исключительно IFN γ или отсутствием продукции цитокинов. Более того, повышенная продукция IL-2 будет поддерживать персистенцию CAR-Т-клеток и, таким образом, будет лучшим терапевтическим средством.

Для оценки Т-клеточной цитотоксичности Т-клетки с CAR к ROR1, полученные, как описано выше, высевали в соотношении 1:5 (E:T) с мечеными Nuclight Red (NLR) H1975-ROR1+опухолевыми клетками-мишенями в 24-луночный планшет с 3-кратными техническими повторами в соответствии с условиями CAR-Т. Гибель опухолевых клеток определяли с помощью флуоресцентного измерения Incucyte в зависимости от времени средней интенсивности NLR по сравнению с опухолевыми клетками отдельно. Через 3 дня культивирования одну треть Т-клеток удаляли из лунок с клетками-мишенями, высевали на свежие клетки-мишени и заменяли в Incucyte. Это повторялось еще до 3-4 раз с интервалом в 3 или 4 дня.

CAR-Т-клетки, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, проявляли повышенную цитотоксичность по сравнению с CAR-Т-клетками, культивируемыми в контрольной среде (**Фиг. 12**; по оси ординат приведена плотность клеток-мишеней). CAR Т-клетки, культивируемые в контрольной среде, со временем теряют способность контролировать рост опухолевых клеток-мишеней. Эта повышенная цитотоксичность указывает на то, что CAR-Т-клетки, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, обладают более выраженным и стойким противоопухолевым эффектом.

Оценивали секрецию цитокинов CAR-Т-клетками в анализах последовательного уничтожения, описанных выше. Вкратце, после каждой стимуляции (например, на 3, 7 и 10 дни) супернатант среды собирали через 24 часа совместного культивирования с опухолевыми клетками-мишенями. Секрецию цитокинов измеряли с использованием набора V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit (MSD).

Т-клетки с CAR к ROR1, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, продуцировали значительно больше IL-2 (**Фиг. 13А**) и IFN γ (**Фиг. 13В**) при совместном культивировании с опухолевыми клетками-мишенями H1975 по сравнению с Т-клетками CAR, культивируемыми в контрольной среде. Подобно данным,

полученным для Т-клеток, стимулированных РМА/иономицином, показанным на **Фиг. 11**, CAR-T-клетки, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, демонстрируют повышенную секрецию IL-2 (~4х) и IFN γ (~4х) при совместном культивировании с опухолевыми клетками-мишенями, что оценивается с помощью ELISA. При повторной стимуляции секреция IL-2 исчезает во всех образцах; однако CAR-T-клетки, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, показали значительно более высокий уровень IFN γ в течение трех стимуляций клеток-мишеней. Увеличение величины и продолжительности секреции цитокинов у CAR-T-клеток, культивируемых в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, указывает на более сильный противоопухолевый ответ с задержкой конечной дифференцировки CAR-T-клеток.

CAR-T-клетки, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, также проявляют повышенную пролиферацию при совместном культивировании с опухолевыми клетками-мишенями H1975 в анализе последовательного уничтожения (**Фиг. 26**). Более высокая пролиферация указывает на то, что клетки, продуцируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, более подобны стволовым клеткам с высокой пролиферативной способностью. Повышенная экспансия также подтверждает, что CAR-T-клетки, полученные при культивировании в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, обладают превосходным противоопухолевым ответом.

Пример 4. Способы приготовления сред и культивирования ТП

Готовили коммерчески доступные среды для Т-клеток (например, CTS™ OPTIMIZER™, IMMUNOCULT™ или TEXMACS™). Также была приготовлена гипотоническая кондиционированная среда с повышенным содержанием калия: концентрации ионов неорганической соли в среде для Т-клеток регулировали с помощью среды для Т-клеток, не содержащей NaCl. Конечные концентрации гипотонической кондиционированной среды были следующими: NaCl (40-80 мМ), KCl (40-90 мМ), кальций (0,5-2,8 мМ) и глюкоза (10-24 мМ).

ТП культивировали либо в контрольной среде, либо в гипотонической кондиционированной среде с повышенным содержанием калия, в которую добавляли 2,5% сывороточной добавки (CTS™ Immune Cell SR, Thermo Fisher), 2 мМ L-глутамин (Gibco), 2 мМ L-глутамакс (Gibco), раствор незаменимых аминокислот MEM (Gibco), пенициллин-стрептомицин (Gibco), 20 мкг/мл FUNGIN™ (InvivoGen), пируват натрия (Gibco) и 1 мМ гидрохлорида О-ацетил-L-карнитина (Sigma).

ТП выделяли из нескольких опухолей, резецированных хирургическим путем из различных типов опухолей (толстой кишки, легкого, гепатоцеллюлярной карциномы, почки, поджелудочной железы, молочной железы, меланомы и простаты), высеивали и культивировали либо в контрольной среде, либо в гипотонической среде с повышенным содержанием калия. Затем ТП переносили на свежую контрольную среду для окончательной экспансии.

ТП, культивируемые в гипотонической среде с повышенным содержанием калия, демонстрируют ТП с фенотипом менее дифференцированных клеток, подобных стоволовым, (данные не показаны).

Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Сущность изобретения» и «Реферат» указаны один или более, но не все иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения, как это предусмотрено изобретателем(-ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в настоящем документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

Вышеизложенное описание конкретных вариантов осуществления полностью отражает общий характер настоящего изобретения, который другие могут, применяя знания в пределах уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных путей применения таких конкретных вариантов осуществления, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы быть в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки данного описания должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете инструкций и указаний.

Объем притязаний и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных вариантов осуществления, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами.

Содержание всех цитируемых ссылок (включая литературные ссылки, американские или иностранные патенты, или патентные заявки, а также веб-сайты), которые цитируются в настоящей заявке, явным образом включены в данный документ посредством ссылки для любых целей в полном объеме, как и ссылки, цитируемые в ней. В случае возникновения каких-либо несоответствий, материал, буквально описанный в данном документе, имеет преимущественную силу.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения выхода иммунных клеток и/или стволовых клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* при одновременном повышении стволовости иммунных клеток и/или стволовых клеток человека, включающий культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

2. Способ получения популяции иммунных клеток и/или стволовых клеток человека для иммунотерапии, включающий культивирование иммунных клеток и/или стволовых клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 до 140 мМ.

3. Способ повышения стволовости иммунных клеток человека во время культивирования *ex vivo* или *in vitro* для иммунотерапии, включающий культивирование иммунных клеток человека в среде, содержащей ионы калия в концентрации от 40 мМ до 80 мМ и NaCl в концентрации от 30 мМ до 100 мМ, при этом общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 110 мМ до 140 мМ.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором общая концентрация ионов калия и NaCl составляет от 120 мМ до 140 мМ.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором концентрация ионов калия выбрана из группы, состоящей из около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ и около 80 мМ.

6. Способ по любому из пп. 1-8, в котором концентрация ионов калия составляет от 50 мМ до 60 мМ.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором концентрация ионов калия составляет около 50 мМ.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором концентрация ионов калия составляет около 50 мМ, а концентрация NaCl составляет менее 90 мМ.

9. Способ по любому из пп. 1-6, в котором концентрация ионов калия составляет около 55 мМ.

10. Способ по любому из пп. 1-6 и 9, в котором концентрация ионов калия составляет около 55 мМ, а концентрация NaCl составляет менее 85 мМ.

11. Способ по любому из пп. 1-6, в котором концентрация ионов калия составляет около 60 мМ.

12. Способ по любому из пп. 1-6 и 11, в котором концентрация ионов калия составляет около 60 мМ, а концентрация NaCl составляет менее 80 мМ.

13. Способ по любому из пп. 1-5, в котором концентрация ионов калия составляет от 60 мМ до 70 мМ.

14. Способ по п. 13, в котором концентрация ионов калия составляет около 65 мМ.

15. Способ по п. 13 или п. 14, в котором концентрация ионов калия составляет

около 65 мМ, а концентрация NaCl составляет менее 75 мМ.

16. Способ по п. 13, в котором концентрация ионов калия составляет около 70 мМ.

17. Способ по п. 13 или 16, в котором концентрация ионов калия составляет около 70 мМ, а концентрация NaCl составляет менее 70 мМ.

18. Способ по п. 13, в котором концентрация ионов калия составляет около 75 мМ.

19. Способ по п. 13 или 18, в котором концентрация ионов калия составляет около 75 мМ, а концентрация NaCl составляет менее 65 мМ.

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором среда дополнительно содержит один или более цитокинов.

21. Способ по п. 20, в котором один или более цитокинов включают интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-21 (IL-21), интерлейкин-15 (IL-15) или любую их комбинацию.

22. Способ по п. 20, в котором один или более цитокинов включают IL-2, IL-7 и IL-15.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором клетки включают иммунные клетки человека.

24. Способ по п. 23, в котором иммунные клетки человека содержат Т-клетки, TIL, NK-клетки, TIL, Treg или любую их комбинацию.

25. Способ по любому из пп. 1-22, в котором клетки включают стволовые клетки человека.

26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором клетки экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR).

27. Способ по любому из пп. 1-25, в котором клетки экспрессируют сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR).

28. Способ по любому из пп. 1-27, в котором среда дополнительно содержит ионы кальция, глюкозу или любую их комбинацию.

29. Способ по любому из пп. 1-28, в котором среда дополнительно содержит агент для экспансии клеток.

30. Способ по п. 29, в котором агент для экспансии клеток включает ингибитор GSK3B, ингибитор ACLY, ингибитор PI3K, ингибитор АКТ или любую их комбинацию.

31. Способ по п. 27, в котором ингибитор PI3K выбран из LY294002, пиктилисиба, CAL101, IC87114 и любой их комбинации.

32. Способ по п. 30, в котором ингибитор АКТ выбран из MK2206, A443654, AKTi-VIII и любой их комбинации.

33. Способ по любому из пп. 1-32, в котором среда способна:

а. увеличивать количество и/или процент менее дифференцированных и/или недифференцированных клеток;

б. повышать эффективность трансдукции;

с. увеличивать количество стволовых иммунных клеток;

д. повышать жизнеспособность *in vivo*;

- e. повышать потентность клеток;
- f. предотвращать истощение клеток; или
- g. любую их комбинацию;

в конечном клеточном продукте по сравнению с исходной клеточной популяцией.

34. Способ по любому из пп. 1-33, в котором среда дополнительно содержит глюкозу.

35. Способ по п. 34, в котором концентрация глюкозы составляет более около 10 мМ.

36. Способ по п. 34 или п. 35, в котором концентрация глюкозы составляет от около 10 мМ до около 25 мМ, от около 10 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 25 мМ, от около 15 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 19 мМ, от около 15 мМ до около 18 мМ, от около 15 мМ до около 17 мМ, от около 15 мМ до около 16 мМ, от около 16 мМ до около 20 мМ, от около 16 мМ до около 19 мМ, от около 16 мМ до около 18 мМ, около 16 мМ до около 17 мМ, от около 17 мМ до около 20 мМ, от около 17 мМ до около 19 мМ или от около 17 мМ до около 18 мМ.

37. Способ по любому из пп. 34-36, в котором концентрация глюкозы составляет около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, около 21 мМ, около 22 мМ, около 23 мМ, около 24 мМ или около 25 мМ.

38. Способ по любому из пп. 34-37, в котором концентрация глюкозы составляет около 15,4 мМ, около 15,9 мМ, около 16,3 мМ, около 16,8 мМ, около 17,2 мМ или около 17,7 мМ.

39. Способ по любому из пп. 1-38, в котором среда дополнительно содержит ионы кальция.

40. Способ по п. 39, в котором концентрация ионов кальция составляет более около 0,4 мМ.

41. Способ по п. 39 или п. 40, в котором концентрация ионов кальция составляет от около 0,4 мМ до около 2,5 мМ, от около 0,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,0 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,1 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,3 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,4 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,5 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,6 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,7 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,8 мМ до около 2,0 мМ, от около 1,2 до около 1,3 мМ, от около 1,2 до около 1,4 мМ, от около 1,2 до около 1,5 мМ, от около 1,2 до около 1,6 мМ, от около 1,2 до около 1,7 мМ, от около 1,2 до около 1,8 мМ, от около 1,3 до около 1,4 мМ, от около 1,3 до около 1,5 мМ, от около 1,3 до около 1,6 мМ, от около 1,3 до около 1,7 мМ, от около 1,3 до около 1,8 мМ, от около 1,4 до около 1,5 мМ, от около 1,4 до около 1,6 мМ, от около 1,4 до около 1,7 мМ, от около 1,4 до около 1,8 мМ, от около 1,5 до около 1,6 мМ, от около 1,5 до около 1,7 мМ, от около 1,5 до около 1,8 мМ, от около 1,6 до около 1,7 мМ, от около 1,6 до около 1,8 мМ или от около 1,7 до около 1,8 мМ.

42. Способ по любому из пп. 39-41, в котором концентрация ионов кальция

составляет около 1,0 мМ, около 1,1 мМ, около 1,2 мМ, около 1,3 мМ, около 1,4 мМ, около 1,5 мМ, около 1,6 мМ, около 1,7 мМ, около 1,8 мМ, около 1,9 мМ или около 2,0 мМ.

43. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 50 мМ ионов калия и

- (i) около 80,5 мМ NaCl;
- (ii) около 17,7 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,8 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

44. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 55 мМ ионов калия и

- (i) около 76 мМ NaCl;
- (ii) около 17,2 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,7 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

45. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 60 мМ ионов калия и

- (i) около 72,2 мМ NaCl;
- (ii) около 16,8 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,6 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

46. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 65 мМ ионов калия и

- (i) около 67,6 мМ NaCl;
- (ii) около 16,3 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,5 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

47. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 70 мМ ионов калия и

- (i) около 63,9 мМ NaCl;
- (ii) около 15,9 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,4 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

48. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 75 мМ ионов калия и

- (i) около 59,3 мМ NaCl;
- (ii) около 15,4 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,3 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

49. Способ по любому из пп. 1-42, в котором среда содержит около 80 мМ ионов калия и

- (i) около 55,6 мМ NaCl;
- (ii) около 15 мМ глюкозы;
- (iii) около 1,2 мМ ионов кальция; или
- (iv) любую комбинацию (i)-(iii).

50. Способ по любому из пп. 1-49, в котором иммунные клетки являются CD3+, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+CD27+, CD28+ или TCF7+, или любой их комбинацией после культивирования.

51. Способ по любому из пп. 1-50, в котором среда содержит IL-2 в концентрации от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 13 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 12 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 11 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 9 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 8 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 7 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 6 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 5 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 4 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 3 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 2 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 15 нг/мл или от около 15 нг/мл до около 20 нг/мл.

52. Способ по п. 51, в котором концентрация IL-2 составляет около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2 нг/мл, около 3 нг/мл, около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 6 нг/мл, около 7 нг/мл, около 8 нг/мл, около 9 нг/мл, около 10 нг/мл, около 11 нг/мл, около 12 нг/мл, около 13 нг/мл, около 14 нг/мл, около 15 нг/мл, около 16 нг/мл, около 17 нг/мл, около 18 нг/мл, около 19 нг/мл или около 20 нг/мл.

53. Способ по п. 51 или п. 52, в котором концентрация IL-2 составляет около 1,0 нг/мл.

54. Способ по п. 51 или п. 52, в котором концентрация IL-2 составляет около 10 нг/мл.

55. Способ по любому из пп. 1-54, в котором среда содержит IL-21 в концентрации от около 0,1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 14 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 13 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 12 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 11 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 9 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 8 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 7 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 6 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 5 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 4 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 3 нг/мл, от около 1 нг/мл до около 2 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 15 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 10 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 20 нг/мл, от около 10 нг/мл до около 15 нг/мл или от около 15 нг/мл до около 20 нг/мл.

56. Способ по п. 55, в котором концентрация IL-21 составляет около 0,1 нг/мл, около 0,5 нг/мл, около 1 нг/мл, около 2 нг/мл, около 3 нг/мл, около 4 нг/мл, около 5 нг/мл, около 6 нг/мл, около 7 нг/мл, около 8 нг/мл, около 9 нг/мл, около 10 нг/мл, около 11 нг/мл, около 12 нг/мл, около 13 нг/мл, около 14 нг/мл, около 15 нг/мл, около 16 нг/мл, около 17

нг/мл.

66. Способ по п. 63 или п. 64, в котором концентрация IL-15 составляет около 10 нг/мл.

67. Способ по любому из пп. 1-66, в котором иммунные клетки и/или стволовые клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR), сконструированный Т-клеточный рецептор или любую их комбинацию.

68. Способ по любому из пп. 1-67, в котором иммунные клетки и/или стволовые клетки вводят субъекту-человеку после культивирования.

69. Способ по любому из пп. 1-68, в котором клетки дополнительно трансдуцируют вектором.

70. Способ по п. 69, в котором вектор содержит трансген, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), Т-клеточный рецептор (TCR) или имитатор TCR.

71. Способ по любому из пп. 26 и 67-70, в котором CAR нацелен на CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор альфа, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, легумаин, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, простеин, сурвивин, теломеразу, PCTA-1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокации саркомы, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андрогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL или любые их комбинации.

72. Способ по любому из пп. 27 и 67-70, в котором TCR нацелен на AFP, CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, мезотелин, IL-1 lRa, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-бета, SSEA-4, CD20, фолатный рецептор альфа, ERBB2 (Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, простазу, PAP, ELF2M, эфрин B2, рецептор IGF-I, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, тирозиназу, EphA2, фукозил GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, о-ацетил-GD2, фолатный рецептор бета, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, полисиаловую кислоту, PLAC1, GloboH, NY-

BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WTI, NY-ESO-1, LAGE-Ia, MAGE-AI, легумаин, HPV E6,E7, MAGE AI, ETV6-AML, белок спермы 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-родственный антиген 1, p53, мутант p53, простеин, сурвивин, теломеразу, PCTA-1/галектин 8, MelanA/MART1, мутант Ras, hTERT, точки разрыва транслокаций при саркоме, ML-IAP, ERG (слитый ген ETS TMPRSS2), NA17, PAX3, андогеновый рецептор, циклин B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, обратную транскриптазу теломеразы человека, RU1, RU2, кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, внеклеточную часть белка APRIL или любые их комбинации.

73. Способ по любому из пп. 69-72, в котором вектор представляет собой вектор на основе ретровируса, вектор на основе лентивируса, аденоассоциированный вирус (AAV), аденовирус, гибридный вирус AAV, бакуловирус или любую их комбинацию.

74. Способ по любому из пп. 1-73, в котором ион калия включает хлорид калия.

75. Популяция клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-74.

76. Популяция клеток, содержащая по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60% или по меньшей мере около 70% клеток, которые являются CD3+, CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+, CD27+, CD28+ и TCF7+, при этом клетки культивируют в соответствии со способом по любому из пп. 1-74.

77. Среда для культивирования клеток, применимая для способа по любому из пп. 1-74.

78. Среда для культивирования клеток, содержащая (i) ионы калия в концентрации выше 40 mM и (ii) NaCl в концентрации менее 100 mM.

79. Культуральная среда по п. 78, в которой концентрация ионов калия составляет по меньшей мере около 45 mM, по меньшей мере около 50 mM, по меньшей мере около 55 mM, по меньшей мере около 60 mM, по меньшей мере около 65 mM, по меньшей мере около 70 mM, около 75 mM, около 80 mM, около 85 mM, около 90 mM, около 95 mM или около 100 mM.

80. Культуральная среда по п. 78 или п. 79, содержащая:

- a. около 45 mM ионов калия и менее 95 mM NaCl,
- b. около 50 mM ионов калия и менее 90 mM NaCl,
- c. около 55 mM ионов калия и менее 85 mM NaCl,
- d. около 60 mM ионов калия и менее 80 mM NaCl,
- e. около 65 mM ионов калия и менее 75 mM NaCl,
- f. около 70 mM ионов калия и менее 70 mM NaCl,
- g. около 75 mM ионов калия и менее 65 mM NaCl,

- h. около 80 мМ ионов калия и менее 60 мМ NaCl,
- i. около 85 мМ ионов калия и менее 55 мМ NaCl или
- j. около 90 мМ ионов калия и менее 50 мМ NaCl.

81. Культуральная среда по любому из пп. 78-90, которая дополнительно содержит один или более цитокинов.

82. Культуральная среда по п. 91, в которой один или более цитокинов выбраны из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 и любой их комбинации.

83. Культуральная среда по любому из пп. 78-82, в которой ион калия включает хлорид калия.

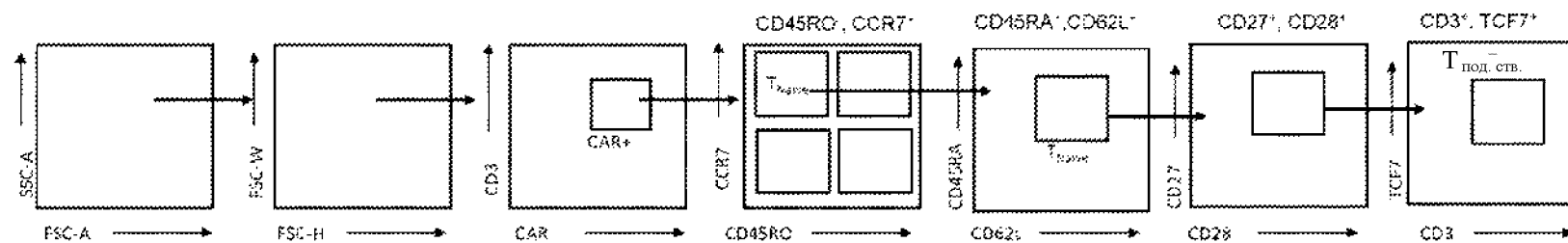
84. Способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту популяции клеток по п. 75 или п. 76.

85. Способ по п. 84, в котором заболевание или патологическое состояние включает опухоль, происходящую из рака, включающего рак молочной железы, рак головы и шеи, рак матки, рак головного мозга, рак кожи, рак почки, рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак почки, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак глаза, рак желудка (гастральный рак), рак желудочно-кишечного тракта, рак яичников, карциному, саркому, лейкоз, лимфому, миелому или их комбинацию.

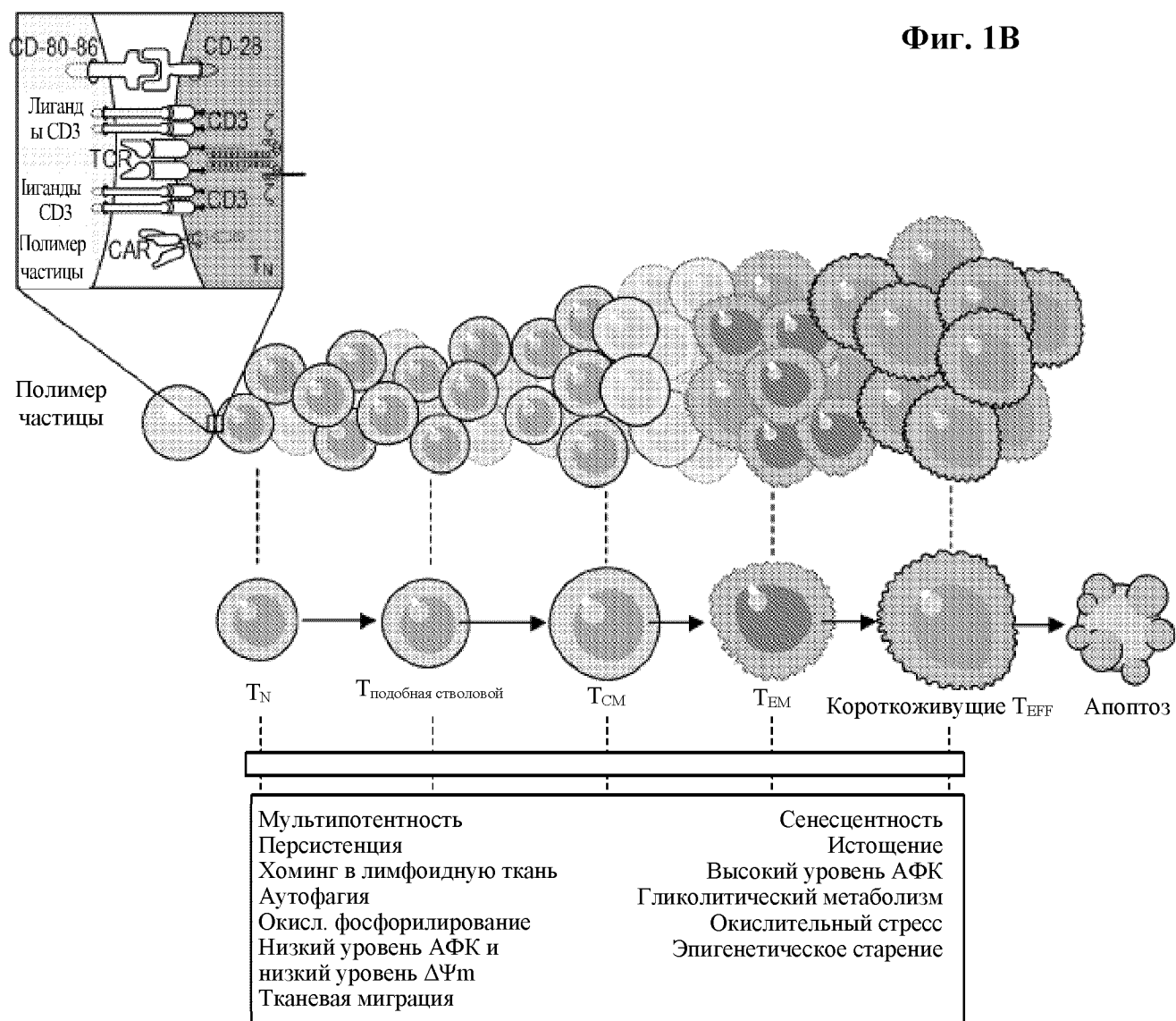
По доверенности

Фиг. 1А

Подобная стволовой Т-клетка $CD3^+$, $CD45RO^-$, $CCR7^+$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD27^+$, $CD28^+$, $TCF7^+$

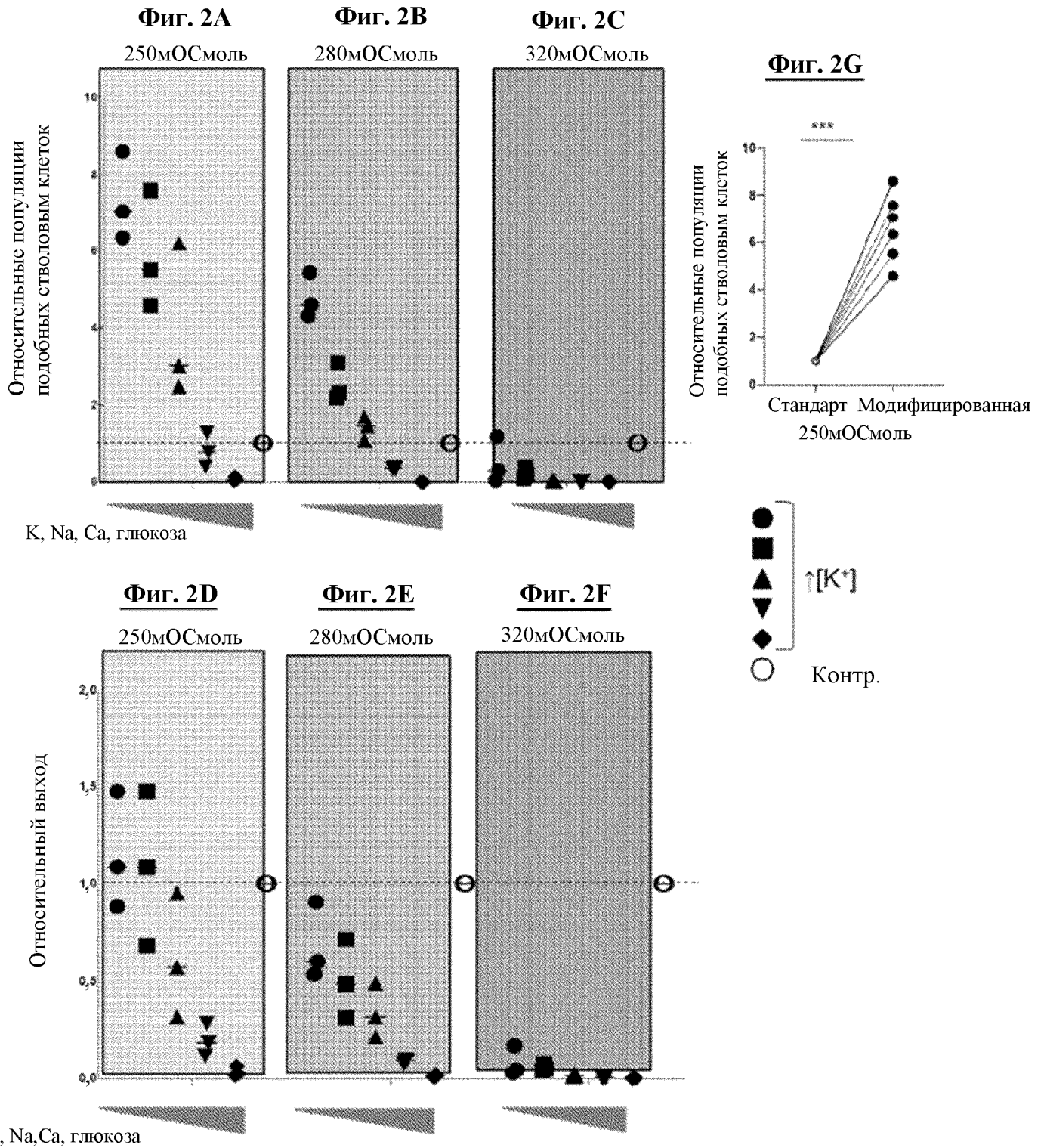


Фиг. 1В



Фенотип	T_N	$T_{\text{под. ствол.}}$	T_{CM}	T_{EM}
CD27	++++	+++	++	+
CD62L	++++	+++	++	+
TCF7	++++	+++	++	+
CCR7	++++	+++	++	-
CD28	++	+++	+++	+
CD45RA	++	++	-	+/-
CD45RO	-	-	+	+
CD39	-	-	++	+++

Подобная стволовой Т-клетка $CD3^+$, $CD45RO^-$, $CCR7^+$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD27^+$, $CD28^+$, $TCF7^+$



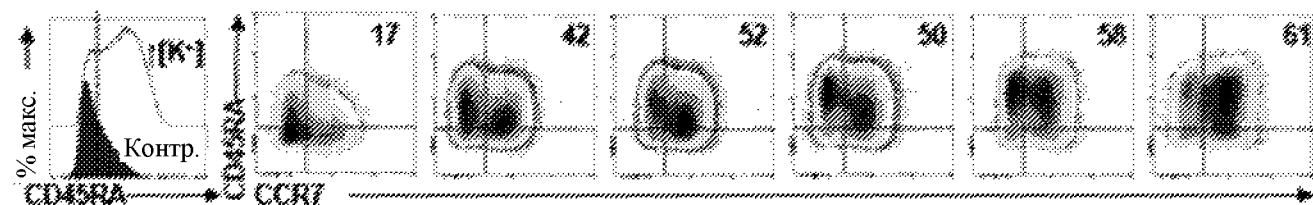
Фиг. 3А



Фиг. 3В

Гейтированы по CAR+ клеткам

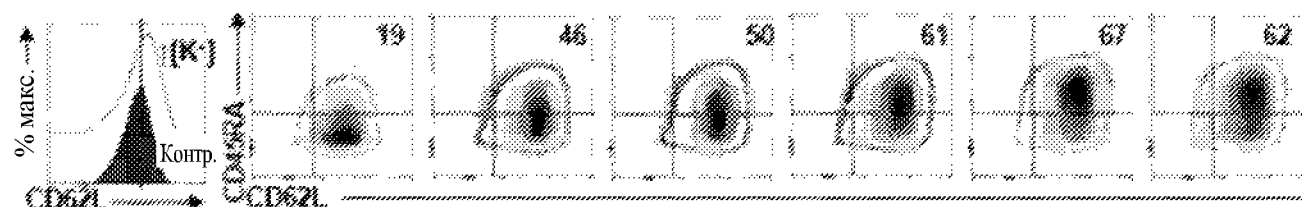
Контр. [Na ⁺]	120мМ	72мМ	68мМ	64мМ	59мМ	56мМ
Контр. [глюкоза]	24мМ	17мМ	16,5мМ	16мМ	15,5мМ	15мМ
Контр. [Ca ²⁺]	2мМ	1,15мМ	1,10мМ	1мМ	0,9мМ	0,8мМ
Контр. [K ⁺]	5мМ	60мМ	65мМ	70мМ	75мМ	80мМ



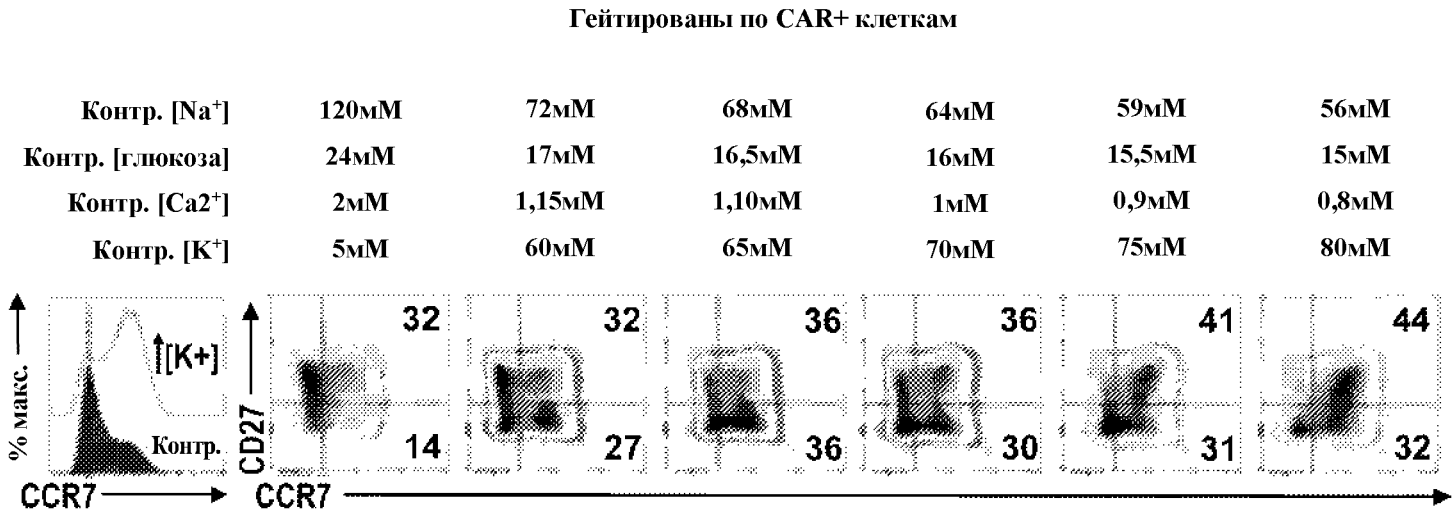
Фиг. 3С

Гейтированы по CAR⁺ клеткам

Контр. [Na ⁺]	Контр.	120мМ	72мМ	68мМ	64мМ	59мМ	56мМ
Контр. [глюкоза]		24мМ	17мМ	16,5мМ	16мМ	15,5мМ	15мМ
Контр. [Ca ²⁺]		2мМ	1,15мМ	1,10мМ	1мМ	0,9мМ	0,8мМ
Контр. [K ⁺]		5мМ	60мМ	65мМ	70мМ	75мМ	80мМ



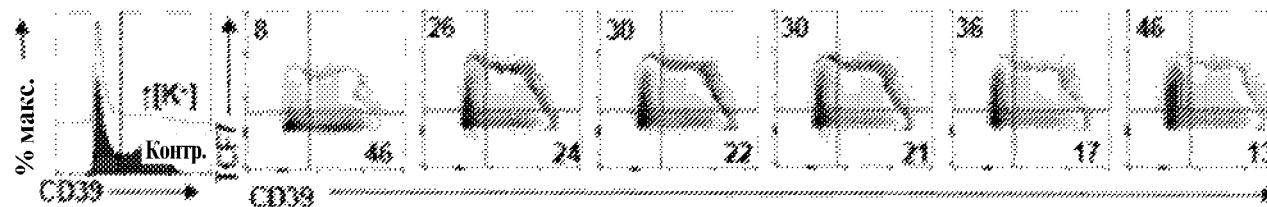
Фиг. 3D



Фиг. 3Е

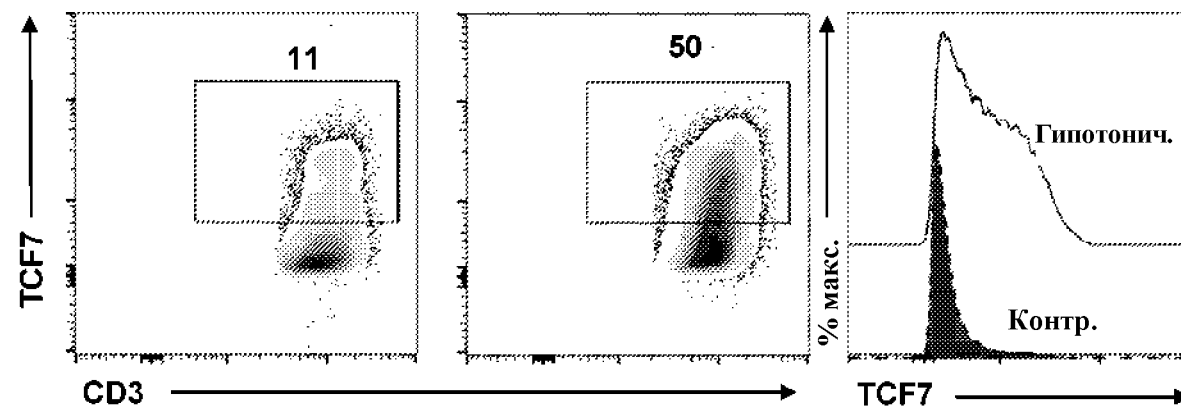
Гейтированы по CAR⁺ клеткам

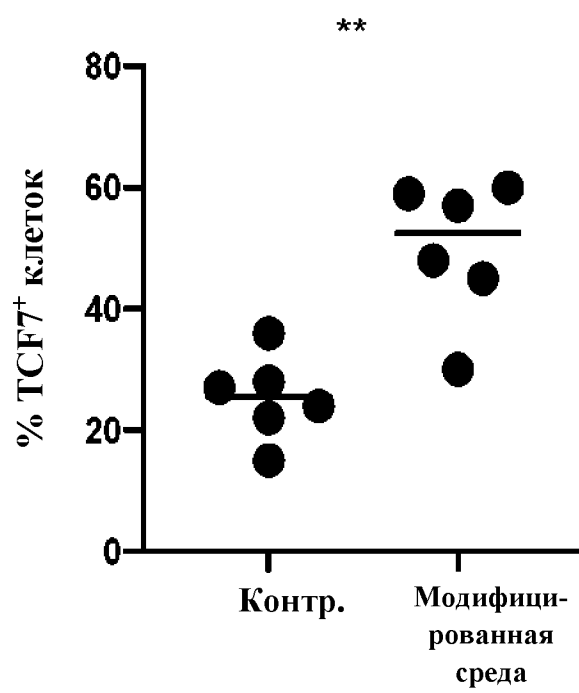
Контр. [Na ⁺]	120мМ	72мМ	68мМ	64мМ	59мМ	56мМ
Контр. [глюкоза]	24мМ	17мМ	16,5мМ	16мМ	15,5мМ	15мМ
Контр. [Ca ²⁺]	2мМ	1,15мМ	1,10мМ	1мМ	0,9мМ	0,8мМ
Контр. [K ⁺]	5мМ	60мМ	65мМ	70мМ	75мМ	80мМ

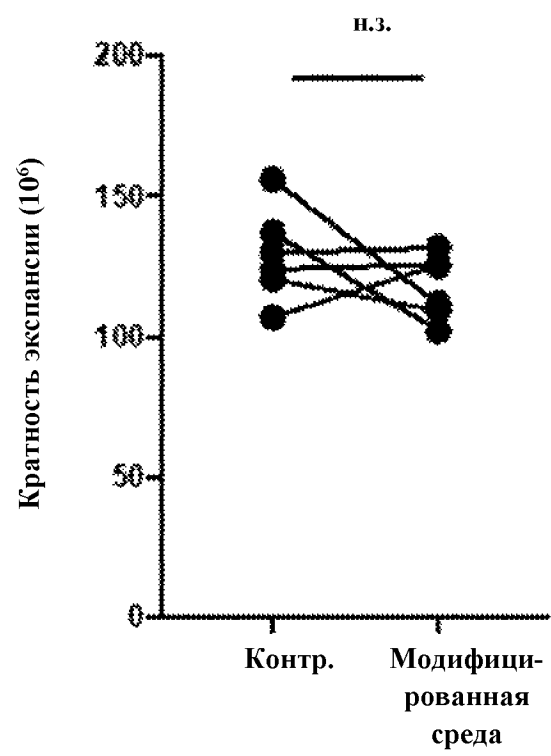


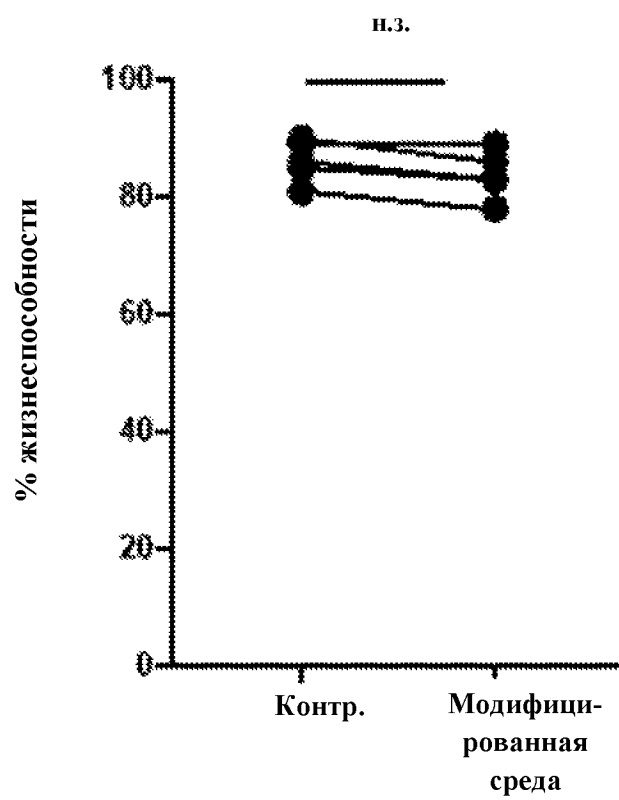
Фиг. 3F

Гейтированы по CAR+ клеткам

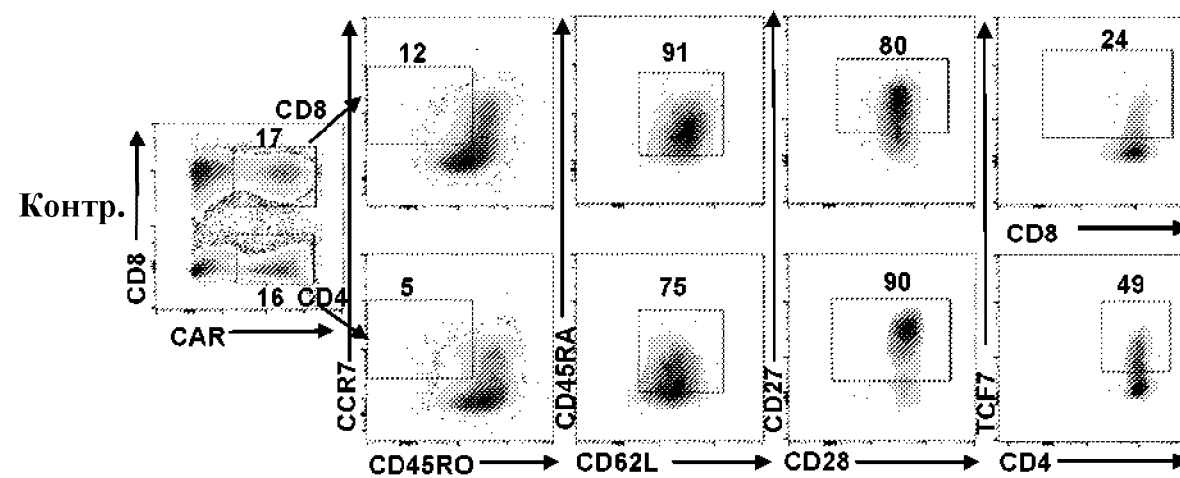


Фиг. 3G

Фиг. 4А

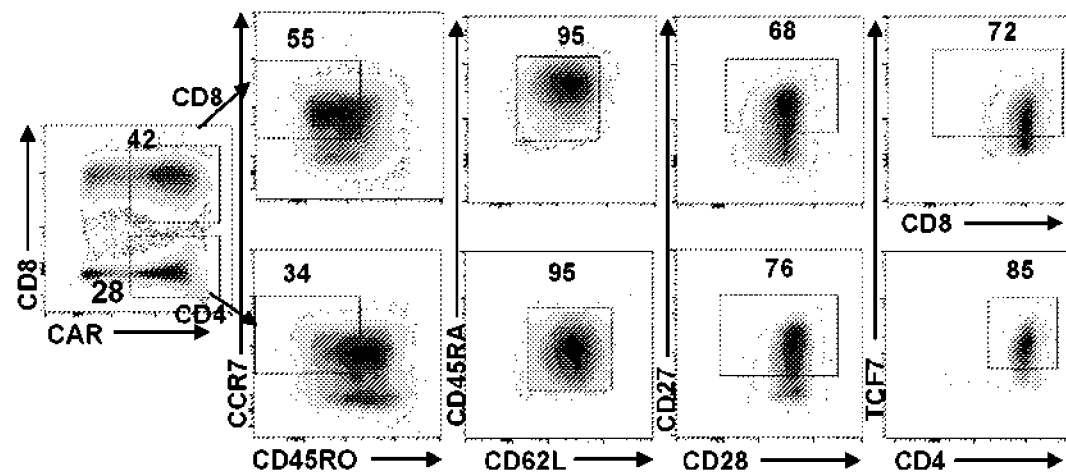
Фиг. 4В

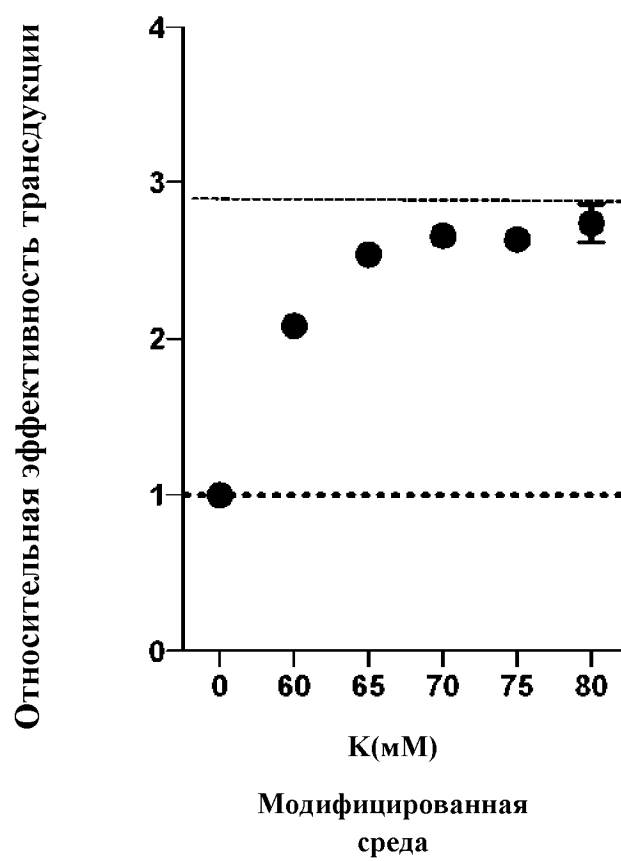
Фиг. 5А

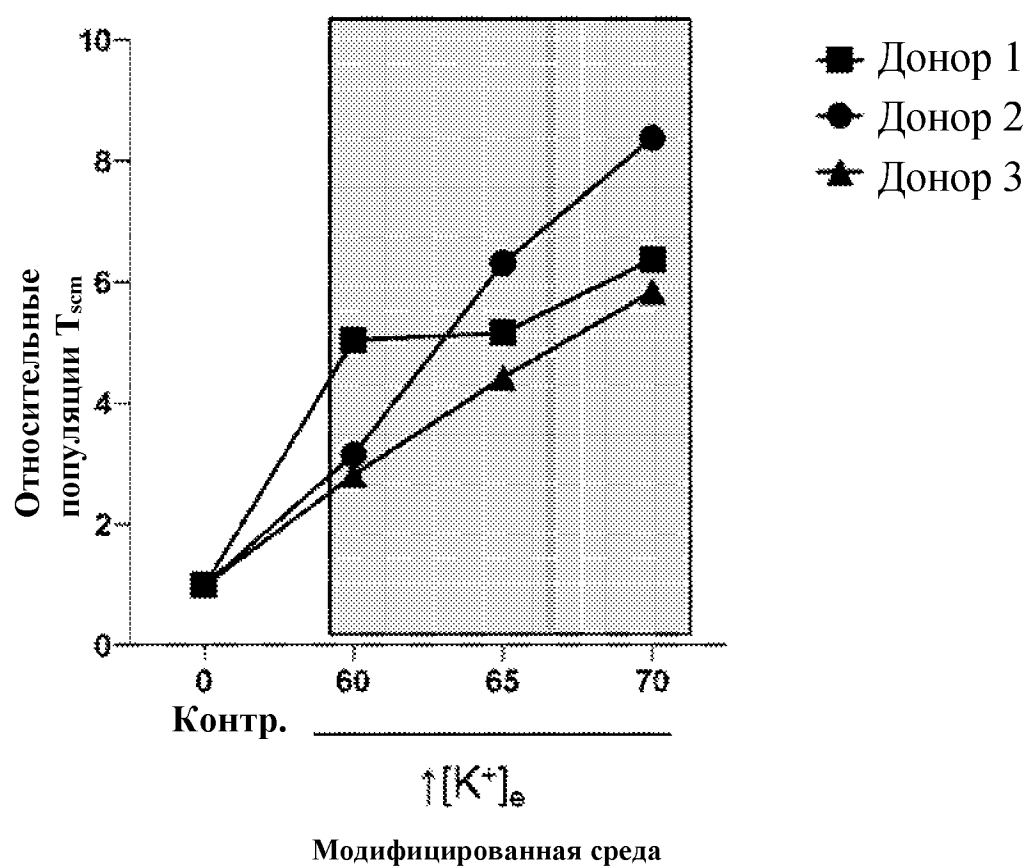


Фиг. 5В

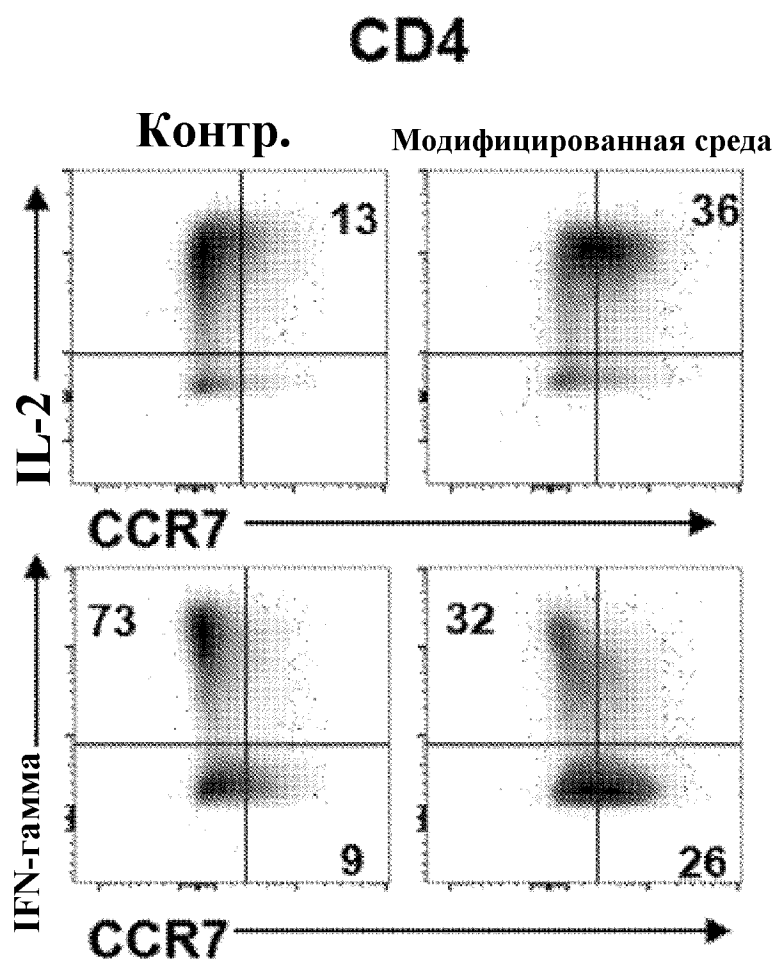
Модифициро-
ванная среда



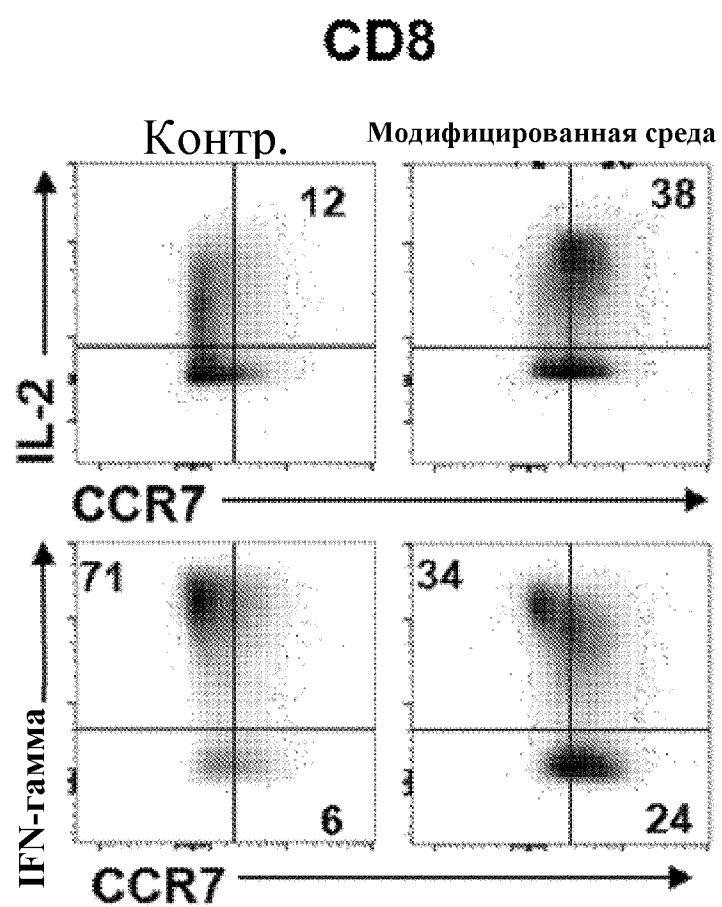
Фиг. 6

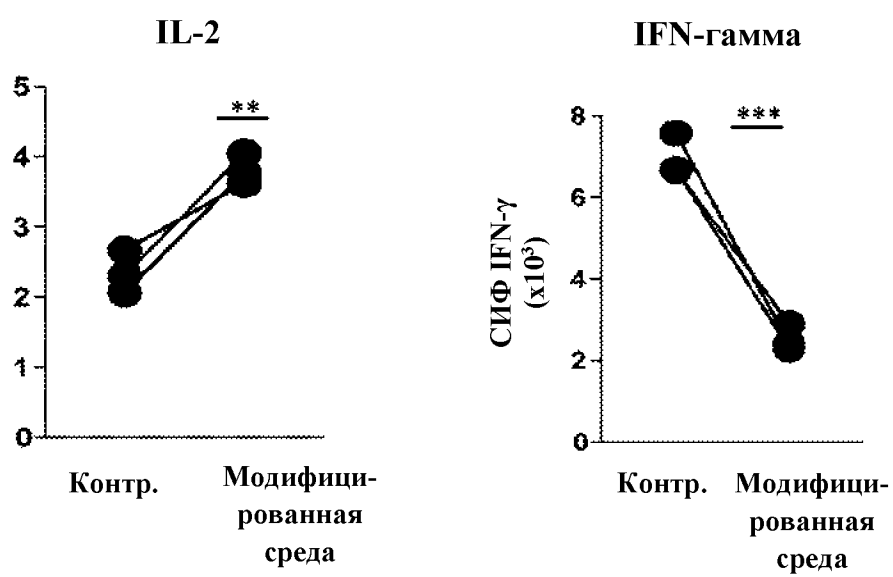
Фиг. 7

Фиг. 8А

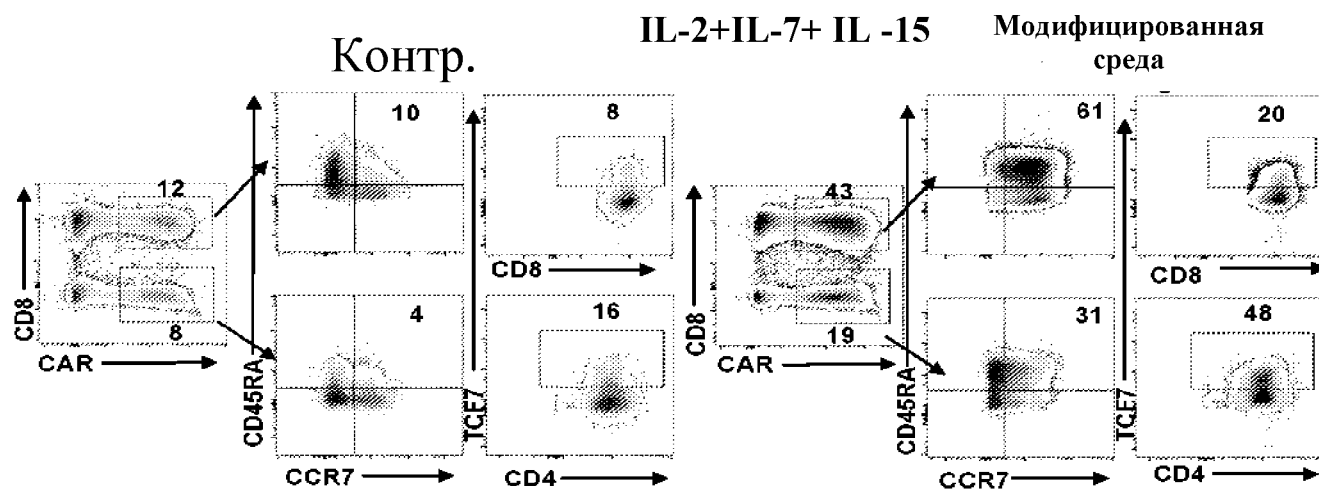


Фиг. 8В

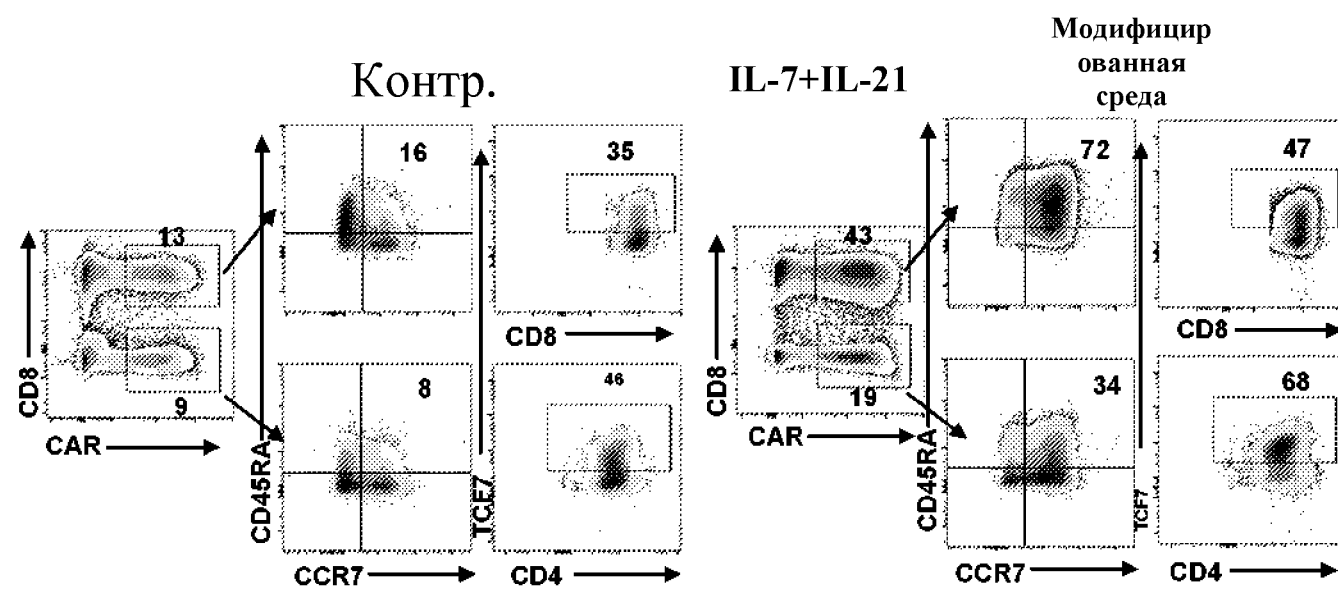


Фиг. 8С

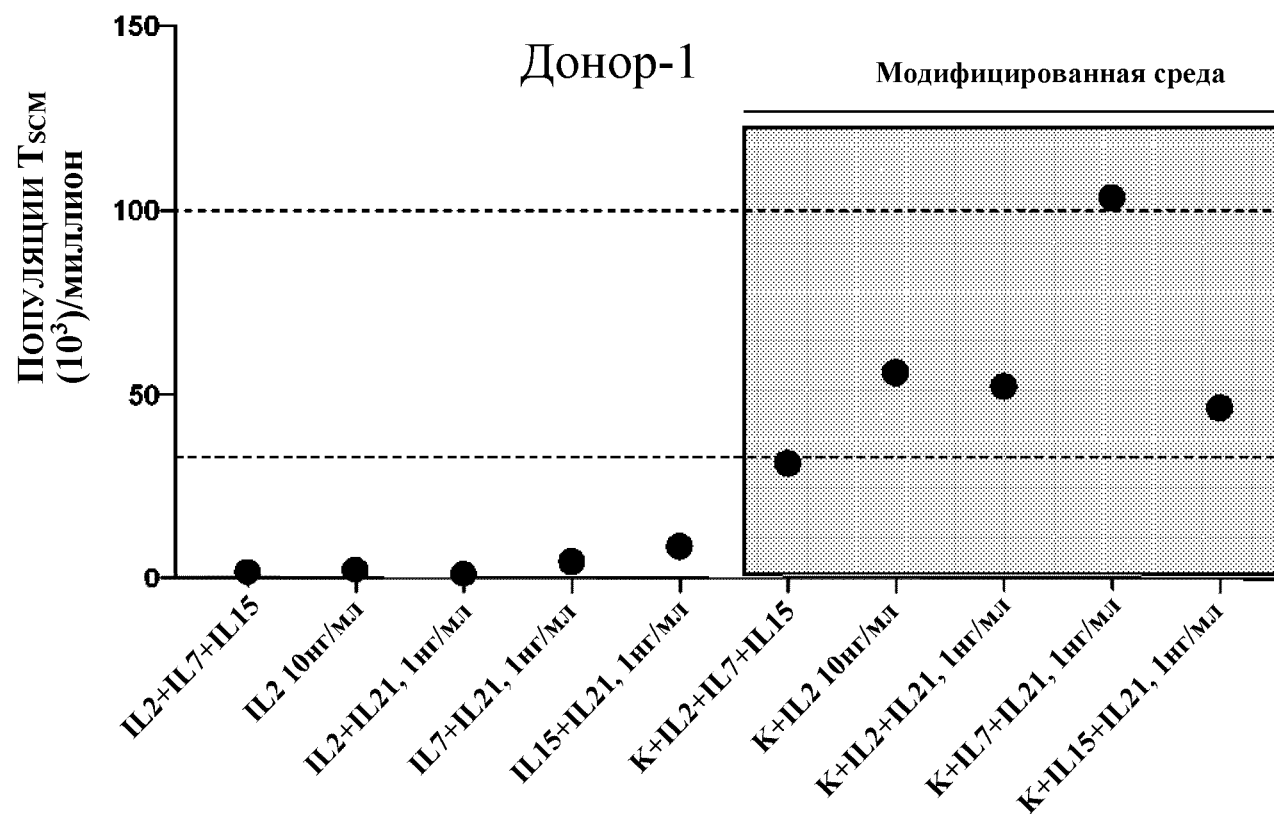
Фиг. 9А



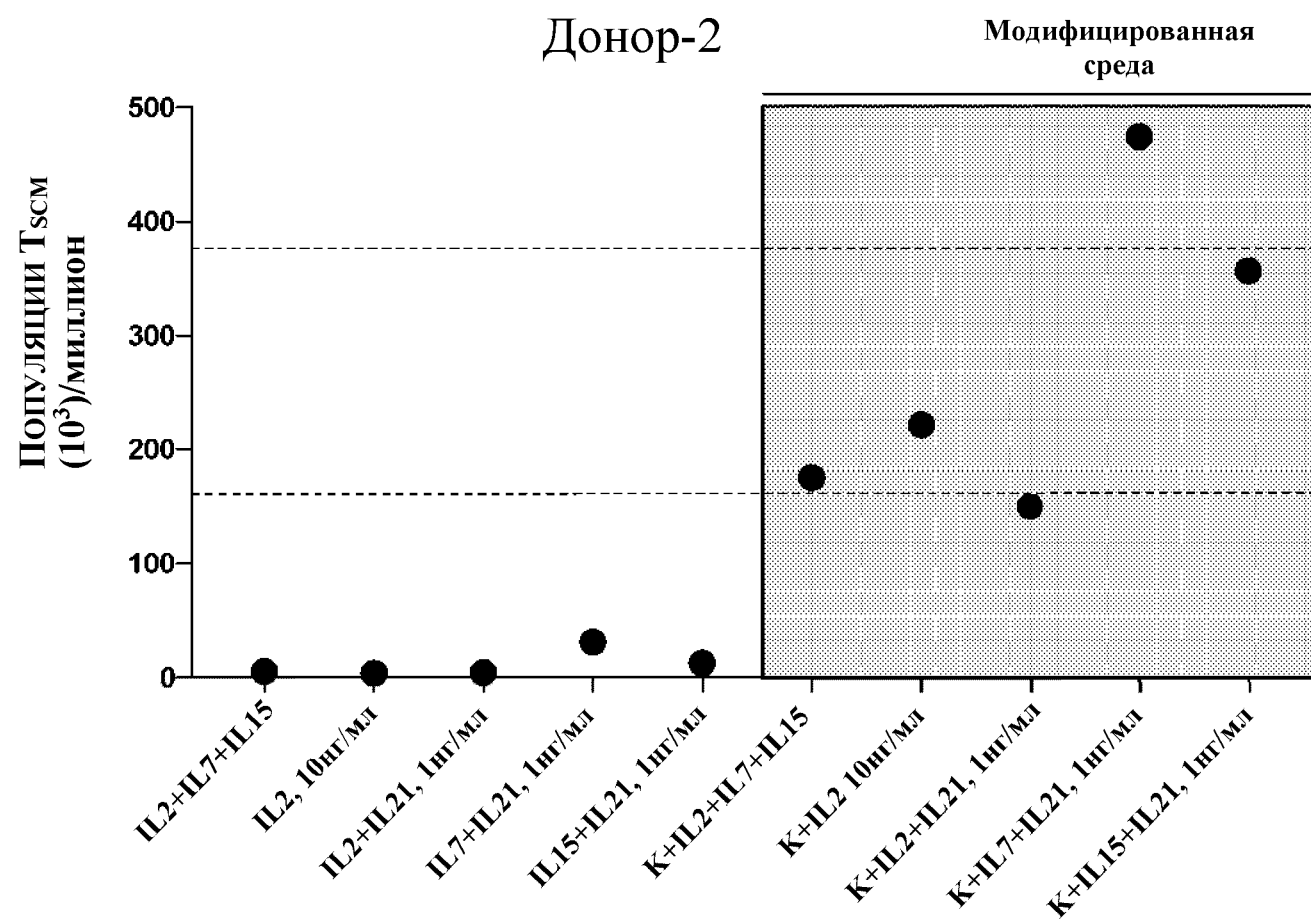
Фиг. 9В



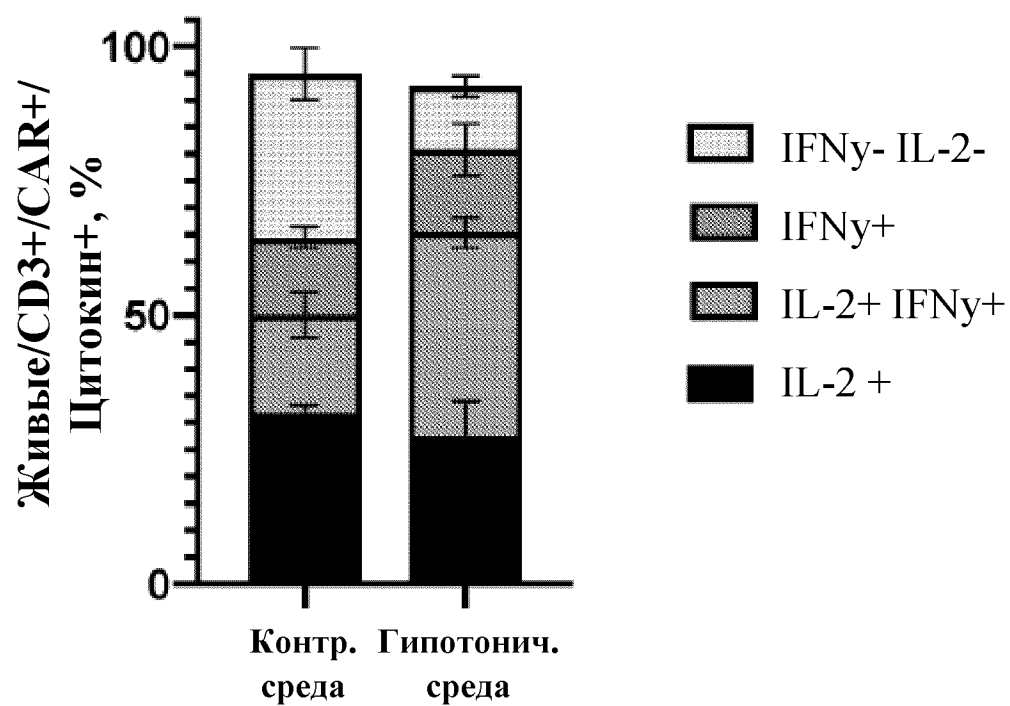
Фиг. 10А



Фиг. 10В

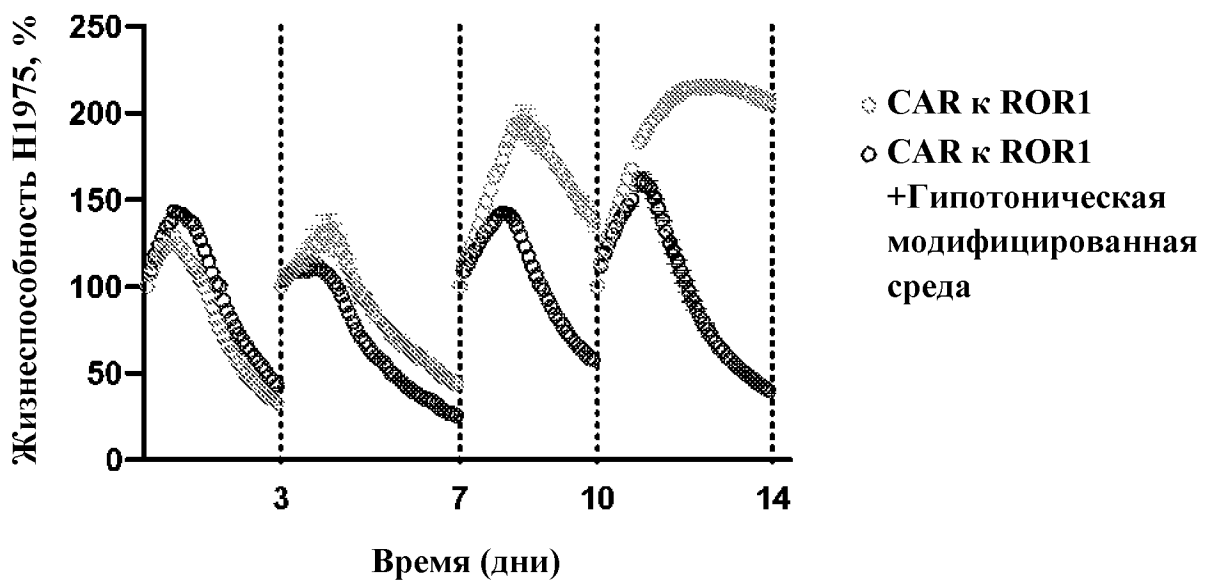


Фиг. 11

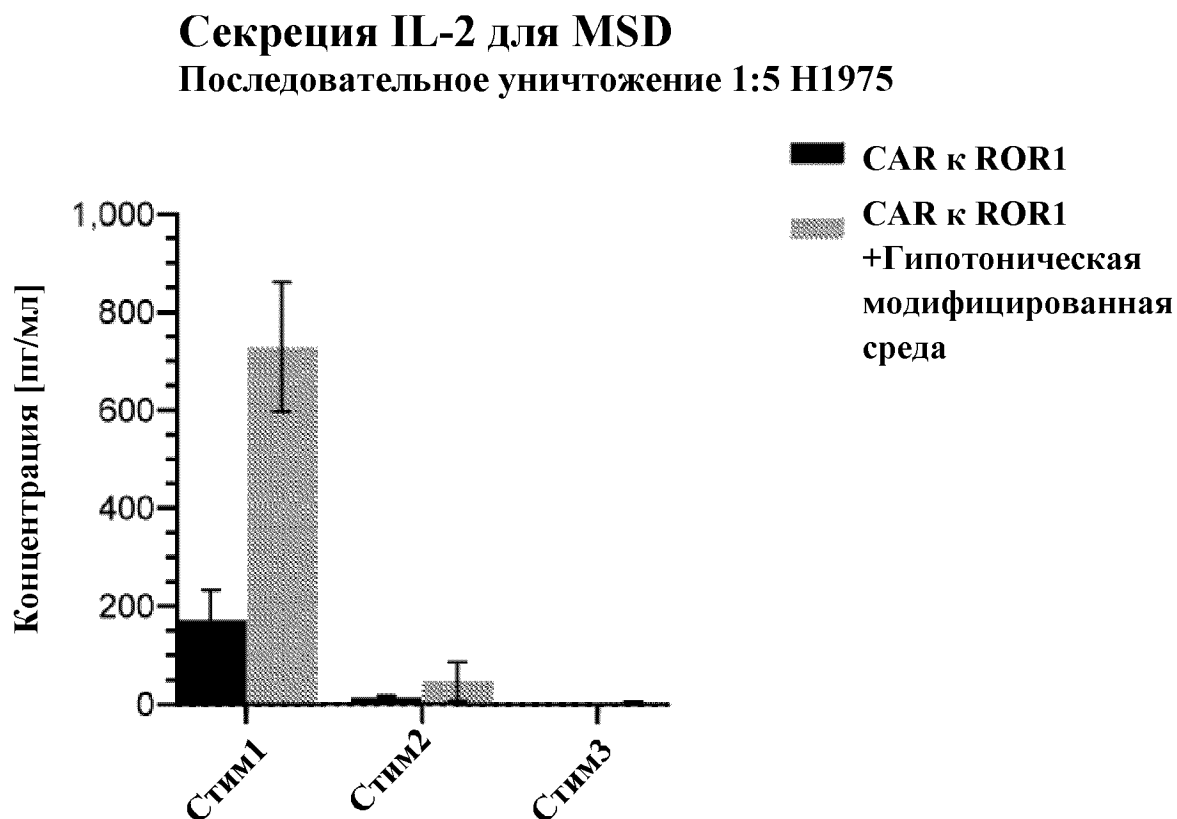


Фиг. 12

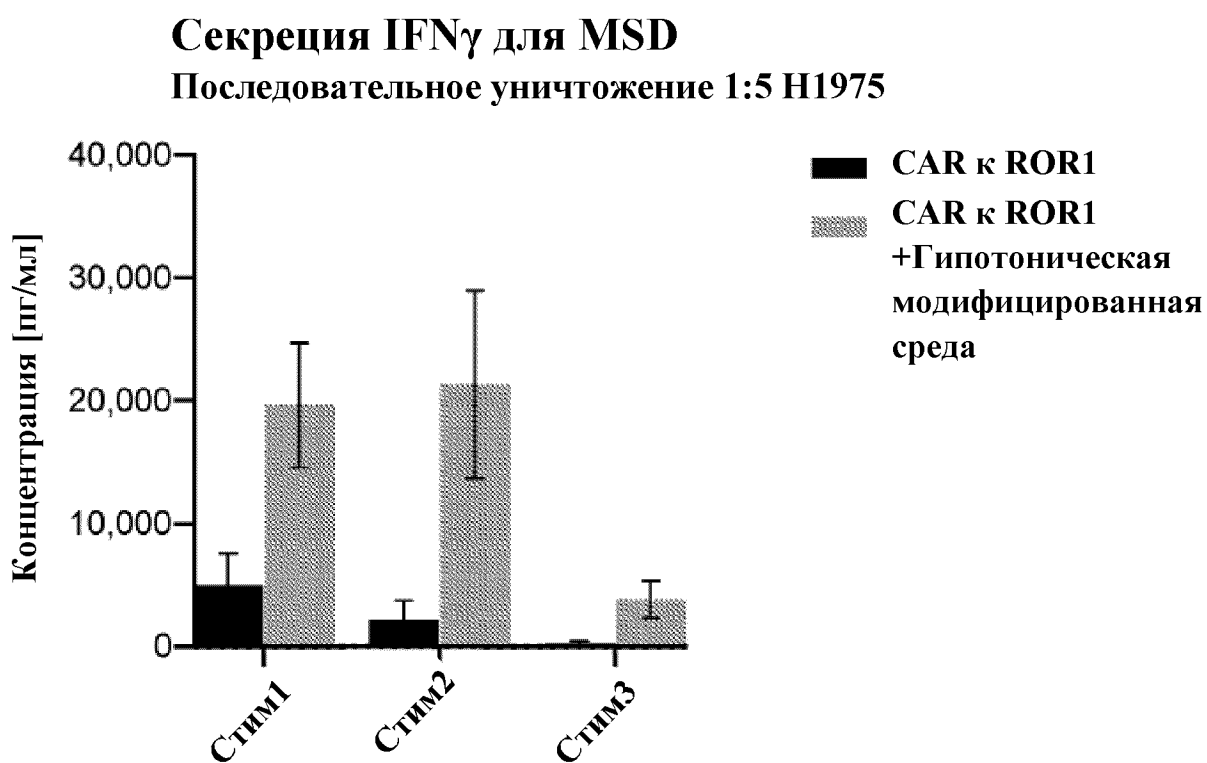
Данные о последовательном уничтожении CAR к ROR1:H1975 (1:5 E:T)



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 14

