



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119193493 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 27

(21) 申请号 202411174931.3

(22) 申请日 2018.12.07

(30) 优先权数据

62/596,774 2017.12.08 US
62/614,965 2018.01.08 US
62/716,971 2018.08.09 US
62/721,604 2018.08.22 US
62/740,903 2018.10.03 US
62/754,564 2018.11.01 US
62/774,165 2018.11.30 US
62/774,855 2018.12.03 US

(62) 分案原申请数据

201880088430.X 2018.12.07

(71) 申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 M·穆贾西奇 A·拉哈乔

P·波切斯尼 K·邱-东

I·艾芙娃 C·陈

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书232页

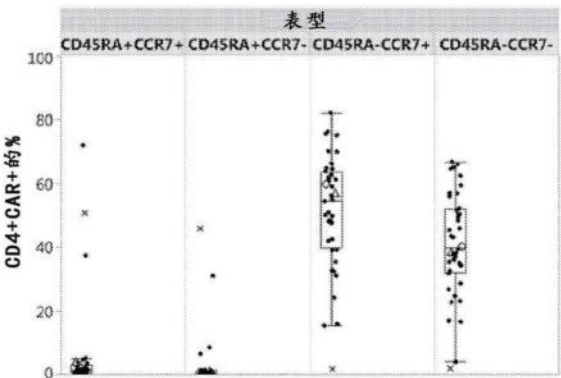
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

生产工程化T细胞组合物的过程

(57) 摘要

本发明提供了用于将用于在细胞疗法中使用的T细胞如CD4+T细胞和/或CD8+T细胞基因工程化的方法。在一些方面,所提供的方法包括用于以下的一个或多个步骤:如以1:1的比率合并富集的CD4+和CD8+细胞,并且然后在刺激条件下孵育所述细胞,通过转导或转染将重组多肽引入所述细胞,和/或在促进增殖和/或扩增的条件下培育所述细胞。在一些方面,所提供的方法是高度成功地生产基因工程化T细胞的有效可靠手段。



1. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a) 以在2:1与1:2之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率组合CD4+T细胞组合物和CD8+T细胞组合物,从而产生输入组合物;

(b) 在刺激条件下孵育所述输入组合物,从而产生刺激组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;

并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述输入组合物中的CD4+和CD8+细胞被富集或选自来自受试者的原代样品,任选地其中所述输入组合物中的CD4+和CD8+细胞被分开地富集或选自来自受试者的原代样品。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述CD4+T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD4+T细胞。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述CD8+T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD8+T细胞。

5. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物,其中:

所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4+与CD8+T细胞,并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞;并且

所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述孵育是在无血清培养基中进行。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的为CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在 100×10^6 个与 500×10^6 个之间的总CD4+和CD8+T细胞。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约 300×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述总CD4+和CD8+T细胞是活细胞。

生产工程化T细胞组合物的过程

[0001] 本发明申请是基于申请日为2018年12月7日,申请号为201880088430.X(国际申请号为PCT/US2018/064628)、名称为“生产工程化T细胞组合物的过程”的发明专利申请的方案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求以下申请的优先权:2017年12月8日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS)”的美国临时申请62/596,774;2018年1月8日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS)”的美国临时申请号62/614,965;2018年8月9日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS)”的美国临时申请号62/716,971;2018年8月22日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING ACOMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS)”的美国临时申请号62/721,604;2018年10月3日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED TCELLS)”的美国临时申请号62/740,903;2018年11月1日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING ACOMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS)”的美国临时申请号62/754,564;2018年11月30日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED TCELLS)”的美国临时申请号62/774,165;以及2018年12月3日提交的标题为“生产工程化T细胞组合物的过程(PROCESS FOR PRODUCING ACOMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS)”的美国临时申请号62/774,855,出于所有目的将这些申请的内容通过引用以其整体并入。

[0004] 通过引用并入序列表

[0005] 本申请是与电子格式的序列表一起提交的。序列表以2018年12月7日创建、大小为68千字节的名735042014340SeqList.txt的文件提供。将电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0006] 本公开文本提供了用于将用于在细胞疗法中使用的T细胞如CD4⁺T细胞和/或CD8⁺T细胞基因工程化的方法。在一些方面,所提供的方法包括用于以下的一个或多个步骤:如以1:1的比率合并富集的CD4⁺和CD8⁺细胞,并且然后在刺激条件下孵育所述细胞,通过转导或转染将重组多肽引入所述细胞,和/或在促进增殖和/或扩增的条件下培育所述细胞。在一些方面,所提供的方法是高度成功地生产基因工程化T细胞的有效可靠手段。

背景技术

[0007] 多种细胞治疗方法可用于治疗疾病和病症。细胞治疗方法包括涉及用重组受体(如嵌合抗原受体)进行基因工程化的免疫细胞(如T细胞)的方法。需要用于制造此类细胞疗法和/或将其工程化的改进方法,包括以提供更有效的过程和/或改进的细胞组合物产

品。

发明内容

[0008] 在一些实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)以在2:1与1:2之间的CD4⁺与CD8⁺T细胞的比率组合CD4⁺T细胞组合物和CD8⁺T细胞组合物,从而产生输入组合物;(b)在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物;其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/ml的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0009] 在一些实施方案中,本文提供了一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物,其中:所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞,并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/ml的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞;并且所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[0010] 在一些实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括将重组受体引入T细胞组合物的细胞中,所述T细胞组合物包含至少或至少约 1×10^6 个活细胞/mL的浓度,其中所述T细胞组合物中的细胞的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%是CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞。

[0011] 在某些实施方案中,孵育是在无血清培养基中进行。在某些实施方案中,输入组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的细胞。在某些实施方案中,输入组合物包含在 100×10^6 个与 500×10^6 个之间的总CD4⁺和CD8⁺T细胞。在某些实施方案中,输入组合物包含为或约 300×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞。在某些实施方案中,总CD4⁺和CD8⁺T细胞是活细胞。在某些实施方案中,输入组合物包含在 1×10^6 个细胞/mL与 5×10^6 个细胞/mL之间的浓度。在某些实施方案中,输入组合物包含为或约 3×10^6 个细胞/mL的浓度。在某些实施方案中,输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。在某些实施方案中,输入组合物包含在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。

[0012] 在某些实施方案中,输入组合物包含为或约1:1的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。在某些实施方案中,输入组合物包含呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺。

[0013] 在某些实施方案中,呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.1:1。

[0014] 在某些实施方案中,输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[0015] 在某些实施方案中,呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.69:1。

[0016] 在某些实施方案中,输入组合物包含任选地在2.0:1至1.5:1之间的比率的呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[0017] 一些实施方案还包括:将重组受体引入来自刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括使刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷

酸的药剂接触。一些实施方案还包括：将重组受体引入来自刺激组合物的细胞中，从而产生工程化细胞组合物，其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导刺激组合物的细胞。在一些实施方案中，所述引入是在无血清培养基中进行。

[0018] 在特定实施方案中，本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法，所述方法包括：(a) 以在2:1与1:2之间的CD4⁺与CD8⁺T细胞的比率组合CD4⁺T细胞组合物和CD8⁺T细胞组合物，从而产生输入组合物；(b) 在刺激条件下孵育输入组合物，从而产生刺激组合物；其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在，所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域；并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0019] 在任何所提供方法的一些实施方案中，输入组合物中的CD4⁺和CD8⁺细胞被富集或选自来自受试者的原代样品，任选地其中所述输入组合物中的所述CD4⁺和CD8⁺细胞被分开地富集或选自来自受试者的原代样品。在任何所提供方法的某些实施方案中，CD4⁺T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD4⁺T细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中，CD8⁺T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD8⁺T细胞。

[0020] 在一些实施方案中，本文提供了一种用于生产工程化细胞组合物的方法，所述方法包括在刺激条件下孵育输入组合物，从而产生刺激组合物，其中：所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞，并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞；并且所述刺激条件包括刺激试剂的存在，所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[0021] 在任何所提供方法的某些实施方案中，孵育是在无血清培养基中进行。在任何所提供方法的特定实施方案中，输入组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中，输入组合物包含在 100×10^6 个与 500×10^6 个之间的总CD4⁺和CD8⁺T细胞。在任何所提供方法的某些实施方案中，输入组合物包含为或约 300×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0022] 在任何所提供方法的一些实施方案中，总CD4⁺和CD8⁺T细胞是活细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中，输入组合物包含在 1×10^6 个细胞/mL与 5×10^6 个细胞/mL之间的浓度。在任何所提供方法的某些实施方案中，输入组合物包含为或约 3×10^6 个细胞/mL的浓度。在任何所提供方法的特定实施方案中，输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。在任何所提供方法的一些实施方案中，输入组合物包含在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。

[0023] 在任何所提供方法的某些实施方案中，输入组合物包含为或约1:1的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中，输入组合物包含呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺。在任何所提供方法的一些实施方案中，呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.1:1。在任何所提供方法的某些实施方案中，输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中，呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的

CD8+细胞的比率为或为约1.69:1。在任何所提供方法的一些实施方案中,输入组合物包含任选地在2.0:1至1.5:1之间的比率的呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4+和CD8+细胞。

[0024] 在任何所提供方法的某些实施方案中,所述方法还包括:将重组受体引入来自刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括使刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷酸的药剂接触。

[0025] 在任何所提供方法的特定实施方案中:接触是通过用载体转染进行,其中所述载体是转座子,任选地是睡美人(SB)转座子或Piggybac转座子;或接触是通过用病毒载体转导进行。

[0026] 在任何所提供方法的一些实施方案中,还包括:将重组受体引入来自刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导刺激组合物的细胞。在任何所提供方法的某些实施方案中,引入是在无血清培养基中进行。

[0027] 在任何所提供方法的特定实施方案中,引入刺激组合物包含少于 300×10^6 个细胞。在任何所提供方法的一些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含在 50×10^6 个与 200×10^6 个之间的细胞。在任何所提供方法的某些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含为或约 100×10^6 个细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,对于引入,刺激组合物包含小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度。在任何所提供方法的一些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含在 0.5×10^6 个细胞/mL与 2×10^6 个细胞/mL之间的浓度。在任何所提供方法的某些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含为或约 1×10^6 个细胞/mL的浓度。

[0028] 任何所提供方法的特定实施方案包括在将重组受体引入刺激组合物的细胞中之前,在刺激条件下孵育之后,调节刺激组合物的组成。在任何所提供方法的一些实施方案中,刺激组合物的细胞是活细胞。在某些实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括将重组受体引入T细胞组合物的细胞中,所述T细胞组合物包含至少或至少约 1×10^6 个活细胞/mL的浓度,其中所述T细胞组合物中的细胞的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%是CD4+T细胞或CD8+T细胞。

[0029] 在任何所提供方法的特定实施方案中,T细胞组合物的浓度小于 5×10^6 个活细胞/mL。在任何所提供方法的一些实施方案中,T细胞组合物包含至少或至少约或约 100×10^6 个活细胞。在任何所提供方法的某些实施方案中,T细胞组合物包含少于 300×10^6 个活细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,引入包括通过转导包含编码重组受体的多核苷酸的病毒载体来接触T细胞。

[0030] 在任何所提供方法的一些实施方案中,引入是在无血清培养基中进行。在任何所提供方法的某些实施方案中,T细胞组合物中的一个或多个细胞被激活和/或包括LDL受体的表面表达。

[0031] 在任何所提供方法的特定实施方案中,细胞组合物中的细胞的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%:(i)表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;(ii)包含选自IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的细胞因子的细胞内表达;(iii)处于细胞周期的G1期或较后期;和/或(iv)能够增殖。

[0032] 在任何所提供方法的一些实施方案中,在引入之前,通过包括在刺激条件下孵育

包含CD4⁺和CD8⁺T细胞的输入组合物的过程来产生组合物的细胞,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。在任何所提供方法的某些实施方案中,孵育是在无血清培养基中进行。

[0033] 在特定实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物,其中:所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞,并且包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个CD4⁺和CD8⁺T细胞;并且所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;并且(b)将重组受体引入少于 300×10^6 个的刺激组合物细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括使所述刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体接触。

[0034] 在任何所提供方法的一些实施方案中,孵育和/或引入是在无血清培养基中进行。在任何所提供方法的某些实施方案中,CD4⁺和CD8⁺T细胞是活细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,来自刺激组合物的细胞是活细胞。

[0035] 在任何所提供方法的一些实施方案中,引入是在刺激条件下孵育开始之后的2天内和/或在将输入组合物的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞组合之后的2天内开始。在任何所提供方法的某些实施方案中,引入是在刺激条件下孵育开始之后的36小时内和/或在将输入组合物的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞组合之后的36小时内开始。在任何所提供方法的特定实施方案中,引入是在刺激条件下孵育开始之后的30小时内和/或在将输入组合物的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞组合之后的30小时内开始。

[0036] 任何所提供方法的一些实施方案还包括在促进工程化细胞的增殖和/或扩增的条件下培育工程化组合物,从而产生包含工程化T细胞的输出组合物。在任何所提供方法的某些实施方案中,培育是在无血清培养基中进行。

[0037] 在特定实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物;其中所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞,并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞;并且其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;以及(b)将重组受体引入少于 300×10^6 个来自刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导所述刺激组合物的细胞;以及(c)在促进工程化细胞的增殖和/或扩增的条件下培育工程化组合物,从而产生包含工程化T细胞的输出组合物。

[0038] 在任何所提供方法的一些实施方案中,所述孵育、引入和/或培育是在无血清培养基中进行。

[0039] 在任何所提供方法的某些实施方案中,输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞、在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞,任选地为或约1:1的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,其中所述输入组合物包含

呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺。在任何所提供方法的一些实施方案中,呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.1:1。在任何所提供方法的某些实施方案中,输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.69:1。在任何所提供方法的一些实施方案中,输入组合物包含呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[0040] 在任何所提供方法的某些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含少于 300×10^6 个细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,对于引入,刺激组合物包含在 50×10^6 个与 200×10^6 个之间的细胞,任选地为或约 100×10^6 个细胞。在任何所提供方法的一些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度。在任何所提供方法的某些实施方案中,对于引入,刺激组合物包含在 0.5×10^6 个细胞/mL与 2×10^6 个细胞/mL之间的浓度,任选地为或约 1×10^6 个细胞/mL的浓度。在任何所提供方法的特定实施方案中,包括在将重组受体引入刺激组合物的细胞中之前,在刺激条件下孵育之后,调节刺激组合物的组成。

[0041] 在任何所提供方法的特定实施方案中,孵育是在一种或多种细胞因子的存在下例如在无血清培养基中进行。在任何所提供方法的某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7、和/或重组IL-15。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。在任何所提供方法的特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[0042] 在任何所提供方法的某些实施方案中,刺激组合物的细胞的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%:(i)表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;(ii)包含选自IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的细胞因子的细胞内表达;(iii)处于细胞周期的G1期或较后期;和/或(iv)能够增殖。

[0043] 在任何所提供方法的一些实施方案中,刺激试剂包含与TCR复合物的成员特异性地结合(任选地与CD3特异性地结合)的一级药剂。在任何所提供方法的特定实施方案中,刺激试剂还包含与T细胞共刺激分子特异性地结合的第二药剂,任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。在任何所提供方法的某些实施方案中,所述一级和/或二级药剂包含抗体,任选地其中所述刺激试剂包括与抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段一起孵育。

[0044] 在任何所提供方法的一些实施方案中,所述一级药剂和/或二级药剂存在于固体支持物的表面上。在任何所提供方法的特定实施方案中,固体支持物是或包含珠。在任何所提供方法的某些实施方案中,珠包含大于或大于约 $3.5 \mu\text{m}$ 但不超过约 $9 \mu\text{m}$ 或不超过约 $8 \mu\text{m}$ 或不超过约 $7 \mu\text{m}$ 或不超过约 $6 \mu\text{m}$ 或不超过约 $5 \mu\text{m}$ 的直径。在任何所提供方法的一些实施方案中,珠包含为或约 $4.5 \mu\text{m}$ 的直径。在任何所提供方法的特定实施方案中,珠是惰性的。在任何所提供方法的某些实施方案中,珠是或包含聚苯乙烯表面。在任何所提供方法的一些实施方案中,珠是磁性的或超顺磁性的。

[0045] 在任何所提供方法的特定实施方案中,珠与细胞的比率为小于3:1。在任何所提供

方法的某些实施方案中,珠与细胞的比率为或为约2:1至约0.5:1。在任何所提供方法的一些实施方案中,珠与细胞的比率为或为约1:1。

[0046] 在任何所提供方法的特定实施方案中,将输入组合物在刺激条件下孵育少于48小时。在任何所提供方法的某些实施方案中,将输入组合物在刺激条件下孵育持续12小时与36小时之间,包含端值。在任何所提供方法的一些实施方案中,将输入组合物在刺激条件下孵育持续18小时与30小时之间,包含端值。在任何所提供方法的特定实施方案中,将输入组合物在刺激条件下孵育持续或持续约24小时。

[0047] 在任何所提供方法的某些实施方案中,将接触(任选地转导)进行少于48小时。在任何所提供方法的一些实施方案中,将接触(任选地转导)进行持续12小时与36小时之间,包含端值。在任何所提供方法的特定实施方案中,将接触(任选地转导)进行持续18小时与30小时之间,包含端值。在任何所提供方法的某些实施方案中,将接触(任选地转导)进行或进行约24小时。

[0048] 在任何所提供方法的一些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。在任何所提供方法的特定实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。在任何所提供方法的某些实施方案中,将接触(任选地转导)在不存在转导佐剂的情况下进行。在任何所提供方法的一些实施方案中,引入是在一种或多种细胞因子的存在下例如在无血清培养基中进行。在任何所提供方法的特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7、和/或重组IL-15。

[0049] 在任何所提供方法的某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[0050] 在任何所提供方法的特定实施方案中,培育的至少一部分是伴随混合和/或灌注进行的。在任何所提供方法的某些实施方案中,培育的至少一部分是伴随为、约、或至少500mL/天、600mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、900mL/天、1,000mL/天、1,200mL/天、1,400mL/天、1,500mL/天、1,600mL/天、1,800mL/天、和/或2,000mL/天的速率下的灌注进行的。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述培育的至少第一部分是在为、约、或至少500mL/天、750mL/天、或1,000mL/天的灌注速率下进行的,并且其中所述培育的至少第二部分是在为、约、或至少1,200mL/天、1,400mL/天、或1,500mL/天的灌注速率下进行的。

[0051] 在任何所提供方法的特定实施方案中,当细胞达到特定密度时,开始和/或增加灌注。在任何所提供方法的某些实施方案中,特定密度为、为约或为至少 0.4×10^6 个细胞、 0.5×10^6 个细胞、 0.6×10^6 个细胞、 0.8×10^6 个细胞、 1.0×10^6 个细胞、 1.2×10^6 个细胞、 1.4×10^6 个细胞、 1.6×10^6 个细胞、 1.8×10^6 个细胞、 2.0×10^6 个细胞、 2.2×10^6 个细胞、或 2.4×10^6 个细胞。在任何所提供方法的一些实施方案中,当细胞达到为或为约 0.6×10^6 个细胞/mL的密度时,开始和/或增加灌注至为或为约750mL/天的速率。在任何所提供方法的特定实施方案中,当细胞达到为或为约 2.0×10^6 个细胞/mL的密度时,开始和/或增加灌注至为或为约1500mL/天的速率。

[0052] 在任何所提供方法的某些实施方案中,培育是在一种或多种细胞因子的存在下例

如 在 无 血 清 培 养 基 中 进 行 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施 方 案 中 , 所 述 一 种 或 多 种 细 胞 因 子 选 自 重 组 IL-2、重 组 IL-7、和 / 或 重 组 IL-15。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 中 , 所 述 一 种 或 多 种 细 胞 因 子 包 含 : 在 50IU/mL 与 400IU/mL 之 间 的 重 组 IL-2; 在 100IU/mL 与 2,000IU/mL 之 间 的 重 组 IL-7; 和 / 或 在 50IU/mL 与 400IU/mL 之 间 的 重 组 IL-15。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 中 , 培 育 是 在 50IU/mL 与 400IU/mL 之 间 的 重 组 IL-2; 在 100IU/mL 与 2,000IU/mL 之 间 的 重 组 IL-7; 和 在 50IU/mL 与 400IU/mL 之 间 的 重 组 IL-15 的 存 在 下 例 如 在 无 血 清 培 养 基 中 进 行 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , 所 述 一 种 或 多 种 细 胞 因 子 包 含 : 在 50IU/mL 与 400IU/mL 之 间 的 重 组 IL-2; 在 100IU/mL 与 1,000IU/mL 之 间 的 重 组 IL-7; 和 / 或 在 10IU/mL 与 200IU/mL 之 间 的 重 组 IL-15。

[0053] 在 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施 方 案 中 , 其 中 所 述 培 育 是 在 刺 激 条 件 下 孵 育 开 始 之 后 的 3 天 内 和 / 或 在 将 输 入 组 合 物 的 CD4+T 细 胞 和 CD8+T 细 胞 组 合 之 后 的 3 天 内 开 始 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 中 , 其 中 所 述 培 育 是 在 刺 激 条 件 下 孵 育 开 始 之 后 的 60 小 时 内 和 / 或 在 将 输 入 组 合 物 的 CD4+T 细 胞 和 CD8+T 细 胞 组 合 之 后 的 60 小 时 内 开 始 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , 其 中 所 述 培 育 是 在 刺 激 条 件 下 孵 育 开 始 之 后 的 48 小 时 内 和 / 或 在 将 输 入 组 合 物 的 CD4+T 细 胞 和 CD8+T 细 胞 组 合 之 后 的 48 小 时 内 开 始 。

[0054] 在 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施 方 案 中 , 其 中 将 所 述 培 育 进 行 至 少 直 到 组 合 物 包 含 阈 值 数 量 的 T 细 胞 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 中 , T 细 胞 的 阈 值 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 2400×10^6 个 细 胞 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 中 , T 细 胞 的 阈 值 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 5500×10^6 个 细 胞 。

[0055] 在 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 中 , 将 所 述 培 育 继 续 进 行 达 到 阈 值 数 量 的 T 细 胞 之 后 的 至 少 一 天 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , T 细 胞 的 阈 值 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 900×10^6 个 细 胞 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , T 细 胞 的 阈 值 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 1200×10^6 个 细 胞 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , 当 T 细 胞 的 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 2400×10^6 个 细 胞 时 , 培 育 终 止 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施 方 案 中 , T 细 胞 的 阈 值 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 3500×10^6 个 细 胞 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , 当 T 细 胞 的 数 量 为 、 为 约 或 为 至 少 5500×10^6 个 细 胞 时 , 培 育 终 止 。

[0056] 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 包 括 在 所 述 培 育 后 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 。 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施 方 案 包 括 在 所 述 培 育 后 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 , 其 中 在 刺 激 条 件 下 孵 育 开 始 之 后 至 少 9 天 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 。 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 包 括 在 所 述 培 育 后 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 , 其 中 在 刺 激 条 件 下 孵 育 开 始 之 后 至 少 10 天 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 。

[0057] 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 包 括 在 8 天 至 25 天 内 的 在 开 始 孵 育 与 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 之 间 的 时 间 量 的 95% 置 信 区 间 。 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 包 括 在 9 天 至 21 天 内 的 在 开 始 孵 育 与 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 之 间 的 时 间 量 的 95% 置 信 区 间 。 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施 方 案 包 括 在 9 天 至 16 天 内 的 在 开 始 孵 育 与 收 集 输 出 组 合 物 的 细 胞 之 间 的 时 间 量 的 95% 置 信 区 间 。

[0058] 任 何 所 提 供 方 法 的 特 定 实 施 方 案 还 包 括 任 选 地 在 药 学 上 可 接 受 的 赋 形 剂 的 存 在 下 配 制 输 出 组 合 物 的 细 胞 以 便 低 温 保 存 和 / 或 给 予 至 受 试 者 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 某 些 实 施 方 案 中 , 在 低 温 保 护 剂 的 存 在 下 配 制 输 出 组 合 物 的 细 胞 。 在 任 何 所 提 供 方 法 的 一 些 实 施

方案中,低温保护剂包括DMSO。在任何所提供方法的特定实施方案中,将输出组合物的细胞配制在容器中,任选地小瓶或袋中。

[0059] 任何所提供方法的某些实施方案包括在孵育之前从生物样品中分离CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述分离包括基于CD4和/或CD8的表面表达(任选地通过阳性或阴性选择)来选择细胞。在任何所提供方法的特定实施方案中,分离包括进行基于免疫亲和力的选择。在任何所提供方法的某些实施方案中,生物样品包含从受试者获得的原代T细胞。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述受试者是人受试者。

[0060] 在任何所提供方法的特定实施方案中,生物样品是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在任何所提供方法的某些实施方案中,重组受体能够结合靶抗原,所述靶抗原与疾病、障碍或病症的细胞或组织相关,为疾病、障碍或病症的细胞或组织所特有,和/或在疾病、障碍或病症的细胞或组织上表达。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述疾病、障碍或病症是感染性疾病或障碍、自身免疫性疾病、炎性疾病、或者肿瘤或癌症。

[0061] 在任何所提供的方法的特定实施方案中,靶抗原是肿瘤抗原。在任何所提供方法的某些实施方案中,靶抗原选自5T4、8H9、avb6整合素、B7-H6、B细胞成熟抗原(BCMA)、CA9、癌症-睾丸抗原、碳酸酐酶9(CAIX)、CCL-1、CD19、CD20、CD22、CEA、乙型肝炎表面抗原、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、CE7、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、c-Met、双重抗原、EGFR、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、EPHa2、肝配蛋白B2、erb-B2、erb-B3、erb-B4、erbB二聚体、EGFR vIII、雌激素受体、胎儿AChR、叶酸受体 α 、叶酸结合蛋白(FBP)、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱受体、G250/CAIX、GD2、GD3、gp100、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13受体 α 2(IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、路易斯Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MART-1、间皮素、鼠CMV、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、NCAM、NKG2D、NKG2D配体、NY-ESO-1、O-乙酰化GD2(OGD2)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、PSCA、孕酮受体、存活蛋白、ROR1、TAG72、VEGF受体、VEGF-R2、Wilms肿瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原以及与通用标签相关的抗原。

[0062] 在任何所提供方法的一些实施方案中,重组受体是或包含功能性非TCR抗原受体或TCR或其抗原结合片段。

[0063] 在任何所提供方法的特定实施方案中,所述重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。在任何所提供方法的某些实施方案中,重组受体是抗BCMA CAR。在任何所提供方法的一些实施方案中,嵌合抗原受体包含含有抗原结合结构域的细胞外结构域。在任何所提供方法的特定实施方案中,抗原结合结构域是或包含抗体或其抗体片段,所述抗体片段任选地是单链片段。在任何所提供方法的某些实施方案中,所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。在任何所提供方法的一些实施方案中,所述片段包含scFv。在任何所提供方法的特定实施方案中,嵌合抗原受体还包含间隔子和/或铰链区。

[0064] 在任何所提供方法的某些实施方案中,嵌合抗原受体包含细胞内信号传导区。在任何所提供方法的一些实施方案中,细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在任

何所提供方法的特定实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域、和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。在任何所提供方法的某些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包含CD3链 (任选地CD3-zeta (CD3 ζ) 链) 的细胞内信号传导结构域、或其信号传导部分。

[0065] 在任何所提供方法的一些实施方案中,嵌合抗原受体还包含设置在所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导区之间的跨膜结构域。在任何所提供方法的特定实施方案中,细胞内信号传导区还包含共刺激信号传导区。在任何所提供方法的某些实施方案中,共刺激信号传导区包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。在任何所提供方法的一些实施方案中,共刺激信号传导区包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[0066] 在任何所提供方法的特定实施方案中,共刺激信号传导区位于跨膜结构域与细胞内信号传导区之间。在任何所提供方法的某些实施方案中,在所述方法的大于或大于约85%、大于或大于约90%、或者大于或大于约95%的迭代中产生包含阈值数量或更多数量的细胞的输出组合物。

[0067] 在任何所提供方法的一些实施方案中,无血清培养基包含:在基础培养基中的0.5mM至5mM的二肽形式的L-谷氨酰胺;0.5mM至5mM L-谷氨酰胺;和至少一种蛋白质,其中所述培养基不含血清。在任何所提供方法的特定实施方案中,二肽形式的L-谷氨酰胺是L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[0068] 在任何所提供方法的某些实施方案中,在无血清培养基中二肽形式的L-谷氨酰胺的浓度为或为约2mM。在任何所提供方法的一些实施方案中,在无血清培养基中L-谷氨酰胺的浓度为或为约2mM。在任何所提供方法的特定实施方案中,所述至少一种蛋白质包含白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种,任选地人或重组白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种。

[0069] 在本文提供的方法的一些任何实施方案中,在培育的至少一部分期间,监测细胞的细胞活力、浓度、密度、数量或其组合。在一些任何此类实施方案中,通过光学方法 (任选地显微术) 来进行监测。在一些任何此类实施方案中,通过明视野显微术、荧光显微术、微分干涉差显微术、相差显微术、数字全息显微术 (DHM)、差分数字全息显微术 (DDHM) 或其组合来进行监测。在一些任何此类实施方案中,通过差分数字全息显微术 (DDHM) 来进行监测。在一些任何此类实施方案中,在培育的至少一部分期间,间歇地或连续地进行监测,任选地在培育期间至少每1小时、6小时、12小时、18小时、24小时或26小时进行一次。在一些任何此类实施方案中,进行监测直到细胞达到T细胞的阈值数量、活T细胞的阈值数量、T细胞的阈值浓度或活T细胞的阈值浓度。在一些任何此类实施方案中,监测和培育是在封闭系统中进行。

[0070] 在本文提供的方法的一些任何实施方案中,输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有记忆表型;其中输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有中枢记忆表型;其中输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少

60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B⁻、和/或CD127+;和/或其中输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CCR7+/CD45RA⁻或CCR7+/CD45RO⁺。

[0071] 在本文提供的方法的一些任何实施方案中,所述方法的迭代产生多种输出组合物(任选地从人生物样品中),其中在多名不同的个体受试者中进行所述方法,其中:在所述多种输出组合物中的具有记忆表型的细胞的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;在所述多种输出组合物中的具有中枢记忆表型的细胞的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;在所述多种输出组合物中的为CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B⁻、和/或CD127+的细胞的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;在所述多种输出组合物中的为CCR7+/CD45RA⁻或CCR7+/CD45RO⁺的细胞的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;在所述多种输出组合物的工程化CD4⁺T细胞(任选地CAR+CD4⁺T细胞)中的中枢记忆CD4⁺T细胞的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;在所述多种输出组合物的工程化CD8⁺T细胞(任选地CAR+CD8⁺T细胞)中的中枢记忆CD8⁺T细胞的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;和/或在所述多种输出组合物的工程化T细胞(任选地CAR+T细胞)中的中枢记忆T细胞(任选地CD4⁺中枢记忆T细胞和CD8⁺中枢记忆T细胞)的平均百分比为在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间。

[0072] 在本文提供的方法的一些任何实施方案中,所述方法生产在至少约80%、约90%、约95%、约97%、约99%、约100%、或100%的人生物样品中展现出预定特征的输出组合物,所述预定特征任选地为在所述输出组合物中表达CAR的细胞的阈值数量,其中所述方法在多名不同的个体受试者中进行。在一些任何此类实施方案中,所述多名不同的个体受试者包括患有疾病或病症的受试者。在一些任何此类实施方案中,疾病或病症是癌症。在一些任何此类实施方案中,癌症是血液癌症,任选地多发性骨髓瘤。在一些任何此类实施方案中,组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有记忆表型;其中组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有中枢记忆表型;其中组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L+、CD3+、颗粒酶B⁻、和/或CD127+;和/或其中输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、

至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CCR7+/CD45RA-或CCR7+/CD45RO+。

[0073] 在某些实施方案中,本文提供了组合物,所述组合物包含通过本文提供的任何方法生产的工程化细胞。任何所提供组合物的一些实施方案包含药学上可接受的载体。任何所提供组合物的特定实施方案包含低温保护剂,任选地DMSO。

[0074] 在某些实施方案中,本文提供了一种制品,其包含本文提供的任何组合物和用于将输出组合物给予至受试者的说明书。在任何所提供制品的某些实施方案中,受试者患有疾病或病症,任选地其中重组受体特异性地识别或特异性地结合至与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原。

附图说明

[0075] 图1A示出与在T细胞激活、用嵌合抗原受体(CAR)构建体转导和扩增后T细胞组合物中CAR+CD4+T细胞与CAR+CD8+T细胞的比率(CAR+CD4+/CD8+比率)相比,对单采术样品中活CD4+细胞与活CD8+细胞的比率(活CD4+/CD8+比率)的双变量拟合分析的图。曲线表示在 $p=0.990$ 下双变量正态椭圆的边界。数据点表示来自每个受试者的四个样品的平均比率,所述受试者包括健康受试者(圆形)和患有骨髓瘤的受试者(加号)。图1B示出与在T细胞激活、用嵌合抗原受体(CAR)构建体转导和扩增后T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率的双变量拟合分析的图。曲线表示在 $p=0.990$ 下双变量正态椭圆的边界。数据点表示来自每个受试者的四个样品的平均比率,所述受试者包括健康受试者(圆形)和患有骨髓瘤的受试者(加号)。

[0076] 图2A-图2C示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中不同表型细胞的比率的双变量拟合分析的图。图2A示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD45RA+/CCR7+/CD4+与CD45RA+/CCR7+/CD8+细胞的比率的双变量拟合分析的图。图2B示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞的比率的双变量拟合分析的图。图2C示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率的双变量拟合分析的图。曲线表示在 $p=0.950$ 下双变量正态椭圆的边界。数据点表示来自每个受试者的多个组合物的平均比率,所述受试者包括健康供体(圆形)和患有多发性骨髓瘤的患者(加号)。

[0077] 图3A-图3C示出与所产生的工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对来自患有多发性骨髓瘤的七名患者的所选CD4和CD8细胞的起始混合物中不同表型细胞的比率的双变量拟合分析的图。图3A示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD27+/CCR7+/CD4+与CD27+/CCR7+/CD8+细胞的比率的双变量拟合分析的图。图3B示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率的双变量拟合分析的图。图3C示出与工程化CAR+T细胞组合物中的CAR+CD4+/CD8+比率相比,对所选CD4和CD8细胞的起始混合物中CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与

CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率的双变量拟合分析的图。曲线表示在 $p=0.950$ 下双变量正态椭圆的边界。

[0078] 图4A和图4B描绘在实验运行1(图4A)和运行2(图4B)中,使用通过差分DHM进行的连续监测(“连续”,线)或手动采样(“手动”,点)来评估的活细胞计数(VCC; $\times 10^6$ 个细胞/mL)和细胞活力(%)。顶图描绘每一个的测量值,底图描绘线性回归分析以及 R^2 和斜率,用于比较连续监测和手动采样。

[0079] 图5描绘与手动扩增过程相比,在自动扩增过程中使用通过差分DHM进行的连续监测评估的活细胞计数(VCC; $\times 10^6$ 个细胞/mL)和细胞活力(%)。

[0080] 图6A-图6D描绘40种工程化CAR+T细胞组合物的示例性表型概况,每种组合物来自一名多发性骨髓瘤患者。针对CD4⁺群体(图6A)和CD8⁺群体(图6B),示出CAR+T细胞组合物中的CD45RA $\times$ CCR7表达概况。针对CD4⁺群体(图6C)和CD8⁺群体(图6D),示出CAR+T细胞组合物中的CD27 $\times$ CD28表达概况。每种CAR+T细胞组合物由点(●)、叉叉(×)、菱形(◇)或三角形(Δ)表示。

具体实施方式

[0081] 本文提供了用于产生或生产表达重组受体的工程化细胞如工程化CD4⁺和CD8⁺T细胞的组合物的方法。在特定实施方案中,所述方法与包括如下的过程结合使用:在刺激条件下孵育细胞,如输入细胞的组合物;例如通过转导或转染编码重组受体的多核苷酸来将细胞基因工程化,和/或在促进细胞增殖和/或扩增的条件下培育工程化细胞。

[0082] 在一些实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括以在2:1与1:2之间的比率组合CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞以产生输入组合物,并且在刺激条件下孵育所述输入组合物。在某些实施方案中,所述方法包括孵育含有在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞的输入组合物。在某些实施方案中,输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0083] 在某些实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括将重组受体引入设定量或固定量的在细胞组合物中的细胞,例如至少或约 1×10^6 个、 10×10^6 个、 100×10^6 个、或 $1,000 \times 10^6$ 个细胞中。在一些实施方案中,细胞是经刺激的细胞。在某些实施方案中,细胞是活细胞。在特定实施方案中,引入包括用包含编码重组受体的多核苷酸的病毒载体转导刺激组合物的T细胞。在某些实施方案中,细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的细胞。

[0084] 在一些实施方案中,本文提供了用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括(i)在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物;其中所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞,并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞;(ii)将重组受体引入少于 300×10^6 个来自刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导所述刺激组合物的细胞;以及(iii)在促进工程化细胞的增殖和/或扩增的条件下培育工程化组合物,从而产生包含工程化T细胞的输出组合物。

[0085] 不同过程可用于产生基因工程化T细胞群,包括可用于产生表达嵌合抗原受体的工程化T细胞。然而,在一些实施方案中,这些过程中的一些可能需要长的或相对较长的时

间量来产生工程化细胞。在某些实施方案中,这些过程中的一些在其成功地从不同受试者中产生适合于疗法的工程化细胞的能力方面可能有所不同。在某些实施方案中,这些过程中的一些可以生产对于诸如细胞健康、活力、转导效率和/或细胞活性的参数具有高度的变异性的基因工程化T细胞组合物。

[0086] 所提供的实施方案解决这些问题中的一个或多个。在特定实施方案中,与一些现有过程相比,所提供的方法在短的或相对较短的时间量内产生适用于疗法(例如自体细胞疗法)的工程化T细胞。此外,在一些实施方案中,就由从不同受试者中收集的样品生产工程化细胞所需的时间量而言,所提供的方法导致更一致的、更不可变的过程。在特定实施方案中,所提供的方法能够从高比例的受试者中成功地产生适合于细胞疗法的工程化T细胞。在某些实施方案中,所得的细胞组合物含有高的或相对较高的部分的健康细胞,例如是活的和/或不表达凋亡标记的细胞;高的或相对较高的部分的表达重组受体的细胞;和/或具有响应于抗原刺激的高的或相对较高的活性(例如细胞毒性、抗肿瘤和/或细胞因子产生)的细胞。在一些实施方案中,所提供的方法提供了用于生产工程化细胞产品的方法,并且在一些方面具有特定的成功率,例如高的成功率或大于阈值率的成功率,例如能够产生治疗性细胞组合物的那些,例如对于大量或高百分比的样品,例如对于全部或高百分比的样品,能够产生具有某些所需或期望特征的组合物,每个所述样品源自不同的个体受试者或患者,例如将用治疗性组合物治疗(例如,在自体细胞疗法的情境下)的受试者或患者。在一些方面,受试者或患者患有疾病或病症,如癌症,如血癌或血液癌症如多发性骨髓瘤。在一些方面,所述样品(对于高百分比的所述样品,可以从其产生治疗性细胞组合物)是患者样品,包括例如就细胞表型或样品或其细胞的其他参数而言可变的那些。

[0087] 在一些实施方案中,所提供的方法产生例如与经由其他过程产生的细胞组合物相比具有改善的或高的细胞健康度的工程化T细胞组合物。在一些实施方案中,组合物包含高百分比的呈凋亡标记阴性的细胞。在一些实施方案中,所提供的方法产生包含具有稳健的细胞因子产生的多功能细胞的T细胞组合物。在一些实施方案中,所提供的方法产生富集记忆表型、富集中枢记忆表型和/或富集为CD27⁺、CD28⁺、CCR7⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L⁺、CD3⁺、CD95⁺、颗粒酶B⁻和/或CD127⁺的细胞的T细胞组合物。在一些实施方案中,组合物中的细胞的、组合物中的T细胞的、或组合物中的工程化T细胞的至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%或更多(或者,对于使用所述方法生产的至少一半或大多数样品,或者平均而言使用所述方法产生的样品,组合物中的细胞的至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%或更多)是具有中枢记忆表型的T细胞;呈CD27⁺、CD28⁺;呈CCR7⁺、CD45RA⁻;和/或呈CCR7⁺、CD45RO⁺。在一些实施方案中,组合物中的细胞的、组合物中的T细胞的、或组合物中的工程化T细胞的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%或85%或90%或95%或更多(或者,对于使用所述方法生产的至少一半或大多数样品,或者平均而言使用所述方法产生的样品,组合物中的细胞的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%或85%或90%或95%或更多)是具有记忆表型的T细胞;呈CD45RA⁻;和/或呈CD45RO⁺。

[0088] 在特定实施方案中,所提供的方法与有效地生产或产生适合于在细胞疗法中使用的工程化细胞的过程结合使用。在某些实施方案中,用于所述过程的每个步骤的时间安排、条件和试剂改善了每个后续步骤和/或整个过程的效率。例如,在一些实施方案中,可以在

足够高以实现期望效果(例如对细胞的刺激或改善的转导效率)的细胞浓度下、但是在足够低以避免在后续处理步骤中生长减慢或存活降低的浓度下孵育、转导和/或培育细胞。此外,在一些实施方案中,所述过程的步骤被定时以在特定时间点开始或结束,以改善后续过程步骤和/或整个过程的效率。例如,在一些实施方案中,用于孵育和工程化的步骤(例如,转导或转染细胞)在所述过程中比替代方法更早完成,在某些实施方案中,这改善了在随后的培育步骤期间的存活和/或健康、和/或细胞增殖和扩增的速度。因此,在一个方面,每个步骤的特定时间安排、条件和试剂影响单个步骤以外的细胞,并且在某些实施方案中,影响整个过程的表现。

[0089] 在一些实施方案中,所述方法与以可能比替代过程更快和更有效的方式产生或生产适合于细胞疗法的基因工程化细胞的过程结合使用。在某些实施方案中,与可能来自替代过程的相比,本文提供的方法具有高的成功率以从更广泛的受试者群体产生或生产工程化细胞组合物。在某些实施方案中,与通过替代方法生产的细胞相比,通过所提供的方法生产或产生的工程化细胞可能具有更多的健康、活力、活性,并且可能具有更高的重组受体表达。因此,在一些方面,与可能通过一些替代方法的相比,用于产生用于细胞疗法的工程化细胞的所提供方法的速度和效率允许更容易地针对更广泛的受试者群体计划和协调细胞疗法如自体疗法。

[0090] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开申请和其他出版物中阐述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0091] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0092] I. 产生工程化细胞的过程

[0093] 本文提供了用于产生工程化细胞的输出组合物的方法,所述工程化细胞例如为表达重组蛋白(例如重组受体,如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))的工程化CD4+T和CD8+T细胞。在某些实施方案中,本文提供的方法与制造产生或生产细胞疗法结合使用,并且可以与另外的处理步骤(如细胞的分离、分开、选择、激活或刺激、转导、洗涤、悬浮、稀释、浓缩和/或配制的步骤)结合使用。在一些实施方案中,产生或生产工程化细胞(例如工程化CD4+和CD8+T细胞)的方法包括从受试者中分离细胞;在刺激条件下制备、处理、孵育;和/或工程化(例如转导)细胞中的一种或多种。在一些实施方案中,所述方法包括按以下顺序进行的处理步骤:首先从生物样品中分离(例如选择或分开)输入细胞,例如原代CD4+和CD8+细胞;将输入细胞在刺激条件下孵育,用载体颗粒(例如病毒载体颗粒)工程化以例如通过转导或转染将重组多核苷酸引入细胞中;培育所述工程化细胞,例如转导的细胞,例如以扩增细胞;并且在容器(例如袋或小瓶)中收集、收获和/或填充将被配制成输出组合物中的细胞的全部或部分细胞。在一些实施方案中,在低温保存之前或之后,将产生的输出组合物的细胞重新引入同一受试者中。在一些实施方案中,工程化细胞的输出组合物适合于在疗法(例如自体细胞疗法)中使用。

[0094] 在特定实施方案中,所提供的方法与从细胞的初始或输入组合物产生表达重组受体的细胞的输出组合物结合使用。在某些实施方案中,通过组合、混合和/或合并细胞来生产、产生和/或制备输入组合物,所述细胞包括来自含有富集的T细胞、富集的CD4+T细胞和/

或富集的CD8+T细胞的细胞组合物(下文中也分别称为富集T细胞的组合物、富集CD4+T细胞的组合物和富集CD8+T细胞的组合物)的细胞。在一些实施方案中,细胞的输入组合物是合并的、混合的和/或合并的CD4+和CD8+T细胞的组合物。在某些实施方案中,所提供的方法与以下中的一种或多种结合使用:激活和/或刺激细胞,例如输入组合物的细胞;和/或将激活和/或刺激的细胞进行基因工程化,例如以通过转导或转染引入编码重组蛋白的多核苷酸;和/或例如在促进增殖和/或扩增的条件下,培育工程化细胞。在某些实施方案中,所述方法还可以与从生物样品中(例如从获取、收集和/或获得自受试者的生物样品中)分离或选择细胞以产生富集T细胞的输入组合物结合使用。在特定实施方案中,所提供的方法可以与在细胞已经被孵育、激活、刺激、工程化、转导、转染和/或培育之后收获、收集和/或配制富集T细胞的组合物一起使用。

[0095] 在一些实施方案中,在刺激条件下孵育细胞是或包括将细胞与刺激试剂(例如本文如在章节I-B-1中所述的刺激试剂)一起孵育。在特定实施方案中,以设定或固定浓度(如小于 5×10^6 个细胞/mL的浓度)在刺激条件下孵育设定量或固定量的细胞(如大于至少 100×10^6 个细胞的量)。在某些实施方案中,将孵育进行设定量或固定量的时间(如2天以内的时间量)或进行持续18小时与30小时之间的时间量。

[0096] 在某些实施方案中,本文提供的方法与工程化(例如转导或转染)细胞结合进行。在一些实施方案中,使设定量或固定量的细胞(例如活CD4+和CD8+细胞)经历工程化。在一些实施方案中,以设定或固定浓度(如小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度)在刺激条件下孵育大于至少 10×10^6 个细胞的量。在某些实施方案中,将工程化进行设定量或固定量的时间(如2天以内的时间量)或进行持续18小时与30小时之间的时间量。

[0097] 在某些实施方案中,伴随恒定的混合和/或灌注例如在封闭系统中用生物反应器进行培育步骤的至少一部分。在某些实施方案中,混合和/或灌注结合了用新鲜的培养基或溶液稳定和/或逐步地替换用过的或旧的细胞培养基或溶液。在一些实施方案中,在一定量的时间内开始培育,例如,在刺激条件下孵育起始或开始后的2、3、4或5天内;在混合、合并和/或组合细胞(例如CD4+和CD8+细胞)以产生输入组合物后的2、3、4或5天内;在当生物样品被收集后的3、4、5或6天内;和/或在从生物样品中分离、选择和/或富集所富集T细胞(例如CD4+和/或CD8+T细胞)的组合物后的3、4、5或6天内。

[0098] 在一些实施方案中,一个或多个处理步骤至少部分是在无血清培养基中进行。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,无血清培养基是受控培养基,其已经被处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,无血清培养基可含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0099] 在一些实施方案中,进行所提供的方法,使得用于临床用途(例如过继细胞疗法中)的细胞的制备中的一个、多个或所有步骤是在未将细胞暴露于非无菌条件下进行。在这种处理的一些实施方案中,细胞被分离、分开或选择、转导、洗涤、任选地激活或刺激和配制,都在封闭系统内进行。在一些实施方案中,所述一个或多个步骤是在封闭的系统或装置之外进行。在一些此类实施方案中,将富集细胞的组合物在无菌条件下从封闭系统或装置中转移出去,例如通过无菌转移到单独的封闭系统中。

[0100] 在特定实施方案中,在产生表达重组受体的富集T细胞的输出组合物的过程的任

何阶段或步骤之前、期间或之后,可以将富集T细胞的组合物收集、配制用于低温保护、低温冷冻,和/或储存在低于0℃、低于-20℃或储存在等于或低于-70℃或-80℃。在一些实施方案中,可以将细胞储存1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天以内的时间量,或储存1、2、3、4、5、6、7、8周以内的时间量,或储存至少1、2、3、4、5、6、7或8周的时间量,或储存超过8周。在存储之后,可以将富集T细胞的组合物解冻,并且可以将所述过程从过程中的同一点恢复。在一些实施方案中,将富集T细胞的输入组合物在进一步处理(例如在刺激条件下孵育)之前低温冷冻并储存。在特定实施方案中,将培育和/或配制的富集T细胞的组合物在例如作为自体细胞疗法给予至受试者之前低温冷冻并储存。

[0101] 在某些实施方案中,本文提供的方法与通过如下过程产生工程化细胞的过程结合使用,所述过程包括以下步骤:在刺激条件下孵育细胞,转导细胞以表达重组受体(例如CAR),以及在促进增殖或扩增的条件下培育细胞。在特定实施方案中,将孵育进行持续18与30小时之间,例如进行24小时或约24小时,并且随后将转导进行持续18与30小时之间,例如进行24小时或约24小时。在某些实施方案中,在细胞已经被刺激和转导之后,在促进刺激和/或扩增的条件下培育细胞。在某些实施方案中,例如通过使细胞与刺激试剂接触来开始孵育,并且在孵育已经开始之后的48小时内、36小时内或30小时内开始转导。在一些实施方案中,在孵育和转导之后进行培育,并且在孵育已经开始之后72小时内、66小时内或60小时内开始培育。在某些实施方案中,进行培育直到实现细胞的阈值量、密度和/或扩增,直到实现细胞的阈值量、密度和/或扩增之后的至少一天,和/或直到孵育开始之后的至少8天、9天、10天、11天或12天。

[0102] 在某些实施方案中,在所述过程的任何阶段或步骤中,可以对一部分细胞进行采样或收集,例如,如在分离、孵育、工程化、培育和/或配制期间,可以从富集T细胞的组合物中获取细胞,同时所述组合物保留在封闭系统中。在某些实施方案中,可以分析此类细胞的标记、特征或特性,包括但不限于活力、凋亡、激活、刺激、生长和/或耗竭。在一些实施方案中,通过自动化过程对细胞进行采样或收集,同时富集T细胞的组合物保留在封闭系统中。在一些实施方案中,对采样或收集的细胞的分析是自动化的。在特定实施方案中,在无菌条件下在密闭系统中进行分析。

[0103] 在一些实施方案中,本文提供了产生工程化细胞的过程,所述过程包括以下步骤:在刺激条件下孵育输入细胞组合物(例如,以激活组合物中的T细胞),使细胞组合物进行工程化(例如,转导)以表达重组受体(例如CAR),在促进细胞增殖或扩增的条件下培育细胞,和/或收获或收集细胞以产生包含工程化细胞(例如用于细胞疗法的工程化T细胞)的细胞组合物。在一些实施方案中,将输入细胞组合物在刺激条件下孵育,所述刺激条件包括:刺激试剂(例如,章节I-B-1中所述的珠试剂)与细胞的比率为或为约1:1;输入组合物包含比率为或为约1:1的CD4+T细胞和CD8+T细胞(例如,可以将富集CD4+T细胞的组合物和富集CD8+T细胞的组合物以等于或约1:1的比率合并、混合和/或组合以产生输入组合物);在刺激条件下(例如用刺激试剂)孵育的总持续时间在约12小时与约36小时之间,例如在约18小时与约30小时之间;在刺激条件下例如在刺激试剂的存在下以在约 5×10^5 个细胞/mL与约 5×10^7 个细胞/mL之间(例如等于或约 3×10^6 个细胞/mL)的密度孵育细胞(例如输入组合物的细胞);和/或在无血清培养基(例如,包含一种或多种重组细胞因子(如IL-2、IL-7和IL-15)的无血清培养基)中刺激和/或激活细胞(例如输入组合物的细胞)。在一些实施方案中,使细

胞在包括以下的条件下经历工程化：在离心作用如旋转接种（例如离心接种）（例如在约1600x g下持续约60分钟）下，使细胞与编码重组蛋白（例如重组受体）的核酸分子接触；以在约 5×10^5 个细胞/mL与约 5×10^7 个细胞/mL之间（例如等于或约 1×10^6 个细胞/mL）的密度使细胞经历工程化；使来自在刺激条件下培养的组合物约 100×10^6 个细胞经历工程化；工程化步骤（例如转导）的总持续时间在约12小时与约36小时之间，例如在约18小时与约30小时之间；和/或在无血清培养基（例如包含一种或多种重组细胞因子（例如IL-2、IL-7和IL-15）的无血清培养基）中使细胞经历工程化。在一些实施方案中，将细胞在促进细胞增殖或扩增的条件下培育，所述条件包括：在摇摆和/或灌注条件下培育细胞；和/或在无血清培养基（例如包含一种或多种重组细胞因子（例如IL-2、IL-7和IL-15）的无血清培养基，任选地使用比用于刺激/激活和/或工程化的无血清培养基更高浓度的重组细胞因子）中培育细胞。在一些实施方案中，当细胞实现阈值量、浓度和/或扩增，例如至少约 3500×10^6 个细胞或约 5500×10^6 个细胞的阈值细胞计数（例如，总有核细胞计数）时，培育结束并且收获细胞。在一些实施方案中，当细胞在刺激/激活、工程化、培育和/或收获过程期间在给定时间未实现目标或阈值时，可以将细胞刺激/激活、进行工程化和/或培育，直到当实现目标或阈值时的下一个时间点。

[0104] 在一些实施方案中，本文提供了产生工程化细胞的过程，所述过程包括以下步骤：在刺激条件下孵育输入细胞组合物（例如，以激活组合物中的T细胞），使细胞组合物进行工程化（例如，转导）以表达重组受体（例如CAR），在促进细胞增殖或扩增的条件下培育细胞，和/或收获或收集细胞以产生包含工程化细胞（例如用于细胞疗法的工程化T细胞）的细胞组合物。在一些实施方案中，将输入细胞组合物在刺激条件下孵育，所述刺激条件包括：刺激试剂（例如，章节I-B-1中所述的珠试剂）与细胞的比率为或为约1:1；输入组合物包含比率为或为约1:1的CD4+T细胞和CD8+T细胞（例如，可以将富集CD4+T细胞的组合物和富集CD8+T细胞的组合物以等于或约1:1的比率合并、混合和/或组合以产生输入组合物）；在刺激条件下（例如用刺激试剂）孵育的总持续时间在约12小时与约36小时之间，例如在约18小时与约30小时之间；在刺激条件下例如在刺激试剂的存在下以在约 5×10^5 个细胞/mL与约 5×10^7 个细胞/mL之间（例如等于或约 3×10^6 个细胞/mL）的密度孵育细胞（例如输入组合物的细胞）；和/或在无血清培养基（例如，包含一种或多种重组细胞因子（如IL-2、IL-7和IL-15）的无血清培养基）中刺激和/或激活细胞（例如输入组合物的细胞）。在一些实施方案中，使细胞在包括以下的条件下经历工程化：在离心作用如旋转接种（例如离心接种）（例如在约1600x g下持续约60分钟）下，使细胞与编码重组蛋白（例如重组受体）的核酸分子接触；以在约 5×10^5 个细胞/mL与约 5×10^7 个细胞/mL之间（例如等于或约 1×10^6 个细胞/mL）的密度使细胞经历工程化；使来自在刺激条件下培养的组合物至少约 100×10^6 个细胞和至多约 200×10^6 个细胞经历工程化；工程化步骤（例如转导）的总持续时间在约12小时与约36小时之间，例如在约18小时与约30小时之间；和/或在无血清培养基（例如包含一种或多种重组细胞因子（例如IL-2、IL-7和IL-15）的无血清培养基）中使细胞经历工程化。在一些实施方案中，将细胞在促进细胞增殖或扩增的条件下培育，所述条件包括：在摇摆和/或灌注条件下培育细胞；和/或在无血清培养基（例如包含一种或多种重组细胞因子（例如IL-2、IL-7和IL-15）的无血清培养基，任选地使用比用于刺激/激活和/或工程化的无血清培养基更高浓度的重组细胞因子）中培育细胞。在一些实施方案中，当细胞实现阈值量、浓度和/或扩增，

例如至少约 2400×10^6 个细胞的阈值细胞计数(例如,总有核细胞计数)时,并且当细胞实现阈值活力,例如至少约75%或至少约85%的细胞是活的时,培育结束并且收获细胞。在一些实施方案中,当细胞在刺激/激活、工程化、培育和/或收获过程期间在给定时间未实现目标或阈值时,可以将细胞刺激/激活、进行工程化和/或培育,直到当实现目标或阈值时的下一个时间点。

[0105] 在一些实施方案中,可以将通过所提供方法生产和/或处理的细胞或细胞组合物与通过示例性和/或替代过程处理或生产的细胞或细胞组合物进行比较。在一些实施方案中,替代和/或示例性过程可以在一个或多个特定方面不同,但是另外含有被比较的所提供方法的实施方案或方面的相似或相同的特征、方面、步骤、阶段、试剂和/或条件。例如,当将所提供的方法与在试剂的存在下孵育细胞结合使用时,可以将此类细胞与在示例性和/或替代过程中未与试剂一起孵育的细胞进行比较。在一些实施方案中,除非另有规定,否则所提供的方法和示例性和/或替代过程原本是相似和/或相同的,例如具有相似或相同的分离、选择、富集、激活、刺激、工程化、转染、转导、培育和/或配制的步骤。在一些实施方案中,除非另有规定,否则所提供的方法和替代过程从相同或相似类型的生物样品、和/或相同细胞类型的过程细胞和/或输入细胞中分离、选择和/或富集细胞。

[0106] 还提供了通过所述方法制备的细胞和组合物(包括药物组合物和配制品),以及用于进行所述方法的试剂盒、系统和装置。还提供了使用通过所述方法制备的细胞和组合物的方法(包括治疗方法,如用于过继细胞疗法的方法),以及用于给予受试者的药物组合物。

[0107] A. 样品和细胞制备

[0108] 在特定实施方案中,所提供的方法与从生物样品中分离、选择和/或富集细胞以产生富集细胞(例如T细胞)的一种或多种输入组合物结合使用。在一些实施方案中,所提供的方法包括从生物样品中分离细胞或其组合物,所述生物样品例如是获得自或源自受试者的那些生物样品,所述受试者例如是患有特定疾病或病症或需要细胞疗法或将被给予细胞疗法的受试者。在一些方面,受试者是人,例如是需要特定治疗干预的患者的受试者,所述治疗干预例如是针对其分离、处理和/或工程化细胞的过继细胞疗法。因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括组织、流体和直接从受试者获取的其他样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。

[0109] 在一些方面,样品是血液或血液来源的样品,或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如,过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0110] 在一些例子中,例如通过单采术或白细胞单采术获得来自受试者的循环血液的细胞。在一些方面,样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0111] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的所述血细胞以例如去除血浆级分,并将

所述细胞置于适当缓冲液或介质中用于后续处理步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或全部二价阳离子。在一些方面,洗涤步骤是通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞加工器,Baxter)根据制造商的说明书完成的。在一些方面,洗涤步骤是通过切向流过滤(TFF)根据制造商的说明书完成的。在一些实施方案中,洗涤后将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含 Ca^{2+} / Mg^{2+} 的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将细胞直接重悬于培养基中。

[0112] 在一些实施方案中,制备方法在分离、选择和/或富集和/或用于转导和工程化的孵育之前或之后包括冷冻(例如低温保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,冷冻和后续解冻步骤去除所述细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤后将细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任一种。在一些实施方案中,将细胞以或约12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%、或5.0% DMSO、或在为或约1%与为或约15%之间、在为或约6%与为或约12%之间、在为或约5%与为或约10%之间、或在为或约6%与为或约8%之间的DMSO的终浓度冷冻(例如,低温冷冻或低温保存)在介质和/或溶液中。在特定实施方案中,将细胞以等于或约5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%、或0.25% HAS、或在0.1%与-5%之间、在0.25%与4%之间、在0.5%与2%之间、或在1%与2%之间的HSA的终浓度冷冻(例如,低温冷冻或低温保存)在介质和/或溶液中。一个例子涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后通常将细胞以等于或约1°/分钟的速率冷冻至等于或约-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0113] 在一些实施方案中,细胞或群体的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、富集所需组分、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、大小、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过溶解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度进行离心来从外周血制备白细胞。

[0114] 在一些实施方案中,选择步骤的至少一部分包括将细胞与选择试剂一起孵育。例如作为选择方法的一部分的与一种或多种选择试剂一起孵育可以如下进行:使用一种或多种选择试剂,以用于基于一种或多种特定分子(例如表面标记(例如表面蛋白)、细胞内标记或核酸)在细胞中或细胞上的表达或存在来选择一种或多种不同细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的方法,使用一种或多种选择试剂,基于此类标记进行分离。在一些实施方案中,一种或多种选择试剂导致分离,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,选择包括与一种或多种试剂一起孵育,用于基于一种或多种标记(通常是细胞表面标记)的细胞表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过与特异性地结合至此类标记的抗体或结合配偶体一起孵育,之后通常进行洗涤步骤并分离已结合抗体或结合配偶体的细胞与未结合至抗体或结合配偶体的那些细胞。

[0115] 在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量的所需的基于亲和力的选择

试剂混合。基于免疫亲和力的选择可以使用任何系统或方法进行,所述系统或方法导致在分离的细胞与特异性地结合细胞上的标记(例如固体表面(例如颗粒)上的抗体或其他结合配偶体)的分子之间有利的能量相互作用。在一些实施方案中,方法是使用包被有对细胞标记具有特异性的选择剂(例如抗体)的颗粒(如珠,例如磁珠)进行的。可以在摇动或混合的同时,以恒定的细胞密度与颗粒(例如珠)之比,将颗粒(例如珠)在容器(如管或袋)中与细胞一起孵育或混合,以帮助促进能量有利的相互作用。在其他情况下,所述方法包括选择细胞,其中全部或部分选择是在离心室的腔中进行,例如在离心旋转下进行。在一些实施方案中,将细胞与选择试剂(例如基于免疫亲和力的选择试剂)一起孵育是在离心室中进行。在某些实施方案中,使用在国际专利申请公开号W02009/072003或US20110003380 A1中所述的系统、装置或设备进行分离或分开。在一个例子中,所述系统是如国际公开号W0 2016/073602中所述的系统。

[0116] 在一些实施方案中,通过在离心室的空腔中实施此类选择步骤或其部分(例如,与抗体包被的颗粒(例如磁珠)一起孵育),用户能够控制某些参数,例如各种溶液的体积、在处理期间溶液的添加及其定时,与其他可用方法相比,这可以提供多种优势。例如,在孵育期间减少空腔中液体体积的能力可以增加选择中使用的颗粒(例如珠试剂)的浓度,并由此增加溶液的化学势,而不影响空腔中的细胞总数。这又可以增强正在处理的细胞与用于选择的颗粒之间的成对相互作用。在一些实施方案中,例如,在与如本文所述的系统、电路和控制相关联时,在室中进行孵育步骤,允许用户在孵育期间的一个或多个所需时间实现对溶液的搅动,这也可以改善相互作用。

[0117] 在一些实施方案中,选择步骤的至少一部分是在离心室中进行,其包括将细胞与选择试剂一起孵育。在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量所需的基于亲和力的选择试剂混合,所述体积和所述量显著少于在管或容器中根据制造商的说明书进行类似选择以选择相同数量的细胞和/或相同体积的细胞时通常所用的体积和量。在一些实施方案中,所采用的一种或多种选择试剂的量为根据制造商的说明针对相同数量的细胞和/或相同体积的细胞在基于管或容器的孵育中用于选择细胞的相同的一种或多种选择试剂的量的不超过或不超过约5%、不超过或不超过约10%、不超过或不超过约15%、不超过或不超过约20%、不超过或不超过约25%、不超过或不超过约50%、不超过或不超过约60%、不超过或不超过约70%或不超过或不超过约80%。

[0118] 在一些实施方案中,对于细胞的选择,例如基于免疫亲和力的选择,将细胞在室空腔中在组合物中孵育,所述组合物还含有具有选择试剂的选择缓冲液,所述选择试剂例如特异性地结合至希望富集和/或耗尽的细胞上(而不是组合物中其他细胞上)的表面标记的分子,例如抗体,其任选地偶联到支架(例如聚合物或表面,例如珠,例如磁珠,例如与对CD4和CD8具有特异性的单克隆抗体偶联的磁珠)。在一些实施方案中,如所描述的,将选择试剂添加至室空腔中的细胞,所添加的量与在振荡或旋转的管中进行选择时,实现相同数量的细胞或相同体积的细胞的大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的选择试剂的量相比显著小于或小于约(例如所述量的不超过或不超过约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%)。在一些实施方案中,在向细胞和选择试剂添加选择缓冲液的情况下进行孵育,以实现例如为或约10mL至为或约200mL(例如至少或至少约或约或10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL或200mL)试剂的孵育的目标体积。在

一些实施方案中,将选择缓冲液和选择试剂在添加至细胞之前预先混合。在一些实施方案中,将选择缓冲液和选择试剂单独添加至细胞。在一些实施方案中,选择孵育是在周期性温和混合条件下进行的,这可有助于促进能量上有利的相互作用,从而允许在实现高选择效率的同时使用较少的总选择试剂。

[0119] 在一些实施方案中,与选择试剂一起孵育的总持续时间为从5分钟或约5分钟至6小时或约6小时,如30分钟至3小时,例如至少或至少约30分钟、60分钟、120分钟或180分钟。

[0120] 在一些实施方案中,孵育通常在混合条件下进行,例如在旋转的存在下,通常以相对低的力或速度旋转,例如速度低于用于使细胞沉淀的速度,例如从或从约600rpm至或至约1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm),例如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下,所述RCF为从或从约80g至100g(例如,为或约或至少80g、85g、90g、95g或100g)。在一些实施方案中,旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行,例如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒,例如旋转大约1或2秒,然后休息大约5、6、7或8秒。

[0121] 在一些实施方案中,这个过程是在集成有所述室的完全封闭的系统内进行的。在一些实施方案中,这个过程(并且在一些方面还有一个或多个另外的步骤,例如预先洗涤步骤洗涤含有细胞的样品,例如单采术样品)以自动化方式进行,使得将细胞、试剂和其他组分在适当时间吸入和推出所述室并进行离心,以便使用自动化程序在单一封闭系统中完成洗涤和结合步骤。

[0122] 在一些实施方案中,在孵育和/或混合细胞和一种和/或多种选择试剂后,使所孵育的细胞经历分离,以基于一种或多种特定试剂的存在或不存在来选择细胞。在一些实施方案中,在同一封闭系统中进行分离,其中将细胞与选择试剂一起进行孵育。在一些实施方案中,在与选择试剂一起孵育之后,将所孵育的细胞(包括其中已经结合选择试剂的细胞)转移到系统中用于基于免疫亲和力和来分离细胞。在一些实施方案中,用于基于免疫亲和力的分离的系统是或含有磁分离柱。

[0123] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已结合试剂(例如抗体或结合配偶体)的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留尚未结合试剂例如抗体或结合配偶体的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在无法获得专门鉴定异质性群体中的细胞类型的抗体,使得最好基于除了所需群体以外的细胞表达的标记来进行分离的情况下,阴性选择可以特别有用。

[0124] 在一些实施方案中,所述过程步骤还包括对所孵育的细胞的阴性和/或阳性选择,例如使用可以进行基于亲和力的选择的系统或设备。在一些实施方案中,通过经由阳性选择富集特定细胞群,或经由阴性选择耗尽特定细胞群来进行分离。在一些实施方案中,阳性或阴性选择是通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育完成的,所述一种或多种抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达(标记⁺)或以相对较高水平表达(标记^高)的一种或多种表面标记特异性结合。

[0125] 分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群体或表达特定标记的细胞。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记的细胞的完全不存在。同样,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致全

部此类细胞的完全去除。

[0126] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经历另一个分离步骤,如后续阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记具特异性)一起孵育。同样,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择多种细胞类型。在某些实施方案中,将分离步骤重复和/或进行超过一次,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择级分经历相同的分离步骤,例如重复的阳性或阴性选择。在一些例子中,将单一分离步骤重复和/或进行超过一次,例如以增加所选择的细胞的纯度和/或以进一步从阴性选择的级分中去除和/或耗尽阴性选择的细胞。在某些实施方案中,将一个或多个分离步骤进行两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或超过十次。在某些实施方案中,将一个或多个选择步骤进行和/或重复一次与十次之间、一次与五次之间或三次与五次之间。

[0127] 例如,在一些方面,T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD95⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞)通过阳性或阴性选择技术来分离。在一些实施方案中,通过与特异性地结合此类标记的一种或多种抗体或结合配偶体一起孵育来选择此类细胞。在一些实施方案中,抗体或结合配偶体可以例如直接或间接地缀合至实现选择的固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠)。例如,可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS[®]M-450CD3/CD28 T Cell Expander和/或ExpACT[®]珠)阳性选择CD3⁺、CD28⁺T细胞。

[0128] 在一些实施方案中,通过阴性选择在非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记(如CD14),将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一种或多种幼稚、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记的阳性或阴性选择,可以将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类成亚群。

[0129] 在一些实施方案中,如通过基于与相应亚群相关的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8⁺细胞针对幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞进行富集以增加功效,如以改善给予后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见例如Terakura等人(2012) Blood.1:72-82;Wang等人(2012) J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,组合富含 T_{CM} 的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞进一步增强功效。

[0130] 在一些实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻子集中。可以例如使用抗CD8和抗CD62L抗体将PBMC针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分进行富集或耗尽。

[0131] 在一些实施方案中,对中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD27、CD28、CD95、CD3和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,富集 T_{CM} 细胞的CD8⁺群体的分离是通过耗尽表达CD4、CD14、CD45RA的细胞以及对表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行的。在一个方面,中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集从基于CD4表达所选择的阴性细胞级分开始进行,使所述阴性细胞级分经历基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择且经历基于CD62L的

阳性选择。在一些方面,此类选择是同时进行的,并且在其他方面,是以任何顺序依次进行的。在一些方面,用于制备CD8+细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于产生CD4+细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。在一些实施方案中,对CD4+细胞群的选择和对CD8+细胞群的选择同时进行。在一些实施方案中,以任一顺序依次进行对CD4+细胞群的选择和对CD8+细胞群的选择。在一些实施方案中,用于选择细胞的方法可以包括如在所公开的美国申请号US20170037369中所述的那些。在一些实施方案中,可以在选择之后组合所选择的CD4+细胞群和所选择的CD8+细胞群。在一些方面,可以将所选择的CD4+细胞群和所选择的CD8+细胞群组合在如本文所述的生物反应器袋中。

[0132] 在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CD27+、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD45RA-和/或CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CD62L+和CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CCR7+和CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CCR7+和CD45RA-。在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CD62L+和CCR7+。在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CD62L+/CD45RA-、CCR7+/CD45RA-、CD62L+/CCR7+、或CD62L+/CCR7+/CD45RA-,并且具有中等至高表达的CD44。在一些实施方案中,中枢记忆CD8+细胞呈CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-、CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-、CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+、或CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-。

[0133] 在特定实施方案中,使生物样品(例如PBMC或其他白细胞的样品)经历CD4+T细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。在某些实施方案中,CD8+T细胞选自阴性级分。在一些实施方案中,使生物样品经历CD8+T细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。在某些实施方案中,CD4+T细胞选自阴性级分。

[0134] 在特定例子中,使PBMC样品或其他白细胞样品经历CD4+细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。然后使阴性级分经历基于CD14和CD45RA或CD19的表达的阴性选择,以及基于中枢记忆T细胞特有的标记(如CD62L或CCR7)的阳性选择,其中阳性和阴性选择是以任一顺序来进行。

[0135] 在一些实施方案中,通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4+T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。可以通过标准方法获得CD4+淋巴细胞。在一些实施方案中,幼稚CD4+T淋巴细胞是CD45RO-、CD45RA+、CD62L+、或CD4+T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CD62L+和CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CD27+、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD45RA-和/或CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CD62L+和CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CCR7+和CD45RO+。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CCR7+和CD45RA-。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CD62L+和CCR7+。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CD62L+/CD45RA-、CCR7+/CD45RA-、CD62L+/CCR7+、或CD62L+/CCR7+/CD45RA-,并且具有中等至高表达的CD44。在一些实施方案中,中枢记忆CD4+细胞呈CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-、CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-、CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+、或CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-。在一些实施方案中,效应CD4+细胞呈CD62L-和CD45RO-。

[0136] 在一个例子中,为了通过阴性选择富集CD4+细胞,单克隆抗体混合剂通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,抗体或结合配偶体结

合至固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠),以允许分离细胞以供阳性和/或阴性选择。例如,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分开技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页S.A.Brooks和U.Sch umacher编辑©Humana Press Inc.,新泽西州托托瓦)。

[0137] 在一些方面,将待分离的所孵育的细胞样品或组合物与含有小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如顺磁珠(例如Dynabeads或MACS®珠))的选择试剂一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附接至结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体特异性地结合至需要分离(例如,需要进行阴性或阳性选择)的一种细胞、多种细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记)。

[0138] 在一些实施方案中,磁粒或磁珠包含结合至特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)的磁响应材料。存在许多熟知的用于磁分离方法的磁响应材料。合适的磁粒包括在Molday,美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中所述的那些,将所述专利通过引用特此并入。胶体大小的颗粒,如在Owen美国专利号4,795,698以及Liberti等人,美国专利号5,200,084中所述的那些是其他例子。

[0139] 孵育通常在这样的条件下进行,由此抗体或结合配偶体或者与附接于磁粒或磁珠的此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果存在于样品内的细胞上的话)特异性结合。

[0140] 在某些实施方案中,磁响应颗粒被包被在一抗或其他结合配偶体、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,磁粒经由对一种或多种标记具特异性的一抗的包被而附接于细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记细胞而不是珠,然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如,链霉亲和素)包被的磁粒。在某些实施方案中,链霉亲和素包被的磁粒是与生物素化的一抗或二抗结合使用的。

[0141] 在一些方面,在其中将样品置于磁场中的过程中实现分离,并且具有附接于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引至磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被吸引至磁体的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性与阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进行进一步处理或使其经历进一步的分离步骤。

[0142] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活的细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotech,Auburn,CA)进行的。磁激活细胞分选(MACS)例如CliniMACS系统能够高纯度选择具有附接于其上的磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依序洗脱非靶种类和靶种类。也就是说,附接于磁化颗粒的细胞被保持在适当的位置,而未附接的种类被洗脱。然后,在完成这个第一洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,标记非靶细胞并将其从异质性细胞群中耗尽。

[0143] 在一些实施方案中,磁响应颗粒保持附接于细胞,所述细胞随后被孵育、培养和/或工程化;在一些方面,颗粒保持附接于细胞以用于给予患者。在一些实施方案中,从细胞中去除可磁化或磁响应颗粒。用于从细胞中去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,

可磁化颗粒是可生物降解的。

[0144] 在一些方面,分离和/或其他步骤是使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)来进行的,例如用于在封闭且无菌的系统以临床规模水平自动化分离细胞。部件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,集成计算机控制仪器的全部部件并指示所述系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面,磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。蠕动泵控制整个管组的流速,并且与夹管阀一起确保经过所述系统的缓冲液的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0145] 在一些方面,CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,其在无菌、无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁粒标记细胞之后,洗涤细胞以去除过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,所述管组又连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,系统将细胞样品自动施加到分离柱上。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于与本文所述的方法一起使用的细胞群未被标记并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文所述的方法一起使用的细胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文所述方法一起使用的细胞群在去除磁场之后从柱中洗脱,并收集在细胞收集袋内。

[0146] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统配备有细胞处理联合体,其允许通过离心自动化洗涤和分级细胞。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件,其通过辨识源细胞产品的宏观层来确定最佳细胞分级终点。例如,将外周血自动分离为红细胞、白细胞和血浆层。所述CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成的细胞培育室,其实现细胞培养方案,例如细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可以允许无菌移除和补充培养基,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见,例如,Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82, 和Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0147] 在一些实施方案中,经由流式细胞术收集并富集(或耗尽)本文所述的细胞群,其中针对多种细胞表面标记染色的细胞携带于流体流中。在一些实施方案中,经由制备规模(FACS)分选来收集并富集(或耗尽)本文所述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗尽)本文描述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140, Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 和Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1 (5) :355-376)。在两种情况下,可以用多种标记来标记细胞,从而允许以高纯度分离明确限定的T细胞子集。

[0148] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测标记来标记抗体或结合配偶体,以促进分离供阳性和/或阴性选择。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中,基于对一种或多种细胞表面标记具特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞携带于流体流中,如通过荧光激活细胞分选(FACS)(包括制备规模(FACS))和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞检测系统组合。此类方法允许基于多种标记同时进行阳性和阴性选择。

[0149] 在一些实施方案中,分离和/或选择导致富集T细胞(例如CD3+T细胞、CD4+T细胞

和/或CD8+T细胞)的一种或多种组合物。在一些实施方案中,从单一生物样品中分离、选择、富集或获得富集T细胞的两种或更多种分开的组合物。在一些实施方案中,分开的组合物是从收集、获取和/或获得自同一受试者的单独生物样品中分离、选择、富集和/或获得的。

[0150] 在某些实施方案中,分离和/或选择导致富集T细胞的一种或多种组合物,所述一种或多种组合物包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的CD3+T细胞。在特定实施方案中,富集T细胞的组合物本质上由CD3+T细胞组成。

[0151] 在某些实施方案中,分离和/或富集导致富集CD4+T细胞的组合物,所述组合物包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的CD4+T细胞。在某些实施方案中,CD4+T细胞的输入组合物包含小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、小于或小于约1%、小于或小于约0.1%、或小于或小于约0.01%的CD8+T细胞,和/或不含有CD8+T细胞,和/或不含或基本上不含CD8+T细胞。在一些实施方案中,富集T细胞的组合物本质上由CD4+T细胞组成。

[0152] 在某些实施方案中,分离和/或富集导致富集CD8+T细胞的组合物,所述组合物包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的CD8+T细胞。在某些实施方案中,CD8+T细胞的组合物含有小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、小于或小于约1%、小于或小于约0.1%、或小于或小于约0.01%的CD4+T细胞,和/或不含有CD4+T细胞,和/或不含或基本上不含CD4+T细胞。在一些实施方案中,富集T细胞的组合物本质上由CD8+T细胞组成。

[0153] 在一些实施方案中,在分离、选择和/或富集之后,将一种或多种富集T细胞的组合物冷冻,例如低温保存和/或低温冷冻。在特定实施方案中,在分离、选择和/或富集之后,将富集CD4+T细胞的组合物冷冻,例如低温保存和/或低温冷冻。在某些实施方案中,在分离、选择和/或富集之后,将富集CD8+T细胞的组合物冷冻,例如低温保存和/或低温冷冻。在一些实施方案中,在孵育、激活、刺激、工程化、转导、转染、培育、扩增、收获和/或配制细胞组合物的任何步骤之前,将一种或多种富集T细胞的组合物冷冻,例如低温保存和/或低温冷冻。在特定实施方案中,在孵育、激活、刺激、工程化、转导、转染、培育、扩增、收获和/或配制细胞组合物的任何步骤之前,将富集CD4+T细胞的组合物冷冻,例如低温保存和/或低温冷冻。在一些实施方案中,在孵育、激活、刺激、工程化、转导、转染、培育、扩增、收获和/或配制细胞组合物的任何步骤之前,将富集CD8+T细胞的组合物冷冻,例如低温保存和/或低温冷冻。在特定实施方案中,将一种或多种低温冷冻的输入组合物例如在或在约-80℃下储存在12小时与7天之间、在24小时与120小时之间、或在2天与5天之间。在特定实施方案中,将一

种或多种低温冷冻的输入组合物在或在约-80℃下储存少于10天、9天、8天、7天、6天、或5天、4天、3天、2天或1天的时间量。在一些实施方案中,将一种或多种低温冷冻的输入组合物在或在约-80℃下储存或储存约1天、2天、3天、4天、5天或6天。

[0154] 在一些实施方案中,洗涤含有细胞的样品(例如单采术产物或白细胞单采术产物),以便去除在单采术或白细胞单采术期间添加的一种或多种抗凝剂,如肝素。

[0155] 在一些实施方案中,将含有细胞的样品(例如,全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单核细胞(PBMC)样品、未分级的T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物、白细胞单采术产物)低温保存和/或低温保护(例如冷冻),并且然后在分离、选择、激活、刺激、工程化、转导、转染、孵育、培养、收获、配制细胞群和/或将所配制的细胞群给予至受试者的任何步骤之前进行解冻。

[0156] 在特定实施方案中,将单采术产物或白细胞单采术产物低温保存和/或低温保护(例如冷冻),并且然后在进行如下所述的细胞选择或分离步骤(例如T细胞选择或分离步骤)之前进行解冻。在一些实施方案中,在对低温保存和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物进行T细胞选择或分离步骤之后,在任何后续步骤(激活、刺激、工程化、转导、转染、孵育、培养、收获、配制细胞群和/或将所配制的细胞群给予至受试者的步骤)期间或之间,不进行额外的低温保存和/或低温保护步骤。例如,选自解冻的低温保存和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物的T细胞在被解冻用于下游过程(如T细胞激活/刺激或转导)之前不会再次被低温保存和/或低温保护。

[0157] 在特定实施方案中,将低温保存和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物存放(例如,在冷冻样品之前没有进行T细胞选择),这在一些方面可以为随后的制造步骤提供更大的灵活性。在一个方面,在选择之前存放细胞增加下游过程的细胞产量,并且较早存放细胞可能意味着它们更健康并且可能更容易满足制造成功标准。在另一个方面,一旦解冻,就可以对低温保存和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物进行一种或多种不同的选择方法。此方法的优点尤其是增强用于治疗受试者(例如在样品供体和/或另一名接受者中)的疾病或病症的细胞疗法的细胞的可用性、功效和/或其他方面。

[0158] 在一些实施方案中,在供体被诊断出患有疾病或病症之后的时间,在细胞选择之前或在不进行先前的细胞选择(例如,没有先前的T细胞选择,如通过色谱法的选择)的情况下收集并低温保存和/或低温保护样品(例如单采术或白细胞单采术样品)。在一些方面,低温保存的时间也是在供体已经接受以下中的一种或多种之前:疾病或病症的任何初始治疗、任何靶向治疗或为了疾病或病症的治疗而标记的任何治疗、或除放射和/或化学疗法以外的任何治疗。在一些实施方案中,在疾病的初始治疗后的疾病的首次复发之后、且在供体或受试者接受疾病的后续治疗之前,收集样品。初始和/或后续治疗可以是除细胞疗法以外的疗法。在一些实施方案中,所收集的细胞可以在初始和/或后续治疗后用于在细胞疗法中使用。在一个方面,没有进行先前细胞选择的低温保存和/或低温保护的样品可以帮助降低前期费用,例如与随机化临床试验中可能交叉并需要后期治疗的未治疗患者相关的费用。

[0159] 在一些实施方案中,在疾病的二线治疗后在第二次疾病复发之后,且在供体或受试者接受疾病的后续治疗之前,在细胞选择之前或在不进行先前的细胞选择(例如,没有先前的T细胞选择,如通过色谱法的选择)的情况下收集并低温保存和/或低温保护样品(例如单采术或白细胞单采术样品)。在一些实施方案中,例如通过评估某些风险因素,将患者鉴

定为可能在二线治疗后复发。在一些实施方案中,风险因素是基于疾病类型和/或遗传学,如双重打击淋巴瘤、原发性难治性癌症或激活的B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,风险因素是基于临床表现,如一线治疗后的早期复发、或治疗后的其他不良预后指标(例如,IPI(国际预后指数)>2)。

[0160] 在一些实施方案中,在供体或受试者被诊断出患有疾病之前的时间,在细胞选择之前或在不进行先前的细胞选择(例如,没有先前的T细胞选择,如通过色谱法的选择)的情况下收集并低温保存和/或低温保护样品(例如单采术或白细胞单采术样品)。在一些方面,可以确定供体或受试者有患上疾病的风险。在一些方面,供体或受试者可以是健康受试者。在某些情况下,如果在生命的后期需要细胞疗法,则供体或受试者可以选择存放或储存细胞而不会被视为有患上疾病的风险或被诊断出患有疾病。在一些实施方案中,基于因素如遗传突变、遗传异常、遗传破坏、家族病史、蛋白质异常(如蛋白质产生和/或加工的缺陷)、以及可能增加患上疾病的风险的生活方式选择,可以认为供体或受试者有患上疾病的风险。在一些实施方案中,收集细胞作为预防。

[0161] 在一些实施方案中,将低温保存和/或低温保护的细胞样品(例如单采术或白细胞单采术样品)(例如尚未经过先前的细胞选择(例如,未经先前的T细胞选择,例如通过色谱法的选择)的细胞样品)储存或存放大于或等于或约12小时、24小时、36小时或48小时的时间段。在一些实施方案中,将样品储存或存放大于或等于1周、2周、3周或4周的时间段。在一些实施方案中,将样品放置于长期存储或长期存放中。在一些方面,样品被储存大于或等于或约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年或更长时间的时间段。

[0162] 在一些实施方案中,将从供体中获取的单采术或白细胞单采术样品在冷却的环境中运输到存储或处理设施,和/或在存储设施中低温储存或在处理设施中进行处理。在一些实施方案中,在运输之前,例如通过选择T细胞(如CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)来处理样品。在一些实施方案中,在运输之后且在低温储存样品之前进行这种处理。在一些实施方案中,在低温存储后解冻样品之后进行处理。

[0163] 通过允许供体在当供体以及因此其细胞尚未接受针对疾病的广泛治疗时和/或在缩小疾病或病症或其诊断之前的阶段储存其细胞,此类细胞与在一轮或多轮治疗之后收集的细胞相比可能在细胞疗法中使用方面具有某些优势。例如,在一轮或多轮治疗之前收获的细胞比已经经历几轮治疗的细胞可能更加健康,可能展现出更高水平的某些细胞活性,可能生长得更快,和/或可能更容易接受基因操作。根据本文所述的实施方案的优点的另一个例子可以包括便利性。例如,通过在需要供体细胞来进行细胞疗法之前收集(任选地处理)和储存供体细胞,如果且当接受者以后需要它们时,所述细胞将可容易地获得。这可以增加单采术实验室容量,为技术人员提供更大的灵活性以安排单采术收集过程。

[0164] 用于低温储存和处理来自样品如单采术样品的细胞的示例性方法和系统可以包括在国际公开申请号W0 2018170188中所述的那些。在一些实施方案中,所述方法和系统涉及在患者需要细胞疗法之前收集单采术,并且然后对单采术样品进行低温保存以供以后用于在用重组受体(例如CAR)将细胞(例如T细胞)进行工程化的过程中使用。在一些情况下,此类过程可以包括本文所述的那些。在一些实施方案中,从受试者收集单采术样品,并在后

续T细胞选择、激活、刺激、工程化、转导、转染、孵育、培养、收获、配制细胞群和/或将所配制的细胞群给予至受试者之前将其低温保存。在此类例子中,在使样品经历一个或多个选择步骤(如本文所述的任何步骤)之前,将低温保存的单采术样品解冻。

[0165] 在一些实施方案中,在其用于制造用于细胞疗法的细胞群(例如含有CAR+T细胞的T细胞群)的下游处理之前,将低温保存和/或低温保护的细胞样品(例如单采术或白细胞单采术样品)(例如尚未经历先前的细胞选择(例如,未经先前的T细胞选择,例如通过色谱法的选择)的细胞样品)解冻。在一些实施方案中,这样的低温保存和/或低温保护的细胞样品(例如单采术或白细胞单采术样品)与本文提供的用于将T细胞疗法(如CAR+T细胞疗法)工程化的过程结合使用。在特定例子中,在收获/形成步骤之前或期间不进行进一步的低温保存步骤。

[0166] 1. 输入组合物

[0167] 在某些实施方案中,所提供的方法与生产和/或制备细胞的输入组合物结合使用。在某些实施方案中,输入细胞组合物是用于在基因工程化的细胞(例如将被基因工程化和/或将经历生产基因工程化细胞的过程的细胞)的组合物。在某些实施方案中,将用编码重组受体的核酸处理、接触和/或孵育所述细胞。在某些实施方案中,输入细胞组合物含有CD4+T细胞和CD8+T细胞。在特定实施方案中,输入细胞组合物含有为幼稚和/或幼稚样T细胞的CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0168] 在一些实施方案中,所需比率、固定比率和/或受控比率是细胞的如下比率或数量,在所述比率或数量下,两种类型的细胞或分离的细胞群被包括于输入细胞组合物中,所述输入细胞组合物被设计为在孵育和/或工程化步骤或其他处理步骤完成时和/或在解冻后和/或在即将给予受试者之前,产生具有工程化CD4+与CD8+T细胞的所需比率、限定比率和/或受控比率或在其容许误差率或差异内的输出细胞组合物。

[0169] 在特定实施方案中,输入组合物是富集CD3+T细胞的组合物。在一些实施方案中,输入组合物是或包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的CD3+T细胞。在一些实施方案中,输入组合物本质上由CD3+T细胞组成。在某些实施方案中,输入组合物是针对富集CD4+T细胞和CD8+T细胞而富集的细胞的组合物。在特定实施方案中,输入组合物是或包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的为CD4+或CD8+T细胞的细胞。在一些实施方案中,输入组合物本质上由CD4+和CD8+T细胞组成。

[0170] 在特定实施方案中,输入组合物含有在为或约30%与为或约70%之间、在为或约35%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约45%与为或约55%之间、或约50%或50%的CD4+T细胞,以及在为或约30%与为或约70%之间、在为或约35%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约45%与为或约55%之间、或约50%或50%的CD8+T细胞。在某些实施方案中,输入组合物含有在为或约45%与为或约55%之间、约50%、或50% CD4+T细胞,以及在为或约45%与为或约55%之间、约50%、或50%的

CD8+T细胞。

[0171] 在一些实施方案中,富集CD4+T细胞的至少一种单独组合物和富集CD8+T细胞的至少一种单独组合物是从单一生物样品(例如,来自同一供体(如患者或健康个体)的PBMC或其他白细胞样品)中分离、选择、富集或获得的。在一些实施方案中,最初从同一生物样品(如获得、收集、和/或获取自单一受试者的单一生物样品)中来源(例如分离、选择和/或富集)富集CD4+T细胞的单独组合物和富集CD8+T细胞的单独组合物。在一些实施方案中,首先使生物样品经历CD4+T细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分,并且进一步使阴性级分经历CD8+T细胞的选择。在其他实施方案中,首先使生物样品经历CD8+T细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分,并且进一步使阴性级分经历CD4+T细胞的选择。在一些实施方案中,如在国际PCT公开号W02015/164675中所述进行选择方法。在一些方面,首先对生物样品阳性选择CD8+T细胞以产生富集CD8+T细胞的至少一种组合物,并且然后对阴性级分阳性选择CD4+T细胞以产生富集CD4+T细胞的至少一种组合物,使得富集CD8+T细胞的至少一种组合物和富集CD4+T细胞的至少一种组合物是来自同一生物样品(例如来自同一供体患者或健康个体)的分开组合物。在一些方面,将富集T细胞的两种或更多种分开的组合物(例如,至少一种是来自同一供体的富集CD4+T细胞的组合物,并且至少一种是富集CD8+T细胞的单独组合物)单独地冷冻(例如低温冷冻或低温保存)在低温保存介质中。在一些方面,单独低温保存的细胞组合物以一次或多次运输方式在单独的容器中储存和/或运输。在一些方面,将单独低温保存的细胞组合物解冻并任选地洗涤。

[0172] 在一些方面,将富集T细胞的两种或更多种分开的组合物(例如,至少一种是来自同一生物样品的富集CD4+T细胞的组合物,并且至少一种是来自同一生物样品的富集CD8+T细胞的单独组合物)解冻并混合、组合和/或合并,并且在混合、组合和/或合并之前或之后可以任选地洗涤所述组合物。在一些方面,富集T细胞的经混合、组合和/或合并和任选地洗涤的组合物形成输入组合物。在一些方面,通过与刺激试剂接触(例如,通过与用于T细胞激活的CD3/CD28缀合的磁珠孵育)来激活和/或刺激输入组合物(例如,包含比率为或约1:1的CD4+T细胞和CD8+T细胞),并且任选地调节(例如减少)来自激活/刺激的细胞组合物的体积,以便实现目标体积。在一些方面,例如使用编码重组蛋白(例如CAR)的逆转录病毒载体对激活/刺激的细胞组合物进行工程化、转导和/或转染,以在细胞组合物的CD4+T细胞和CD8+T细胞中表达相同的重组蛋白。在一些方面,任选地调节(例如减小)来自工程化的细胞组合物的体积,以实现目标体积。在一些方面,所述方法包括从细胞组合物中去除刺激试剂,例如磁珠。在一些方面,培育含有工程化CD4+T细胞和工程化CD8+T细胞的细胞组合物,例如用于其中的CD4+T细胞和/或CD8+T细胞群体的扩增。在某些实施方案中,例如通过在配制缓冲液中洗涤细胞组合物来收获和/或收集和/或配制来自培育的细胞组合物。在某些实施方案中,将包含CD4+T细胞和CD8+T细胞的配制细胞组合物冷冻(例如低温冷冻或低温保存)在低温保存介质中。在一些方面,可以在一个或多个容器中储存和/或运输低温保存的配制品。在一些方面,所述配制品中的工程化CD4+T细胞和CD8+T细胞源自同一供体或生物样品并表达相同的重组蛋白(例如CAR),并且将所述配制品给予至对其有需要的受试者(如同一供体)。

[0173] 在特定实施方案中,输入组合物含有在3:1与1:3之间、在2:1与1:2之间、在1.5与0.75之间、在1.25与0.75之间、或在1.2与0.8之间的比率的CD4+T细胞与CD8+T细胞。在某些

实施方案中,输入组合物含有为或约1:1的比率的CD4+T细胞与CD8+T细胞。

[0174] 在一些实施方案中,将来自富集CD4+T细胞组合物的细胞和来自富集CD8+T细胞组合物的细胞混合、组合和/或合并以产生含有CD4+T细胞和CD8+T细胞的输入组合物。在某些实施方案中,在刺激条件下在孵育细胞之前合并、混合和/或组合富集CD4+T细胞和CD8+T细胞的组合物。在某些实施方案中,在从生物样品中分离、富集和/或选择CD4+和CD8+T细胞之后,合并、混合和/或组合富集CD4+和CD8+T细胞的组合物。在特定实施方案中,在冷冻(例如,低温冷冻)和解冻富集CD4+和CD8+T细胞的组合物之后,合并、混合和/或组合富集CD4+和CD8+T细胞的组合物。

[0175] 在某些实施方案中,通过将来自富集CD4+细胞组合物的细胞与来自富集CD8+细胞组合物的细胞混合、合并和/或组合来生产、产生或制备输入组合物。在某些实施方案中,富集CD4+T细胞的组合物含有至少或至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.9%的CD4+T细胞。在特定实施方案中,富集CD4+T细胞组合物含有100%的CD4+T细胞或含有约100%的CD4+T细胞。在某些实施方案中,富集T细胞的组合物包含或含有小于或小于约20%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、小于或小于约1%、小于或小于约0.1%、或小于或小于约0.01%的CD8+T细胞,和/或不含有CD8+T细胞,和/或不含或基本上不含CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞群本质上由CD4+T细胞组成。在某些实施方案中,富集CD8+T细胞的组合物含有至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、或99.9%的CD8+T细胞,或含有或含有约100%的CD8+T细胞。在某些实施方案中,富集CD8+T细胞的组合物包含或含有小于或小于约20%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、小于或小于约1%、小于或小于约0.1%、或小于或小于约0.01%的CD4+T细胞,和/或不含有CD4+T细胞,和/或不含或基本上不含CD4+T细胞。在一些实施方案中,细胞群本质上由CD8+T细胞组成。

[0176] 在某些实施方案中,以在1:10与10:1之间、在1:5与5:1之间、在4:1与1:4之间、在3:1之间、在1:3与3:1之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.25:1与1:1.25之间、在1.2:1与1:1.2之间、在1.1:1与1:1.1之间、或约1:1或1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞之比合并、混合和/或组合CD4+T细胞和CD8+T细胞。在特定实施方案中,以在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.25:1与1:1.25之间、在1.2:1与1:1.2之间、在1.1:1与1:1.1之间、或约1:1或1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞之比合并、混合和/或组合CD4+T细胞和CD8+T细胞。在一些实施方案中,以为或约1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞之比合并、混合和/或组合CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0177] 在一些实施方案中,以在1:10与10:1之间、在1:5与5:1之间、在4:1与1:4之间、在3:1之间、在1:3与3:1之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.25:1与1:1.25之间、在1.2:1与1:1.2之间、在1.1:1与1:1.1之间、或约1:1或1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞之比合并、混合和/或组合CD4+T细胞和CD8+T细胞。在特定实施方案中,以在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.25:1与1:1.25之间、在1.2:1与1:1.2之间、在1.1:1与1:1.1之间、或约1:1或1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞之比合并、混合和/或组合来自富集CD4+T细胞和CD8+T细胞的组合物的细胞。在一些实施方案中,以为或约1:1的CD4+T细胞与CD8+T细胞之比合并、混合和/或组合来自富集CD4+T细胞和CD8+T细胞的组合物的细胞。

[0178] 在某些实施方案中,输入组合物含有一定比率(例如限定、受控和/或固定比率)的

CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞。在特定实施方案中,CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的比率在10:1至0.05:1之间、在8:1至0.1:1之间、在5:1至0.2:1之间、在2.5:1至0.25:1之间、在2.2:1至0.8:1之间、在2:1至0.5:1之间或在1.5:1至1:1之间,包含端值。在特定实施方案中,CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的比率在2:1至0.8:1之间、在1.6:1至0.8:1之间、在1.4:1至0.8:1之间、在1.2:1至0.8:1之间、或在1.2:1至0.8:1之间,包含端值。在一些实施方案中,所述比率在2.2:1至0.8:1之间,包含端值。在某些实施方案中,CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的比率为或为约2.2:1、2.1:1、2.0:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1或0.8:1。在某些实施方案中,所述比率为或为约1.1:1。

[0179] 在特定实施方案中,输入组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 的量的表达CD4或CD8的细胞。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 的量的幼稚样CD4+和幼稚样CD8+T细胞。

[0180] 在特定实施方案中,输入组合物具有在为或约 1×10^6 个与为或约 1×10^{10} 个之间、在为或约 1×10^7 个与为或约 1×10^9 个之间、在为或约 v 个与为或约 5×10^8 个之间、或在为或约 1×10^8 个与为或约 3×10^8 个之间的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入组合物具有为或约以下的量的表达CD4或CD8的细胞:在为或约 1×10^6 个与为或约 1×10^{10} 个之间、在为或约 1×10^7 个与为或约 1×10^9 个之间、在为或约 v 个与为或约 5×10^8 个之间、或在为或约 1×10^8 个与为或约 3×10^8 个之间。在一些实施方案中,输入组合物具有为或约以下的量的幼稚样CD4+和幼稚样CD8+T细胞:在为或约 1×10^6 与为或约 1×10^{10} 之间、在为或约 1×10^7 与为或约 1×10^9 之间、在为或约 5×10^7 与为或约 5×10^8 之间、或在为或约 1×10^8 与为或约 3×10^8 之间。

[0181] 在一些实施方案中,输入组合物具有或含有至少或至少约1%、至少或至少约5%、至少或至少约10%、至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或100%或约100%的幼稚样细胞。在特定实施方案中,输入组合物含有或包含不超过或不超过约100%、不超过或不超过约99%、不超过或不超过约98%、不超过或不超过约97%、不超过或不超过约96%、不超过或不超过约95%、不超过或不超过约90%、或不超过

或不超过约85%的幼稚样细胞。

[0182] 在特定实施方案中,本文提供的方法包括产生、生成和/或制备输入组合物的一个或多个步骤。在某些实施方案中,生产、产生和/或制备输入组合物包括将CD4+T细胞组合物的细胞与CD8+T细胞组合物的细胞混合或组合的一个或多个步骤。

[0183] 在一些实施方案中,输入组合物的细胞(例如,CD4+T细胞CD8+T细胞)已经从样品(例如,生物样品)分离和/或选择。在某些实施方案中,输入组合物的细胞来源是已经从样品中分离和/或选择的细胞组合物,例如CD4+和CD8+T细胞的组合物。在特定实施方案中,CD4+T细胞组合物和CD8+T细胞组合物是从样品(例如生物样品)中分离和/或选择的。在某些实施方案中,CD4+T细胞的组合物和CD8+T细胞的组合物是从相同样品分离和/或选择的。在某些实施方案中,CD4+T细胞的组合物和CD8+T细胞的组合物是从取自或获得自相同受试者的样品分离和/或选择的。

[0184] 在特定实施方案中,CD4+T细胞组合物含有或包含至少或至少约60%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或100%或约100%的CD4+T细胞。在一些实施方案中,CD4+T细胞组合物含有或包含不超过或不超过约100%、不超过或不超过约99%、不超过或不超过约98%、不超过或不超过约97%、不超过或不超过约96%、不超过或不超过约95%、不超过或不超过约90%、或不超过或不超过约85%的CD4+T细胞。

[0185] 在某些实施方案中,CD8+T细胞组合物含有或包含至少或至少约60%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或100%或约100%的CD8+T细胞。在特定实施方案中,CD8+T细胞组合物含有或包含不超过或不超过约100%、不超过或不超过约99%、不超过或不超过约98%、不超过或不超过约97%、不超过或不超过约96%、不超过或不超过约95%、不超过或不超过约90%、或不超过或不超过约85%的CD8+T细胞。

[0186] 在某些实施方案中,生产、产生和/或制备输入组合物包括例如在组合或混合细胞组合物的细胞之前,测量、确定和/或定量存在于CD4+T细胞组合物和/或CD8+T细胞组合物中的活CD4+T细胞和/或活CD8+T细胞的量、部分、数量、每体积的数量、每重量的数量、和/或百分比的一个或多个步骤。在特定实施方案中,生产、产生和/或制备输入组合物包括测量、确定和/或定量存在于CD4+T细胞组合物和/或CD8+T细胞组合物中的幼稚样CD4+T细胞和/或幼稚样CD8+T细胞的量、部分、数量、每体积的数量、每重量的数量、和/或百分比的一个或多个步骤。在一些实施方案中,幼稚样CD4+和/或幼稚样CD8+T细胞是活的幼稚样细胞。

[0187] 在某些实施方案中,生产、产生和/或制备输入组合物包括测量、确定和/或定量存在于样品(例如生物样品)中的活CD4+T细胞和/或活CD8+T细胞的量、部分、数量、每体积的数量、每重量的数量、和/或百分比的一个或多个步骤。在特定实施方案中,生产、产生和/或制备输入组合物包括测量、确定和/或定量存在于样品中的幼稚样CD4+T细胞和/或幼稚样CD8+T细胞的量、部分、数量、每体积的数量、每重量的数量、和/或百分比的一个或多个步骤。在一些实施方案中,幼稚样CD4+和/或幼稚样CD8+T细胞是活的幼稚样细胞。

[0188] 在一些实施方案中,输入组合物的细胞是从样品(例如,生物样品)分离和/或选择

的。在特定实施方案中,样品中幼稚样细胞的份额(例如,幼稚样CD4+和CD8+T细胞的份额)是已知的或者已经被确定、测量或评估。在一些实施方案中,分离和/或选择来自样品的细胞以直接生产具有限定、固定或受控比率的幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的细胞组合物,例如输入组合物。在某些实施方案中,用免疫亲和珠选择来分离和/或选择细胞。在一些实施方案中,用亲和柱分离和/或选择细胞。在特定实施方案中,根据W0 2015/164675中所述的任何方法对来自样品的细胞进行分离或选择,以产生具有限定比率、受控比率和/或固定比率的幼稚样CD4+细胞与幼稚样CD8+细胞的细胞组合物。

[0189] 在某些实施方案中,输入组合物含有通过第一和第二分离或选择从样品中直接分离和/或选择的细胞。在某些实施方案中,输入组合物是通过以下方式产生:进行第一和第二选择,以分离一定量、数量或浓度的CD4+T细胞和CD8+T细胞,所述量、数量或浓度的CD4+T细胞和CD8+T细胞足以产生限定比率、固定比率和/或受控比率的幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞。

[0190] 在一些实施方案中,直接分离、选择和/或富集来自样品的细胞以产生富集CD4+细胞和CD8+细胞的输入组合物。在一些实施方案中,已经测量、评估和/或确定了在样品中幼稚样CD4+和幼稚样CD8+细胞的量、数量、百分比、每体积的数量和/或每重量的数量,并且分离、选择和/或富集足以实现具有限定、固定或受控比率的幼稚样CD4+与幼稚样CD8+T细胞的输入组合物的量的CD4+和CD8+细胞。在一些实施方案中,从样品直接分离、选择和/或富集的细胞是输入组合物并且用于后续处理步骤中,如涉及所富集细胞的孵育、刺激、激活、工程化和/或配制的后续处理步骤。

[0191] 在一些实施方案中,来自样品(如输入组合物)的所分离、选择和/或富集的细胞含有在限定、固定或受控比率的幼稚样CD4+细胞与幼稚样CD8+细胞下的CD4+细胞与CD8+细胞的比率。在特定实施方案中,产生、生成和/或制备输入组合物包括以下一个或多个步骤:对CD4+T细胞的组合物和/或CD8+T细胞的组合物中存在的幼稚样CD4+T细胞和/或幼稚样CD8+T细胞的量、份额、数量、每体积的数量、每重量的数量和/或百分比进行测量、确定和/或定量。

[0192] 在一些实施方案中,在从样品进行第一和/或第二选择之前,确定样品(例如,生物样品)中CD4+与CD8+T细胞的比率。在某些实施方案中,在进行第一和/或第二选择之前,确定样品中幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的比率。基于样品中CD4+与CD8+T细胞的特定比率和/或幼稚样CD4+与CD8+T细胞的特定比率(它们可以在样品之间变化),可以针对样品将特定选择方式个性化,例如通过将色谱柱定尺寸或选择免疫亲和试剂的量或浓度,以实现所需比率、固定比率或受控比率。受试者中各种细胞群的相对水平或频率可以基于评估此类群体或亚群上存在的一种或多种标记的表面表达来确定。可以使用用于评估表面标记或蛋白的表达水平的多种熟知方法,如通过基于亲和力的方法例如基于免疫亲和力的方法进行的检测,例如在细胞表面蛋白的情况下,如通过流式细胞术检测。

[0193] 在一些情境下,幼稚样CD4+与CD8+T细胞的适当比率可以根据例如以下情况而变化:衍生细胞的受试者的特定疾病、状况或先前治疗,和/或细胞的特定抗原特异性、各种亚群(例如,效应细胞与记忆细胞与幼稚细胞)的特定类型细胞(例如,CD4+细胞)之间的相对表示,和/或将用于孵育细胞的一种或多种条件,如培养基、刺激剂、培养时间、缓冲液、氧含量、二氧化碳含量、抗原、细胞因子、抗体和其他组分。因此,通常或一般已知比另一种细胞

类型更快地增殖或扩增的细胞类型可能将不会在每种情况下总是具有这种特性。因此,在一些方面,幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的比率是基于细胞类型在正常或典型情况下的已知能力,结合对细胞或衍生细胞的受试者的表型或状态的评估,和/或经验证据来确定。

[0194] 在一些实施方案中,分离和/或步骤是使用免疫磁珠进行的。在一些实施方案中,使含有CD4+和CD8+细胞的细胞样品与含有结合至CD4或CD8的第一免疫亲和试剂的磁珠和含有结合至CD4或CD8中另一种的第二免疫亲和试剂的磁珠接触。分离和/或步骤可以同时和/或依次进行。

[0195] 在一些实施方案中,第一和/或第二免疫亲和试剂以次最佳产率浓度存在于孵育组合物中,借此所富集组合物含有孵育组合物中少于全部(例如,70%)的总CD4+细胞和/或孵育组合物中少于全部(例如,70%)的CD8+细胞,从而产生富集CD4+和CD8+T细胞的组合物。

[0196] 在一些实施方案中,亲和试剂的次最佳产率浓度是低于在给定选择或富集中实现所结合细胞的最佳或最大产率所使用或需要的浓度的浓度,所述选择或富集涉及将细胞与所述试剂一起孵育以及回收或分离已经与所述试剂结合的细胞(例如,“产率”是与孵育中被所述试剂靶向、或者所述试剂对其具有特异性、或者具有标记(所述试剂对所述标记具有特异性并且能够结合所述标记)的细胞的总数相比,如此回收或选择的细胞的数量)。次最佳产率浓度通常是在这个过程或步骤中,在回收已经结合至所述试剂的细胞后,实现所结合细胞(例如,CD4+和/或CD8+T细胞)的少于全部(例如,不超过70%)产率的试剂的浓度或量。在一些实施方案中,不超过或不超过约50%、45%、40%、30%或25%产率是通过亲和试剂的次最佳浓度来实现。所述浓度可以用每个细胞的颗粒或表面的数量或质量和/或每个细胞的药剂(例如,抗体,如抗体片段)的质量数或分子数来表示。在特定实施方案中,次最佳产率浓度足以驱动或实现幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的固定比率、受控比率和/或限定比率。

[0197] 在一些实施方案中,例如,当以具有对CD4+和/或CD8+T细胞的亲和力的两种或更多种选择试剂中的每一种或者一或多种的次最佳产率浓度操作时,此类试剂中的一种或多种是以高于其他此类试剂中的一种或多种的浓度来使用,以如与其他一种或多种试剂所识别的一种或多种细胞类型相比,偏向由该试剂所识别的细胞类型的比率。例如,根据期望以多大程度增加所述比率,与其他一种或多种试剂相比,与期望针对其偏向所述比率的标记特异性结合的试剂可以以增加一半、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多的浓度(例如,每个细胞的药剂或质量)被包括。

[0198] 在一些实施方案中,当在次最佳范围内和/或用足以实现试剂饱和的细胞操作时,免疫亲和试剂的量与所富集细胞的近似产率成比例。在某些实施方案中,可以按常规方式确定免疫亲和试剂的合适的量或浓度,其取决于所产生的含有富集或选择的CD4+和CD8+T细胞的组合物的所需比率。

[0199] 在一些实施方案中,使用磁珠进行分开和/或分离步骤,在所述磁珠中免疫亲和试剂如通过与链霉亲和素突变蛋白的肽配体相互作用被可逆地结合,如WO 2015/164675中所述。此类磁珠的示例是Streptamers®。在一些实施方案中,分离和/或步骤是使用磁珠来进行,如可从Miltenyi Biotec商业购得的那些磁珠。

[0200] 在一些实施方案中,对来自样品的CD4⁺和CD8⁺细胞的第一选择或富集是使用基于免疫亲和力的试剂来进行,所述试剂至少分别包括第一和第二亲和色谱基质,所述基质上固定有抗体。在一些实施方案中,第一和/或第二选择中的一个或两个可以采用多种亲和色谱基质和/或抗体,借此将用于相同选择(即第一选择或第二选择)的所述多种基质和/或抗体串联连接。在一些实施方案中,第一和/或第二选择中采用的一种或多种亲和色谱基质吸附或者能够选择或富集至少或至少约 50×10^6 个细胞/mL、 100×10^6 个细胞/mL、 200×10^6 个细胞/mL或 400×10^6 个细胞/mL。在一些实施方案中,可以基于柱的直径和/或长度来调节吸附能力。在一些实施方案中,所选择或富集的组合物的培养启动比率是通过假定基于例如用于选择细胞的一个或多个柱的吸附能力,选择基质的足以实现所述培养启动比率的量和/或以足以实现所述培养启动比率的相对量来实现。

[0201] 在一个示例性实施方案中,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞具有相等或类似的幼稚样细胞的份额,并且在第一选择与第二选择之间,一种或多种基质的吸附能力是相同的,例如对于二者为或为约 1×10^8 个细胞/mL,借此在第一选择和第二选择中对细胞的富集或选择产生含有CD4⁺细胞和CD8⁺细胞的组合物,所述组合物具有为或为约1:1的幼稚样CD4⁺与CD8⁺T细胞比率。在特定实施方案中,可以按常规方式选择或确定用于第一和/或第二选择的亲和基质色谱柱的合适的体积、直径或数量,其取决于幼稚样细胞的份额并且取决于所产生的输入组合物的所需比率。

[0202] 在一些实施方案中,调节一种或多种柱基质的吸附能力,以补偿与来自受试者的起始样品中相应CD4⁺或CD8⁺亲本群体的细胞的频率相比,幼稚样细胞(例如,幼稚样CD4⁺或CD8⁺细胞)的频率差异。受试者中各种细胞群的相对水平或频率可以基于评估此类群体或亚群上存在的一种或多种标记的表面表达来确定。可以使用用于评估表面标记或蛋白的表达水平的多种熟知方法,如通过基于亲和力的方法例如基于免疫亲和力的方法进行的检测,例如在细胞表面蛋白的情况下,如通过流式细胞术检测。

[0203] 在一些实施方案中,在细胞组合物(例如,CD4⁺和/或CD8⁺T细胞组合物)中或在样品(例如,生物样品)中评估、测量和/或检测幼稚样细胞(例如,幼稚样CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)。在一些实施方案中,幼稚样T细胞是对于一种或多种标记的表达呈阳性的T细胞,所述标记指示细胞是幼稚细胞和/或是幼稚样细胞。在某些实施方案中,幼稚样T细胞是对于标记的表达呈阳性的细胞,所述标记与T细胞中的幼稚状态或幼稚样状态相关。在特定实施方案中,幼稚样T细胞是对于一种或多种标记的表达呈阴性的T细胞,所述标记指示细胞不是幼稚细胞和/或不是幼稚样细胞。在某些实施方案中,幼稚样T细胞是对于标记的表达呈阴性的细胞,所述标记与T细胞中的非幼稚状态或非幼稚样状态相关。在某些实施方案中,T细胞中的非幼稚状态或非幼稚样状态包括例如但不限于效应T(T_{EFF})细胞、记忆T细胞、中枢记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T(T_{EM})细胞及其组合。

[0204] 在一些实施方案中,幼稚样T细胞对于至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或大于十种标记的表达呈阳性,所述标记指示细胞是幼稚细胞和/或是幼稚样细胞,和/或所述标记与T细胞中的幼稚状态或幼稚样状态相关。在一些实施方案中,所述标记是在细胞表面上表达。在某些实施方案中,幼稚样T细胞对于至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或大于十种标记的表达呈阴性,所述标记指示细胞是非幼稚细胞和/或是非幼稚样细胞,和/或所述标记与T细胞中的非幼稚状态或非幼

稚样状态相关。

[0205] 指示T细胞是幼稚细胞和/或是幼稚样T细胞、和/或与T细胞中幼稚状态或幼稚样状态相关的标记包括但不限于CD27、CD28、CD45RA、CD62L和/或CCR7。在一些实施方案中,幼稚样T细胞(例如,幼稚样CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)对于CD27、CD28、CD45RA、CD62L和/或CCR7的表达呈阳性。在某些实施方案中,幼稚样T细胞对CD27、CD28、CD45RA、CD62L和/或CCR7中的一种或多种的表面表达呈阳性。

[0206] 指示细胞是非幼稚细胞和/或是非幼稚样T细胞、和/或与T细胞中的非幼稚状态或非幼稚样状态相关的标记包括但不限于CD25、CD45RO、CD56、KLRG1和/或CD95。在一些实施方案中,幼稚样T细胞(例如,幼稚样CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)对于CD25、CD45RO、CD56和/或KLRG1的表达呈阴性。在特定实施方案中,幼稚样T细胞(例如,幼稚样CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)具有与非幼稚细胞或非幼稚样细胞相关的标记的低表达。在特定实施方案中,幼稚样T细胞具有CD95的低表达。在某些实施方案中,幼稚样T细胞对于CD25、CD45RO、CD56和/或KLRG1中的一种或多种的表面表达呈阴性。

[0207] 在一些实施方案中,与非幼稚细胞或非幼稚样细胞相关的标记的低表达是或包括比所述标记在如下细胞中的表达少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的表达:所述细胞是非幼稚样细胞和/或对于一种或多种标记呈阳性的细胞,所述标记指示细胞是非幼稚T细胞和/或是非幼稚样T细胞,和/或所述标记与T细胞中的非幼稚状态或非幼稚样状态相关。在某些实施方案中,与非幼稚细胞或非幼稚样细胞相关的标记的低表达是或包括比所述标记在效应T(T_{EFF})细胞、记忆T细胞、中枢记忆T细胞(T_{CM})和/或效应记忆T(T_{EM})细胞中的表达少至少或至少约10%、至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或至少或至少约99%的表达。

[0208] 在一些实施方案中,指示细胞是非幼稚T细胞和/或是非幼稚样T细胞、和/或与T细胞中的非幼稚状态或非幼稚样状态相关的标记包括一种或多种细胞因子。例如,在某些实施方案中,非幼稚T细胞或非幼稚样T细胞对于IL-2、IFN- γ 、IL-4和IL-10中的一种或多种的表达和/或产生呈阴性。在一些实施方案中,分泌所述一种或多种细胞因子。在特定实施方案中,例如,在用防止、抑制或减少分泌的药剂处理期间或之后,非幼稚样T细胞在内部表达所述一种或多种细胞因子。

[0209] 在某些实施方案中,幼稚样T细胞对于CD45RA和CCR7的表达(例如,表面表达)呈阳性。在特定实施方案中,幼稚样CD4⁺T细胞对于CD45RA和CCR7的表达(例如,表面表达)呈阳性。在一些实施方案中,幼稚样CD8⁺T细胞对于CD45RA和CCR7的表达(例如,表面表达)呈阳性。在特定实施方案中,幼稚样T细胞对于CD45RA、CD27和CCR7的表达(例如,表面表达)呈阳性,并且对于CD45RO的表达(例如,表面表达)呈阴性。在特定实施方案中,幼稚样CD4⁺T细胞对于CD45RA、CD27和CCR7的表达(例如,表面表达)呈阳性,并且对于CD45RO的表达(例如,表面表达)呈阴性。在一些实施方案中,幼稚样CD8⁺T细胞对于CD45RA、CD27和CCR7的表达(例如,表面表达)呈阳性,并且对于CD45RO的表达(例如,表面表达)呈阴性。

[0210] 在某些实施方案中,CD4⁺和/或CD8⁺T细胞是活细胞。在某些实施方案中,CD4⁺和/或CD8⁺T细胞是活的幼稚样细胞。所述活细胞对于标记的表达呈阳性,所述标记指示,细胞

经历正常功能细胞过程,和/或尚未经历坏死或程序性细胞死亡,或者不在经历坏死或程序性细胞死亡的过程中。在一些实施方案中,可以通过细胞的氧化还原电位、细胞膜的完整性或线粒体的活性或功能来评估活力。在一些实施方案中,活力是在测定中不存在与细胞死亡相关的特定分子,或不存在细胞死亡的指示。

[0211] 在某些实施方案中,通过测定评估细胞活力,所述测定可以包括但不限于染料摄取测定(例如,钙黄绿素AM测定)、XTT细胞活力测定和染料排除测定(例如,锥虫蓝、伊红或丙啶染料排除测定)。在特定实施方案中,活细胞具有一种或多种细胞凋亡标记(例如,膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)的阴性表达。在一些实施方案中,活细胞对于一种或多种细胞凋亡标记的表达呈阴性,所述细胞凋亡标记可以包括但不限于半胱天冬酶(例如,半胱天冬酶2、半胱天冬酶3、半胱天冬酶6、半胱天冬酶7、半胱天冬酶8、半胱天冬酶9和半胱天冬酶10)、Bcl-2家族成员(例如,Bax、Bad和Bid)、膜联蛋白V和/或TUNEL染色。

[0212] 在一些实施方案中,表达是或包括标记的量、水平、浓度和/或存在。在特定实施方案中,标记是多肽。在一些实施方案中,标记是mRNA。在一些实施方案中,表达是或包括多肽(例如,标记多肽)的量、水平、浓度和/或存在。在某些实施方案中,编码标记的多核苷酸(例如,mRNA或从mRNA衍生的cDNA)的量、水平、浓度和/或存在。在某些实施方案中,表达是或包括位于细胞表面上或在细胞表面上暴露或位于细胞膜内的标记的量、水平、浓度和/或存在。在某些实施方案中,表达是或包括位于细胞表面上或在细胞表面上暴露或位于细胞膜内的标记的量、水平、浓度和/或存在。在特定实施方案中,表达是或包括内部表达,例如,在细胞内部中,如在胞质溶胶、细胞核、内质网和/或高尔基体内的标记的量、水平、浓度和/或存在。

[0213] 在一些实施方案中,通过进行体外测定对标记进行测量、评估和/或定量。在一些例子中,体外测定是免疫测定、基于适体的测定、组织学或细胞学测定或mRNA表达水平测定。在一些情况下,所用的体外测定可以是酶-联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹、免疫沉淀、放射免疫测定(RIA)、免疫染色、流式细胞术测定、表面等离子体共振(SPR)、化学发光测定、侧流免疫测定、抑制测定或亲和力测定。在一些实施方案中,通过RNA-seq对标记的表达进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,通过免疫染色技术对标记的表达进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,通过流式细胞术分析对标记的表达进行测量、评估和/或定量。在一些实施方案中,通过内部细胞因子染色对标记的表达进行测量、评估和/或定量。

[0214] 在一些实施方案中,在CD4+T细胞组合物的细胞中对标记进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,至少或至少约1%、至少或至少约5%、至少或至少约10%、至少或至少约15%、至少或至少约20%、至少或至少约25%、至少或至少约30%、至少或至少约35%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约95%,至少或至少约97%、或至少或至少约99%的CD4+T细胞是幼稚样CD4+T细胞。在某些实施方案中,在为或约10%与为或约50%之间、在为或约20%与为或约60%之间、在为或约25%与为或约75%之间、在为或约30%与为或约80%之间、在为或约40%与为或约90%之间、在为或约50%与为或约100%之间、在为或约30%与为或约50%之间、在为或约40%与为或约60%之

间、在为或约50%与为或约70%之间、在为或约60%与为或约80%之间、在为或约70%与为或约90%之间、在为或约80%与为或约100%之间、在为或约5%与为或约25%之间、在为或约25%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约75%之间、或在为或约75%与为或约99%之间的CD4+T细胞是幼稚样CD4+T细胞。在某些实施方案中,幼稚样CD4+T细胞是活的幼稚样CD4+T细胞。

[0215] 在某些实施方案中,在CD8+T细胞组合物的细胞中对标记进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,至少或至少约1%、至少或至少约5%、至少或至少约10%、至少或至少约15%、至少或至少约20%、至少或至少约25%、至少或至少约30%、至少或至少约35%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约95%,至少或至少约97%、或至少或至少约99%的CD8+T细胞是幼稚样CD8+T细胞。在某些实施方案中,在为或约10%与为或约50%之间、在为或约20%与为或约60%之间、在为或约25%与为或约75%之间、在为或约30%与为或约80%之间、在为或约40%与为或约90%之间、在为或约50%与为或约100%之间、在为或约30%与为或约50%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约50%与为或约70%之间、在为或约60%与为或约80%之间、在为或约70%与为或约90%之间、在为或约80%与为或约100%之间、在为或约5%与为或约25%之间、在为或约25%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约75%之间、或在为或约75%与为或约99%之间的CD8+T细胞是幼稚样CD4+T细胞。在某些实施方案中,幼稚样CD8+T细胞是活的幼稚样CD8+T细胞。

[0216] 在一些实施方案中,将来自CD4+T细胞的组合物的细胞与来自CD8+T细胞的组合物的细胞以足以产生输入组合物的量和/或比例混合或组合,所述输入组合物具有以下的CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的比率:在10:1至0.05:1之间、在8:1至0.1:1之间、在5:1至0.2:1之间、在2.5:1至0.25:1之间、在2.2:1至0.8:1之间、在2:1至0.5:1之间或在1.5:1至1:1之间,包含端值。在一些实施方案中,以足以使CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的比率在2.2:1至0.8:1之间(包含端值)的量和/或比例混合细胞。在某些实施方案中,将细胞混合或组合至CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的比率为或为约2.2:1、2.1:1、2.0:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1或0.8:1。在某些实施方案中,将细胞混合或组合至比率为或为约1.1:1。

[0217] 在一些实施方案中,将为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5.5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的输入组合物。在某些实施方案中,将在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、

在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的输入组合物。

[0218] 在一些实施方案中,将为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 、or 1×10^9 的量的幼稚样CD4+T细胞与为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5.5×10^8 、or 1×10^9 的量幼稚样CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的输入组合物。在某些实施方案中,将在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的幼稚样CD4+T细胞与为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的幼稚样CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD4+幼稚样T细胞与CD8+幼稚样T细胞的输入组合物。

[0219] 在特定实施方案中,与样品(例如生物样品)的幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的比率相比,输入组合物的幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的比率已经被调节、更改和/或改变。在特定实施方案中,幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的比率与生物样品相比的调整、变化或改变为或为约或为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍。在某些实施方案中,样品是从其中来源、分离、选择和/或获得输入组合物的细胞的样品。

[0220] 在一些实施方案中,生产、产生和/或制备输入组合物包括将CD4+T细胞组合物的细胞与CD8+T细胞组合物的细胞混合或组合以产生在2.2:1至0.8:1之间的比率的幼稚样CD4+T细胞与幼稚样CD8+T细胞的输入组合物中的一个或多个步骤。在特定实施方案中,在混合或组合之前,在CD4+T细胞组合物和CD8+T细胞组合物中对幼稚样细胞的数量、每体积的数量、每重量的数量和/或量、水平或百分比进行测量、评估和/或定量。在一些实施方案中,通过检测CD45RA+;CCR7+T细胞对幼稚样细胞的量、水平、数量、每体积的数量、每重量的数量和/或百分比进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,输入组合物具有比率在2.2:1至0.8:1之间的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞。在一些实施方案中,输入组合物具有比率为或为约1.1:1的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞。

[0221] 在某些实施方案中,输入细胞组合物含有一定比率(例如限定比率、受控比率和/或固定比率)的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞。在特定实施方案中,CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的比率在10:1至0.05:1之间、在8:1至0.1:1之间、在5:1至0.2:1之间、在2.5:1至0.25:1之间、在2.2:1至0.8:1之间、2:1至0.5:1之间、或在1.5:1至1:1之间,包含端值。在特定实施方案中,CD45RA+/CCR7+/CD4+T

细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的比率在2:1至0.8:1之间、在1.6:1至0.8:1之间、在1.4:1至0.8:1之间、在1.2:1至0.8:1之间、或在1.2:1至0.8:1之间,包含端值。在一些实施方案中,所述比率在2.2:1至0.8:1之间,包含端值。在某些实施方案中,CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的比率为或为约2.2:1、2.1:1、2.0:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1或0.8:1。在某些实施方案中,所述比率为或为约1.1:1。

[0222] 在特定实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 、或 1×10^9 个的量的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 、或 1×10^9 个的量的表达CD4或CD8的细胞。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 、或 1×10^9 个的量的CD45RA+/CCR7+/CD4+和CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞。

[0223] 在特定实施方案中,输入细胞组合物具有在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的表达CD4或CD8的细胞。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的CD45RA+/CCR7+/CD4+和CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞。

[0224] 在一些实施方案中,输入细胞组合物具有或含有至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%、或100%或约100%的CD45RA+/CCR7+细胞。在特定实施方案中,输入细胞组合物含有或包括不超过100%、不超过99%、不超过98%、不超过97%、不超过96%、不超过95%、不超过90%或不超过85%的CD45RA+/CCR7+细胞。

[0225] 在一些实施方案中,将为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、

2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5.5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的输入细胞组合物。在某些实施方案中,将在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的输入细胞组合物。

[0226] 在特定实施方案中,与样品(例如,生物样品)的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的比率相比,输入细胞组合物的CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的比率已经被调整、变化和/或改变。在特定实施方案中,CD45RA+/CCR7+/CD4+T细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+T细胞的比率与生物样品相比的调整、变化或改变为或为约或为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍。在某些实施方案中,样品是从其中衍生、分离、选择和/或获得输入细胞组合物的细胞的样品。

[0227] 在某些实施方案中,输入细胞组合物含有一定比率(例如限定比率、受控比率和/或固定比率)的CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞。在特定实施方案中,CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率为在10:1至0.05:1之间、在8:1至0.1:1之间、在5:1至0.2:1之间、在2.5:1至0.25:1之间、在2.2:1至0.8:1之间、在2:1至0.5:1之间、或在2:1至1:1之间,包含端值。在特定实施方案中,CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率为在2:1至0.8:1之间、在1.8:1至1:1之间、在1.8:1至1.2:1之间、在1.2:1至1.4:1之间、或在1.8:1至1.6:1之间,包含端值。在一些实施方案中,所述比率在1.8:1至1.6:1之间,包含端值。在某些实施方案中,CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率为或为约2.2:1、2.1:1、2.0:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.69:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1或1.3:1。在某些实施方案中,所述比率为或为约1.69:1。

[0228] 在特定实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的表达CD4或CD8的细胞。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的CD27+/CCR7+/CD4+和CD27+/CCR7+/CD8+T细胞。

[0229] 在特定实施方案中,输入细胞组合物具有在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的表达CD4或CD8的细胞。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的CD27+/CCR7+/CD4+和CD27+/CCR7+/CD8+T细胞。

[0230] 在一些实施方案中,输入细胞组合物具有或含有至少或至少约1%、至少或至少约5%、至少或至少约10%、至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或100%或约100%的CD27+/CCR7+细胞。在特定实施方案中,输入细胞组合物含有或包含不超过或不超过约100%、不超过或不超过约99%、不超过或不超过约98%、不超过或不超过约97%、不超过或不超过约96%、不超过或不超过约95%、不超过或不超过约90%、或不超过约或不超过约85%的CD27+/CCR7+细胞。

[0231] 在一些实施方案中,将为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5.5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的输入细胞组合物。在某些实施方案中,将在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的输入细胞组合物。

[0232] 在特定实施方案中,与样品(例如,生物样品)的CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率相比,输入细胞组合物的CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率已经被调整、变化和/或改变。在特定实施方案中,CD27+/CCR7+/CD4+T细胞与CD27+/CCR7+/CD8+T细胞的比率与生物样品相比的调整、变化或改变为或为约或为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍。在某些实施方案中,样品是从其中衍生、分离、选择和/或获得输入细胞组合物的细胞的样品。

[0233] 在某些实施方案中,输入细胞组合物含有一定比率(例如限定比率、受控比率和/

或固定比率)的CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞。在特定实施方案中,CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞的比率为在10:1至0.05:1之间、在8:1至0.1:1之间、在5:1至0.2:1之间、在2.5:1至0.25:1之间、在2.2:1至0.8:1之间、在2:1至0.5:1之间、或在1.5:1至1:1之间,包含端值。在特定实施方案中,CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞的比率为在2:1至0.8:1之间、在1.6:1至0.8:1之间、在1.4:1至0.8:1之间、在1.2:1至0.8:1之间、或在1.2:1至0.8:1之间,包含端值。在一些实施方案中,所述比率在2.2:1至0.8:1之间,包含端值。在某些实施方案中,CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞的比率为或为约2.2:1、2.1:1、2.0:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1.0:1、0.9:1或0.8:1。在某些实施方案中,所述比率为或为约1.1:1。

[0234] 在特定实施方案中,输入细胞组合物具有在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总细胞或总活细胞。在某些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的表达CD4或CD8的细胞。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间、或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的CD62L-/CCR7+/CD4+和CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞。

[0235] 在一些实施方案中,输入细胞组合物具有或含有至少或至少约1%、至少或至少约5%、至少或至少约10%、至少或至少约20%、至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或100%或约100%的CD62L-/CCR7+细胞。在特定实施方案中,输入细胞组合物含有或包含不超过或不超过约100%、不超过或不超过约99%、不超过或不超过约98%、不超过或不超过约97%、不超过或不超过约96%、不超过或不超过约95%、不超过或不超过约90%、或不超过约或不超过约85%的CD62L-/CCR7+细胞。

[0236] 在一些实施方案中,将为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1.0×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2.0×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3.0×10^8 、 3.5×10^8 、 4.0×10^8 、 4.5×10^8 、 5×10^8 、 5.5×10^8 或 1×10^9 个的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞混合或组合,以产生具有限定比率的CD62L-/CCR7+/CD4+T细胞与CD62L-/CCR7+/CD8+T细胞的输入细胞组合物。在某些实施方案中,将在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的总CD4+T细胞或总活CD4+T细胞与为或约在 1×10^6 个与 1×10^{10} 个之间、在 1×10^7 个与 1×10^9 个之间、在 5×10^7 个与 5×10^8 个之间或在 1×10^8 个与 3×10^8 个之间的量的总CD8+T细胞或总活CD8+T细胞

混合或组合,以产生具有限定比率的CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的输入细胞组合物。

[0237] 在特定实施方案中,与样品(例如,生物样品)的CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率相比,输入细胞组合物的CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率已经被调整、变化和/或改变。在特定实施方案中,CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率与生物样品相比的调整、变化或改变为或为约或为至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍。在某些实施方案中,样品是从其中衍生、分离、选择和/或获得输入细胞组合物的细胞的样品。

[0238] 在一些实施方案中,产生、生成和/或制备输入细胞组合物包括以下一个或多个步骤:混合或组合CD4⁺T细胞组合物的细胞与CD8⁺T细胞组合物的细胞,以产生具有在2.2:1至0.8:1之间的CD45RA⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD45RA⁺/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率的输入细胞组合物。在特定实施方案中,在混合或组合之前,在CD4⁺T细胞组合物和CD8⁺T细胞组合物中对CD45RA⁺/CCR7⁺细胞的数量、每体积的数量、每重量的数量和/或量、水平或百分比进行测量、评估和/或定量。在一些实施方案中,通过检测CD45RA⁺;CCR7⁺T细胞对CD45RA⁺/CCR7⁺细胞的量、水平、数量、每体积的数量、每重量的数量和/或百分比进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,输入细胞组合物具有在2.2:1至0.8:1之间的CD45RA⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD45RA⁺/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或为约1.1:1的CD45RA⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD45RA⁺/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率。

[0239] 在一些实施方案中,产生、生成和/或制备输入细胞组合物包括以下一个或多个步骤:混合或组合CD4⁺T细胞组合物的细胞与CD8⁺T细胞组合物的细胞,以产生具有在2.4:1至1:1之间的CD27⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD27⁺/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率的输入细胞组合物。在特定实施方案中,在混合或组合之前,在CD4⁺T细胞组合物和CD8⁺T细胞组合物中对CD27⁺/CCR7⁺细胞的数量、每体积的数量、每重量的数量和/或量、水平或百分比进行测量、评估和/或定量。在一些实施方案中,通过检测CD45RA⁺;CCR7⁺T细胞对CD27⁺/CCR7⁺细胞的量、水平、数量、每体积的数量、每重量的数量和/或百分比进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,输入细胞组合物具有在2.4:1至1:1之间的CD27⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD27⁺/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或为约1.69:1的CD27⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD27⁺/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率。

[0240] 在一些实施方案中,产生、生成和/或制备输入细胞组合物包括以下一个或多个步骤:混合或组合CD4⁺T细胞组合物的细胞与CD8⁺T细胞组合物的细胞,以产生具有在2.2:1至0.8:1之间的CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率的输入细胞组合物。在特定实施方案中,在混合或组合之前,在CD4⁺T细胞组合物和CD8⁺T细胞组合物中对CD62L⁻/CCR7⁺细胞的数量、每体积的数量、每重量的数量和/或量、水平或百分比进行测量、评估和/或定量。在一些实施方案中,通过检测CD62L⁻/CCR7⁺T细胞对CD62L⁻/CCR7⁺细胞的量、水平、数量、每体积的数量、每重量的数量和/或百分比进行测量、评估和/或定量。在特定实施方案中,输入细胞组合物具有在2.2:1至0.8:1之间的CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率。在一些实施方案中,输入细胞组合物具有为或为约1.1:1的CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺T细胞的比率。

[0241] B. 激活和刺激

[0242] 在一些实施方案中,将所提供的方法与在刺激条件下孵育细胞结合使用。在一些实施方案中,刺激条件包括激活或刺激和/或能够激活或刺激细胞(例如,CD4+T细胞)中的信号(例如从TCR和/或共受体产生的信号)的条件。在一些实施方案中,刺激条件包括以下中的一个或多个步骤:与刺激试剂一起和/或在刺激试剂的存在下培养、培育、孵育、激活、繁殖细胞,所述刺激试剂例如为激活或刺激和/或能够激活或刺激细胞中的信号的试剂。在一些实施方案中,刺激试剂刺激和/或激活TCR和/或共受体。在特定实施方案中,刺激试剂是本文提供的试剂,例如,如在章节I-B-1中所述。

[0243] 在某些实施方案中,在例如通过本文提供的方法或技术,例如在章节I-C中所述的方法或技术将细胞基因工程化(例如转染和/或转导细胞)之前在刺激条件下孵育一种或多种富集T细胞的组合物。在特定实施方案中,在刺激条件下孵育的富集T细胞的组合物是输入组合物。在某些实施方案中,输入组合物的细胞先前已从生物样品中分离、选择、富集或获得。在特定实施方案中,来自输入组合物的细胞先前已经被低温冷冻并储存,并在孵育之前解冻。

[0244] 在一些实施方案中,将所提供的方法与一个或多个处理步骤结合使用,所述一个或多个处理步骤包括刺激细胞(例如来自输入组合物的细胞)的步骤。在某些实施方案中,孵育可以是在基因工程化之前或与其结合,所述基因工程化例如是由本文所述的转导的实施方案(例如,章节I-C节中所述的方法)引起的基因工程化。在一些实施方案中,刺激导致细胞的激活和/或增殖,例如,在工程化(例如转导)之前。

[0245] 在一些实施方案中,处理步骤包括细胞(例如输入细胞和/或输入组合物的细胞)的孵育,其中所述孵育步骤可以包括细胞的培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育组合物或细胞。此类条件包括针对以下而设计的那些条件:诱导群体中的细胞的增殖、扩增、激活和/或存活,模拟抗原暴露,和/或引发细胞用于基因工程化(如用于引入重组抗原受体)。

[0246] 在某些实施方案中,例如在刺激条件下例如在刺激试剂的存在下,以小于或小于约 5×10^7 个细胞/mL、 4×10^7 个细胞/mL、 3×10^7 个细胞/mL、 2×10^7 个细胞/mL、 1×10^7 个细胞/mL、 9×10^6 个细胞/mL、 8×10^6 个细胞/mL、 7×10^6 个细胞/mL、 6×10^6 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/mL、 4×10^6 个细胞/mL、或 3×10^6 个细胞/mL的密度孵育细胞(例如输入组合物的细胞)。在特定实施方案中,以小于 5×10^6 个细胞/mL的密度孵育细胞。在一些实施方案中,以在 1×10^3 个细胞/mL与 1×10^9 个细胞/mL之间、 1×10^4 个细胞/mL与 1×10^8 个细胞/mL之间、 1×10^5 个细胞/mL与 1×10^7 个细胞/mL之间、 5×10^5 个细胞/mL与 1×10^7 个细胞/mL之间、 1×10^6 个细胞/mL与 5×10^6 个细胞/mL之间、或 3×10^6 个细胞/mL与 5×10^6 个细胞/mL之间的密度孵育细胞。在特定实施方案中,以为或约 1×10^6 个细胞/mL、 1.5×10^6 个细胞/mL、 2×10^6 个细胞/mL、 2.5×10^6 个细胞/mL、 3×10^6 个细胞/mL、 3.5×10^6 个细胞/mL、 4×10^6 个细胞/mL、 4.5×10^6 个细胞/mL、或 5×10^6 个细胞/mL的密度孵育细胞。在特定实施方案中,以为或约 3×10^6 个细胞/mL的密度孵育细胞。在一些实施方案中,细胞是存活细胞。在某些实施方案中,细胞呈凋亡标记(例如膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)阴性。在特定实施方案中,细胞是或包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0247] 在特定实施方案中,活力的指标包括但不限于细胞复制、线粒体功能、能量平衡、

膜完整性和细胞死亡率的指标。在某些实施方案中,活力的指标还包括氧化应激、代谢激活、代谢稳定性、酶诱导、酶抑制以及与细胞膜转运蛋白的相互作用的指标。在一些实施方案中,活细胞包括经历正常功能性细胞过程的细胞和/或未经历坏死或程序性细胞死亡或不处于经历坏死或程序性细胞死亡的过程下的细胞。在一些实施方案中,可以通过细胞的氧化还原电位、细胞膜的完整性或线粒体的活性或功能来评估活力。在一些实施方案中,活力是在测定中不存在与细胞死亡相关的特定分子,或不存在细胞死亡的指示。在某些实施方案中,可以通过许多常规手段来检测、测量和/或评估细胞的活力。此类活力测定的非限制性例子包括但不限于染料摄取测定(例如,钙黄绿素AM测定)、XTT细胞活力测定、和染料排除测定(例如,台盼蓝、伊红或丙啶染料排除测定)。活力测定可用于确定细胞剂量、细胞组合物和/或细胞样品中的存活细胞的数量或百分比(例如,频率)。

[0248] 在特定实施方案中,凋亡标记可以包括与凋亡相关的任何已知标记,并且可以包括基因、蛋白质或蛋白质的活性形式的表达、或者与凋亡(如起泡和/或核破坏)相关的特征的出现。在某些实施方案中,凋亡标记是与凋亡相关的标记,其包括但不限于已知启动凋亡的促凋亡因子、死亡受体途径的成员、线粒体(内在)途径的激活成员、Bcl-2家庭成员(如Bax、Bad、和Bid、Fas、FADD)、核收缩的存在(例如,通过显微镜监测的)、染色体DNA片段化的存在(例如,染色体DNA阶梯的存在)、或与凋亡测定(例如TUNEL染色和膜联蛋白V染色)相关的标记。在一些实施方案中,凋亡标记是半胱天冬酶的表达,例如,半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶9、半胱天冬酶10和/或半胱天冬酶-13的活性形式的表达。在一些实施方案中,凋亡标记是膜联蛋白V。在某些实施方案中,凋亡标记是活性半胱天冬酶3。

[0249] 在一些实施方案中,例如在刺激条件下(例如在刺激试剂的存在下)孵育在为或约 1×10^5 个与为或约 $500,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 1×10^6 个与为或约 $50,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 10×10^6 个与为或约 $5,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 1×10^6 个与为或约 $1,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 50×10^6 个与为或约 $5,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 10×10^6 个与为或约 $1,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 100×10^6 个与为或约 $2,500 \times 10^6$ 个之间的细胞(例如输入组合物的细胞)。在特定实施方案中,例如在刺激条件下孵育至少、为、或为约 50×10^6 个细胞、 100×10^6 个细胞、 150×10^6 个细胞、 200×10^6 个细胞、 250×10^6 个细胞、 300×10^6 个细胞、 350×10^6 个细胞、 400×10^6 个细胞、 450×10^6 个细胞、或 500×10^6 个细胞。在一些实施方案中,细胞是存活细胞。在某些实施方案中,细胞呈凋亡标记(例如膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)阴性。在特定实施方案中,细胞是或包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0250] 在一些实施方案中,例如在刺激条件下(例如在刺激试剂的存在下)孵育在为或约 1×10^5 个与为或约 $25,000 \times 10^6$ 个之间、在为或约 1×10^6 个与为或约 $25,000 \times 10^6$ 个之间、在为或约 10×10^6 个与为或约 $2,500 \times 10^6$ 个之间、在为或约 1×10^6 个与为或约 500×10^6 个之间、在为或约 50×10^6 个与为或约 $2,500 \times 10^6$ 个之间、在为或约 10×10^6 个与为或约 500×10^6 个之间、在为或约 50×10^6 个与为或约 300×10^6 个之间的CD4+T细胞(例如输入组合物的CD4+T细胞)。在特定实施方案中,在例如刺激条件下孵育至少、为、或约 25×10^6 、 50×10^6 、 75×10^6 、 100×10^6 、 125×10^6 、 150×10^6 、 175×10^6 、 200×10^6 、 225×10^6 、或 250×10^6 个CD4+T细胞。在一些实施方案中,CD4+T细胞是活的CD4+T细胞。在某些实施方案中,CD4+T细胞呈凋亡标

记(例如膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)阴性。

[0251] 在某些实施方案中,例如在刺激条件下(例如在刺激试剂的存在下)孵育在为或约 1×10^5 个与为或约 $25,000 \times 10^6$ 个之间、在为或约 1×10^6 个与为或约 $25,000 \times 10^6$ 个之间、在为或约 10×10^6 个与为或约 $2,500 \times 10^6$ 个之间、在为或约 1×10^6 个与为或约 500×10^6 个之间、在为或约 50×10^6 个与为或约 $2,500 \times 10^6$ 个之间、在为或约 10×10^6 个与为或约 500×10^6 个之间、在为或约 50×10^6 个与为或约 300×10^6 个之间的CD8+T细胞(例如输入组合物的CD8+T细胞)。在一些实施方案中,例如在刺激条件下孵育至少、为、或约 25×10^6 、 50×10^6 、 75×10^6 、 100×10^6 、 125×10^6 、 150×10^6 、 175×10^6 、 200×10^6 、 225×10^6 、或 250×10^6 个CD8+T细胞。在一些实施方案中,CD8+T细胞是活的CD8+T细胞。在某些实施方案中,CD8+T细胞呈凋亡标记(例如膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)阴性。

[0252] 在一些实施方案中,刺激和/或激活的条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0253] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激试剂包括能够刺激或激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种试剂(例如,配体)。在一些方面,所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联,例如是适于递送初级信号以例如启动ITAM诱导的信号(例如对TCR组分(例如抗CD3)具有特异性的那些)的激活的药剂,和/或促进共刺激信号(例如对T细胞共刺激受体具有特异性的共刺激信号)的药剂,例如抗CD28或抗4-1BB(例如,其结合至固体支持物(例如珠))和/或一种或多种细胞因子。刺激试剂包括抗CD3/抗CD28珠(例如,DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T细胞扩增剂和/或ExpACT®珠)。任选地,扩增方法可以还包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括细胞因子。

[0254] 在特定实施方案中,刺激条件包括与刺激试剂一起孵育、培养和/或培育细胞。在特定实施方案中,刺激试剂是本文提供的试剂,例如,如在章节I-B-1中所述的试剂。在某些实施方案中,刺激试剂含有或包含珠。在某些实施方案中,当将细胞与刺激试剂接触和/或与刺激试剂一起孵育时,发生在刺激条件下孵育、培养和/或培育的细胞的起始和/或开始。在特定实施方案中,在将细胞进行基因工程化(例如将重组多核苷酸引入细胞中(例如通过转导或转染))之前、期间和/或之后孵育细胞。

[0255] 在一些实施方案中,以为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1的刺激试剂和/或珠与细胞的比率孵育富集T细胞的组合物。在特定实施方案中,刺激试剂和/或珠与细胞的比率为在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间、在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为约1:1或为1:1。

[0256] 在特定实施方案中,刺激条件包括在使用一种或多种细胞因子的情况下和/或在一种或多种细胞因子的存在下孵育、培养和/或培育细胞(例如来自输入组合物的细胞)。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中,所述一种或多种

细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素7(IL-7)、白细胞介素9(IL-9)、白细胞介素12(IL-12)、白细胞介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-2。

[0257] 在某些实施方案中,一种或多种细胞因子的量或浓度按国际单位(IU)测量和/或定量。国际单位可以用于定量维生素、激素、细胞因子、疫苗、血液制品和类似的生物活性物质。在一些实施方案中,IU是或包括通过与具有特定重量和强度的国际参考标准(例如,针对IL-2的WHO第一国际标准(WHO 1st International Standard for Human IL-2),86/504)相比的生物制剂效力的度量单位。国际单位是报告生物活性单位的唯一公认且标准化的方法,所述生物活性单位公开和源自国际合作研究工作。在特定实施方案中,可以通过与类似的WHO标准产品的产品比较测试获得细胞因子的组合物、样品或来源的IU。例如,在一些实施方案中,将人重组IL-2、IL-7或IL-15的组合物、样品或来源的IU/mg与WHO标准IL-2产品(NIBSC代码:86/500)、WHO标准IL-17产品(NIBSC代码:90/530)和WHO标准IL-15产品(NIBSC代码:95/554)进行比较。

[0258] 在一些实施方案中,以IU/mg计的生物活性等同于(ED_{50} ,以ng/mL计) $^{-1} \times 10^6$ 。在特定实施方案中,重组人IL-2或IL-15的 ED_{50} 等同于用CTLL-2细胞的半数最大刺激细胞增殖(XTT裂解)所需的浓度。在某些实施方案中,重组人IL-7的 ED_{50} 等同于PHA激活的人外周血淋巴细胞增殖的半最大刺激所需的浓度。在Wadhwa等人,Journal of Immunological Methods (2013),379(1-2):1-7;以及Gearing和Thorpe,Journal of Immunological Methods (1988),114(1-2):3-9中讨论了与IL-2的IU测定和计算有关的细节;在Soman等人Journal of Immunological Methods (2009)348(1-2):83-94中讨论了与IL-15的IU测定和计算有关的细节。

[0259] 在一些实施方案中,将细胞(例如输入细胞)与细胞因子例如重组人细胞因子以在为或约1IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约250IU/mL与为或约500IU/mL之间、或在为或约500IU/mL与为或约1,000IU/mL之间的浓度一起孵育。

[0260] 在一些实施方案中,将细胞(例如输入细胞)与IL-2(例如人重组IL-2)以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约150IU/mL之间、在为或约75IU/mL与为或约125IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、或在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起孵育。在特定实施方案中,将细胞(例如输入组合物的细胞)与重组IL-2以为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL、或100IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中,在例如为或约100IU/mL的重组IL-2(例如人重组IL-2)的存在下孵育细胞(例如输入细胞)。

[0261] 在一些实施方案中,将细胞(例如输入细胞)与重组IL-7(例如人重组IL-7)以在为

或约100IU/mL与为或约2,000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、或在为或约550IU/mL与为或约650IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起孵育。在特定实施方案中,将细胞(例如输入细胞)与IL-7以为或约50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、或1,000IU/mL的浓度一起孵育。在特定实施方案中,在为或约600IU/mL的IL-7(例如人重组IL-7)的存在下孵育细胞(例如输入细胞)。

[0262] 在一些实施方案中,将细胞(例如输入细胞)与重组IL-15(例如人重组IL-15)以为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约150IU/mL之间、在为或约75IU/mL与为或约125IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、或在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起孵育。在特定实施方案中,将细胞(例如输入组合物的细胞)与重组IL-15以为或约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL、或200IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中,在例如为或约100IU/mL的重组IL-15(例如人重组IL-15)的存在下孵育细胞(例如输入细胞)。

[0263] 在特定实施方案中,在刺激条件下在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下例如在无血清培养基中孵育细胞(例如来自输入组合物的细胞)。在一些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下在刺激条件下例如在无血清培养基中孵育细胞。

[0264] 所述条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0265] 在一些方面,孵育是根据多种技术来进行,例如以下文献中所述的那些技术:授予Riddell等人的美国专利号6,040,177;Klebanoff等人(2012) J Immunother. 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) Blood. 1:72-82;和/或Wang等人(2012) J Immunother. 35 (9) :689-701。

[0266] 在一些实施方案中,在无血清培养基中进行孵育。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,无血清培养基是受控培养基,其已经被处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,无血清培养基可含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0267] 在一些实施方案中,在一种或多种刺激条件或刺激试剂的存在下的孵育的至少一部分在离心室的内部空腔中例如在离心旋转下进行,如在国际公开号W02016/073602中所述。在一些实施方案中,在离心室中进行的孵育的至少一部分包括与一种或多种试剂混合以诱导刺激和/或激活。在一些实施方案中,将细胞(如所选择的细胞)与刺激条件或刺激剂在离心室中混合。在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量的一种或多种刺激

条件或刺激剂混合,所述刺激条件或刺激剂远小于在细胞培养板或其他系统中进行类似刺激时通常使用的刺激条件或刺激剂。

[0268] 在一些实施方案中,将刺激剂添加至室空腔中的细胞,所添加的量与例如在周期性振荡或旋转的管或袋中进行选择而不在离心室中混合时,实现相同数量的细胞或相同体积的细胞的大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的刺激剂的量相比显著较小(例如不大于所述量的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%)。在一些实施方案中,在向细胞和刺激剂中添加孵育缓冲液的情况下进行孵育,以实现例如10mL至200mL(例如至少或至少约或约10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL或200mL)试剂的孵育的目标体积。在一些实施方案中,在添加细胞之前预先混合孵育缓冲液和刺激剂。在一些实施方案中,将孵育缓冲液和刺激剂单独添加至细胞中。在一些实施方案中,在周期性温和混合条件下进行刺激孵育,这可能有助于促进能量上有利的相互作用,并且从而允许使用较少的总体刺激剂,同时实现细胞的刺激和激活。

[0269] 在一些实施方案中,孵育通常在混合条件下进行,例如在旋转的存在下,通常以相对低的力或速度旋转,例如速度低于用于使细胞沉淀的速度,例如从为或从约600rpm至或至约1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm),例如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下,所述RCF为从或从约80g至100g(例如,为或约或至少80g、85g、90g、95g或100g)。在一些实施方案中,旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行,例如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒,例如旋转大约1或2秒,然后休息大约5、6、7或8秒。

[0270] 在一些实施方案中,在刺激条件下(例如与刺激试剂一起)的孵育的总持续时间在或在约1小时与96小时之间、1小时与72小时之间、1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间、12小时与24小时之间、18小时与30小时之间,例如至少或至少约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时或72小时。在一些实施方案中,例如与刺激试剂一起孵育的总持续时间在或在约18小时与约30小时之间。

[0271] 在一些实施方案中,在将多核苷酸(例如编码重组受体的多核苷酸)引入细胞(例如通过转导和/或转染,例如由章节I-C所述)中的步骤之前和/或期间,在刺激条件下培养、培育和/或孵育细胞。在某些实施方案中,在基因工程化之前将细胞在刺激条件下培养、培育和/或孵育在30分钟与2小时之间、在1小时与8小时之间、在6小时与12小时之间、在12小时与18小时之间、在16小时与24小时之间、在18小时与30小时之间、在24小时与48小时之间、在24小时与72小时之间、在42小时与54小时之间、在60小时与120小时之间、在96小时与120小时之间、在90小时和在1天与7天之间、在3天与8天之间、在1天与3天之间、在4天与6天之间、或在4天与5天之间的时间量。在一些实施方案中,将细胞在刺激条件下孵育为或约在18小时与30小时之间。在特定实施方案中,将细胞在刺激条件下孵育为或约24小时。

[0272] 在一些实施方案中,在刺激条件下孵育细胞包括将细胞与在章节I-B-1中所述的刺激试剂一起孵育。在一些实施方案中,刺激试剂含有或包含珠,如顺磁珠,并且将细胞与刺激试剂以小于3:1(珠:细胞)的比率,如1:1的比率孵育。在特定实施方案中,在一种或多种细胞因子的存在下将细胞与刺激试剂一起孵育。在一些实施方案中,在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下,将细胞与刺激试剂以1:1(珠:细胞)的比率孵育。

[0273] 在特定实施方案中,将含有CD4⁺和CD8⁺T细胞的细胞的输入组合物在刺激条件下

孵育。在某些实施方案中,将细胞在无血清培养基中孵育。在特定实施方案中,输入组合物包含为或约1:1的比率的CD4+T细胞与CD8+T细胞。在某些实施方案中,在刺激条件下例如以小于或小于约 5×10^6 个细胞/mL的密度孵育至少或至少约 100×10^6 个细胞(例如来自输入组合物的细胞)。在特定实施方案中,在刺激条件下孵育至少或至少约 50×10^6 个CD4+T细胞和至少或至少约 50×10^6 个CD8+T细胞。在一些实施方案中,将细胞孵育在18小时与30小时之间。在特定实施方案中,在刺激条件下孵育细胞包括在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下将细胞与刺激试剂一起孵育。在某些实施方案中,以小于3:1的刺激试剂与细胞之比将细胞与刺激试剂一起孵育。在一些实施方案中,将细胞与在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间的IL-2、在为或约400与为或约1,000IU/mL之间的IL-7、和/或在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间的IL-15一起孵育。

[0274] 在某些实施方案中,在刺激条件下孵育输入组合物的在 100×10^6 个与 500×10^6 个之间的细胞,所述输入组合物含有为或约1:1的比率的CD4+和CD8+T细胞。在某些实施方案中,细胞是活细胞和/或呈凋亡标记阴性。在一些实施方案中,孵育输入组合物的为或约 300×10^6 个细胞。在特定实施方案中,在无血清培养基中孵育细胞。在特定实施方案中,以为或约 3×10^6 个细胞/mL的密度孵育细胞。在一些实施方案中,孵育为或约 150×10^6 个CD4+T细胞和为或约 150×10^6 个CD8+T细胞。在特定实施方案中,以为或约1:1的比率的刺激试剂与细胞将细胞与刺激试剂一起孵育。在某些实施方案中,在为或约100IU/mL IL-2、为或约600IU/mL IL-7、和在50IU/mL和/或为或约200IU/mL之间的IL-15的存在下孵育细胞。

[0275] 1. 刺激试剂

[0276] 在一些实施方案中,在刺激条件下孵育富集细胞的组合物是或包括使富集细胞的组合物与能够激活和/或扩增T细胞的刺激试剂孵育和/或接触。在一些实施方案中,刺激试剂能够刺激和/或激活细胞中的一个或多个信号。在一些实施方案中,一个或多个信号由受体介导。在特定实施方案中,一个或多个信号是以下或与以下相关:信号转导的变化和/或次级信使(例如cAMP和/或细胞内钙)的水平或量;一种或多种细胞蛋白的量、细胞定位、确认、磷酸化、泛素化、和/或截短的变化;和/或细胞活性(例如转录、翻译、蛋白降解、细胞形态、激活状态、和/或细胞分裂)的变化。在特定实施方案中,刺激条件包括与刺激试剂一起孵育、培养和/或培育细胞。在某些实施方案中,刺激试剂含有或包含珠。在某些实施方案中,当将细胞与刺激试剂一起孵育或接触时发生刺激的开始。在特定实施方案中,刺激试剂含有或包含寡聚试剂,例如链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在特定实施方案中,刺激试剂激活和/或能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[0277] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激试剂包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种药剂(例如,配体)。在一些实施方案中,如本文考虑的药剂可以包括但不限于RNA、DNA、蛋白质(例如,酶)、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段、碳水化合物、脂质凝集素或对所需靶标具有亲和力的任何其他生物分子。在一些实施方案中,所需靶标是T细胞受体和/或T细胞受体的组分。在某些实施方案中,所需靶标是CD3。在某些实施方案中,所需靶标是T细胞共刺激分子,例如CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。所述一种或多种药剂可以通过在本领域中已知和可用的各种方法直接或间接附接至珠上。附接可以是共价的、非共价的、静电的或疏水的,并且可以通过各种附接手段(包括例如化学手段、机械

手段或酶促手段)来实现。在一些实施方案中,所述药剂是抗体或其抗原结合片段,如Fab。在一些实施方案中,生物分子(例如,生物素化的抗CD3抗体)可以通过直接附接至珠的另一种生物分子(例如,抗生物素抗体)间接附接至珠。

[0278] 在一些实施方案中,刺激试剂含有与细胞(例如T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性地结合的一种或多种药剂(例如,抗体或其抗原结合片段,如Fab):CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L(CD70)、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R; IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a(LFA-1)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、Notch配体(例如Delta样配体1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、和CXCR3或其片段,包括这些大分子的对应配体或其片段。在一些实施方案中,刺激试剂含有与细胞(例如T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性地结合的一种或多种药剂(例如,抗体或其抗原结合片段,如Fab):CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA、和/或CD45RO。在一些实施方案中,一种或多种药剂是或能够附接至珠(例如顺磁珠)上。在一些实施方案中,一种或多种药剂是或能够附接(例如,可逆地附接)至寡聚试剂(例如链霉亲和素突变蛋白寡聚物)上。

[0279] 在一些实施方案中,一种或多种药剂包含抗体或其抗原结合片段,如Fab。抗体可以包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体和单链分子)以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv)。在一些实施方案中,刺激试剂是或包含抗体片段(包括抗原结合片段),例如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。应当理解,任何同种型的恒定区都可以用于本文考虑的抗体,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区,并且此类恒定区可以从任何人或动物物种(例如,鼠类物种)获得。在一些实施方案中,所述药剂是或包含结合和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中,所述药剂是或包含抗CD3抗体。在某些实施方案中,所述药剂是或包含结合和/或识别共受体的抗体。在一些实施方案中,刺激试剂是或包含抗CD28抗体。

[0280] 在一些实施方案中,在为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1的比率的刺激试剂与细胞的存在下刺激细胞(例如输入群体的细胞)。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间、在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为约1:1或为1:1。

[0281] 在一些实施方案中,在每10⁶个细胞为、约或至少0.01 μ g、0.02 μ g、0.03 μ g、0.04 μ g、0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g、0.75 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、4 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g、9 μ g、或10 μ g刺激试剂的存在下刺激细胞。在一些实施方案中,在每10⁶个细胞为或约4 μ g的存在下刺激细胞。在特定实施方案中,在每10⁶个细胞为或约0.8 μ g的存在下刺激细胞。在各种实施方案中,在每10⁶个细胞为或约0.8 μ g的存在下刺激细胞。

[0282] a. 珠试剂

[0283] 在某些实施方案中,刺激试剂含有与能够激活和/或扩增细胞(例如,T细胞)的一种或多种药剂(例如,生物分子)缀合或连接的颗粒(例如,珠)。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂结合至珠。在一些实施方案中,珠是生物相容的,即由适合于生物学用途的材

料构成。在一些实施方案中,珠对所培养的细胞(例如,所培养的T细胞)是无毒的。在一些实施方案中,珠可以是能够以允许药剂与细胞之间相互作用的方式附接药剂的任何颗粒。

[0284] 在一些实施方案中,刺激试剂含有能够激活和/或扩增细胞(例如T细胞)的一种或多种药剂,所述一种或多种药剂结合至或以其他方式附接至珠,例如结合至或附接于珠的表面。在某些实施方案中,珠是非细胞颗粒。在特定实施方案中,珠可以包括胶体颗粒、微球体、纳米颗粒、磁珠等。在一些实施方案中,珠是琼脂糖珠。在某些实施方案中,珠是琼脂糖凝胶珠。

[0285] 在特定实施方案中,刺激试剂含有单分散的珠。在某些实施方案中,单分散的珠包含彼此的直径标准偏差小于5%的尺寸分散体。

[0286] 在一些实施方案中,珠含有一种或多种药剂,如与珠的表面偶联、缀合或连接(直接或间接)的药剂。在一些实施方案中,如本文考虑的药剂可以包括但不限于RNA、DNA、蛋白质(例如,酶)、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段、碳水化合物、脂质凝集素或对所需靶标具有亲和力的任何其他生物分子。在一些实施方案中,所需靶标是T细胞受体和/或T细胞受体的组分。在某些实施方案中,所需靶标是CD3。在某些实施方案中,所需靶标是T细胞共刺激分子,例如CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。所述一种或多种药剂可以通过在本领域中已知和可用的各种方法直接或间接附接至珠上。附接可以是共价的、非共价的、静电的或疏水的,并且可以通过各种附接手段(包括例如化学手段、机械手段或酶促手段)来实现。在一些实施方案中,生物分子(例如,生物素化的抗CD3抗体)可以通过直接附接至珠的另一种生物分子(例如,抗生物素抗体)间接附接至珠。

[0287] 在一些实施方案中,刺激试剂含有珠和直接与细胞表面上的大分子相互作用的一种或多种药剂。在某些实施方案中,珠(例如顺磁珠)经由对细胞上的一种或多种大分子(例如一种或多种细胞表面蛋白)具有特异性的一种或多种药剂(例如抗体)与细胞相互作用。在某些实施方案中,将珠(例如顺磁珠)用本文所述的第一药剂(例如一抗(例如抗生物素抗体)或其他生物分子)标记,并且然后添加第二药剂(例如二抗(例如,生物素化的抗CD3抗体)或其他第二生物分子(例如,链霉亲和素),由此所述二抗或其他第二生物分子与颗粒上的此类一抗或其他生物分子特异性地结合。

[0288] 在一些实施方案中,刺激试剂含有附接至珠(例如顺磁珠)上并且与细胞(例如T细胞)上的一种或多种以下大分子特异性地结合的一种或多种药剂(例如抗体):CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L(CD70)、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R; IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a(LFA-1)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、Notch配体(例如Delta样配体1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、和CXCR3或其片段,包括这些大分子的对应配体或其片段。在一些实施方案中,附接至珠上的药剂(例如抗体)特异性地结合细胞(例如T细胞)上的一种或多种以下大分子:CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA、和/或CD45RO。

[0289] 在一些实施方案中,附接于珠的一种或多种药剂是抗体。抗体可以包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体和单链分子)以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv)。在一些实施方案中,刺激试剂是抗体片段(包括抗原结合片段),例如Fab、Fab'-SH、

Fv、scFv或(Fab') 2片段。应当理解,任何同种型的恒定区都可以用于本文考虑的抗体,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区,并且此类恒定区可以从任何人或动物物种(例如,鼠类物种)获得。在一些实施方案中,所述药剂是结合和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中,所述药剂是抗CD3抗体。在某些实施方案中,所述药剂是结合和/或识别共受体的抗体。在一些实施方案中,刺激试剂包含抗CD28抗体。在一些实施方案中,珠具有大于或大于约0.001 μm 、大于或大于约0.01 μm 、大于或大于约0.1 μm 、大于或大于约1.0 μm 、大于或大于约10 μm 、大于或大于约50 μm 、大于或大于约100 μm 、或大于或大于约1000 μm 、且不超过或不超过约1500 μm 的直径。在一些实施方案中,珠具有为或约1.0 μm 至为或约500 μm 、为或约1.0 μm 至为或约150 μm 、为或约1.0 μm 至为或约30 μm 、为或约1.0 μm 至为或约10 μm 、为或约1.0 μm 至为或约5.0 μm 、为或约2.0 μm 至为或约5.0 μm 、或为或约3.0 μm 至为或约5.0 μm 的直径。在一些实施方案中,珠具有为或约3 μm 至为或约5 μm 的直径。在一些实施方案中,珠的直径为至少或至少约或约0.001 μm 、0.01 μm 、0.1 μm 、0.5 μm 、1.0 μm 、1.5 μm 、2.0 μm 、2.5 μm 、3.0 μm 、3.5 μm 、4.0 μm 、4.5 μm 、5.0 μm 、5.5 μm 、6.0 μm 、6.5 μm 、7.0 μm 、7.5 μm 、8.0 μm 、8.5 μm 、9.0 μm 、9.5 μm 、10 μm 、12 μm 、14 μm 、16 μm 、18 μm 或20 μm 。在某些实施方案中,珠的直径为或为约4.5 μm 。在某些实施方案中,珠具有为或约2.8 μm 的直径。

[0290] 在一些实施方案中,珠具有大于或大于约0.001g/cm³、大于或大于约0.01g/cm³、大于或大于约0.05g/cm³、大于或大于约0.1g/cm³、大于或大于约0.5g/cm³、大于或大于约0.6g/cm³、大于或大于约0.7g/cm³、大于或大于约0.8g/cm³、大于或大于约0.9g/cm³、大于或大于约1g/cm³、大于或大于约1.1g/cm³、大于或大于约1.2g/cm³、大于或大于约1.3g/cm³、大于或大于约1.4g/cm³、大于或大于约1.5g/cm³、大于或大于约2g/cm³、大于或大于约3g/cm³、大于或大于约4g/cm³、或大于或大于约5g/cm³的密度。在一些实施方案中,所述珠具有在为或约0.001g/cm³与为或约100g/cm³之间、为或约0.01g/cm³与为或约50g/cm³之间、为或约0.1g/cm³与为或约10g/cm³之间、为或约0.1g/cm³与为或约5g/cm³之间、为或约0.5g/cm³与为或约1g/cm³之间、为或约0.5g/cm³与为或约1.5g/cm³之间、为或约1g/cm³与为或约1.5g/cm³之间、为或约1g/cm³与为或约2g/cm³之间、或为或约1g/cm³与为或约5g/cm³之间的密度。在一些实施方案中,珠具有为或约0.5g/cm³、为或约0.5g/cm³、为或约0.6g/cm³、为或约0.7g/cm³、为或约0.8g/cm³、为或约0.9g/cm³、为或约1.0g/cm³、为或约1.1g/cm³、为或约1.2g/cm³、为或约1.3g/cm³、为或约1.4g/cm³、为或约1.5g/cm³、为或约1.6g/cm³、为或约1.7g/cm³、为或约1.8g/cm³、为或约1.9g/cm³、或为或约2.0g/cm³的密度。在某些实施方案中,珠具有为或约1.6g/cm³的密度。在特定实施方案中,珠或颗粒具有为或约1.5g/cm³的密度。在某些实施方案中,颗粒具有为或约1.3g/cm³的密度。

[0291] 在某些实施方案中,多个珠具有均匀的密度。在某些实施方案中,均匀的密度包含平均珠密度的小于或小于约10%、小于或小于约5%或小于或小于约1%的密度标准偏差。

[0292] 在一些实施方案中,珠具有在为或约0.001m²/克颗粒(m²/g)至为或约1,000m²/g、为或约0.1m²/g至为或约100m²/g、为或约0.1m²/g至为或约10m²/g、为或约1m²/g至为或约10m²/g、为或约10m²/g至为或约100m²/g、为或约0.5m²/g至为或约20m²/g、为或约0.5m²/g至为或约5m²/g、或为或约1m²/g至为或约4m²/g之间的表面积。在一些实施方案中,颗粒或珠具有为或约1m²/g至为或约4m²/g的表面积。

[0293] 在一些实施方案中,珠含有在珠的表面处或附近的可以与药剂偶联、连接或缀合

的至少一种材料。在一些实施方案中,珠是表面官能化的,即包含能够与结合分子(例如,多核苷酸或多肽)形成共价键的官能团。在特定实施方案中,珠包含表面暴露的羧基、氨基、羟基、甲苯磺酰基、环氧基和/或氯甲基。在特定实施方案中,珠包含表面暴露的琼脂糖和/或琼脂糖凝胶。在某些实施方案中,珠表面包含附接的刺激试剂,其可以结合或附接结合分子。在特定实施方案中,生物分子是多肽。在一些实施方案中,珠包含表面暴露的蛋白质A、蛋白质G或生物素。

[0294] 在一些实施方案中,珠在磁场中起反应。在一些实施方案中,珠是磁珠。在一些实施方案中,磁珠是顺磁性的。在特定实施方案中,磁珠是超顺磁性的。在某些实施方案中,珠不显示任何磁性特性,除非它们暴露于磁场。

[0295] 在特定实施方案中,珠包含磁核、顺磁核或超顺磁核。在一些实施方案中,磁核含有金属。在一些实施方案中,金属可以是但不限于铁、镍、铜、钴、钆、锰、钽、锌、锆或其任何组合。在某些实施方案中,磁核包含金属氧化物(例如,氧化铁)、铁氧体(例如,锰铁氧体、钴铁氧体、镍铁氧体等)、赤铁矿和金属合金(例如,CoTaZn)。在一些实施方案中,磁核包含铁氧体、金属、金属合金、氧化铁或二氧化铬中的一种或多种。在一些实施方案中,磁核包含元素铁或其化合物。在一些实施方案中,磁核包含磁铁矿(Fe_3O_4)、磁赤铁矿($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$)或硫复铁矿(Fe_3S_4)中的一种或多种。在一些实施方案中,内核包含氧化铁(例如, Fe_3O_4)。

[0296] 在某些实施方案中,珠含有被表面官能化涂层(coat或coating)覆盖的磁核、顺磁核和/或超顺磁核。在一些实施方案中,涂层可以含有这样的材料,其可以包括但不限于聚合物、多糖、二氧化硅、脂肪酸、蛋白质、碳、琼脂糖、琼脂糖凝胶或其组合。在一些实施方案中,聚合物可以是聚乙二醇、聚(乳酸-共-乙醇酸)、聚戊二醛、聚氨酯、聚苯乙烯或聚乙烯醇。在某些实施方案中,外涂层(coat或coating)包含聚苯乙烯。在特定实施方案中,外涂层是表面功能化的。

[0297] 在一些实施方案中,刺激试剂包含珠,其含有金属氧化物核(例如,氧化铁核)和涂层,其中所述金属氧化物核包含至少一种多糖(例如,葡聚糖),并且其中所述涂层包含至少一种多糖(例如,氨基葡聚糖)、至少一种聚合物(例如,聚氨酯)和二氧化硅。在一些实施方案中,金属氧化物核是胶体氧化铁核。在某些实施方案中,所述一种或多种药剂包括抗体或其抗原结合片段。在特定实施方案中,所述一种或多种药剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体。在一些实施方案中,刺激试剂包含抗CD3抗体、抗CD28抗体和抗生物素抗体。在一些实施方案中,刺激试剂包含抗生物素抗体。在一些实施方案中,珠具有约 $3\mu\text{m}$ 至约 $10\mu\text{m}$ 的直径。在一些实施方案中,珠具有约 $3\mu\text{m}$ 至约 $5\mu\text{m}$ 的直径。在某些实施方案中,珠具有约 $3.5\mu\text{m}$ 的直径。

[0298] 在一些实施方案中,刺激试剂包含附接于珠的一种或多种药剂,所述珠包含金属氧化物核(例如,氧化铁内核)和涂层(例如,保护层),其中所述涂层包含聚苯乙烯。在某些实施方案中,珠是单分散的顺磁(例如超顺磁)珠,其包含顺磁(例如超顺磁)铁核(例如,包含磁铁矿(Fe_3O_4)和/或磁赤铁矿($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$)的核)和聚苯乙烯涂层(coat或coating)。在一些实施方案中,珠是无孔的。在一些实施方案中,珠含有所述一种或多种药剂附接的官能化表面。在某些实施方案中,所述一种或多种药剂与珠在表面上共价结合。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂包括抗CD3抗体和抗CD28抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂包括抗CD3抗体和/或抗CD28抗体、以及能够结合标记的抗体(例如生物素化的抗体)(如标记的抗CD3或

抗CD28抗体)的抗体或其抗原片段。在某些实施方案中,珠具有约 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ 的密度和约 $1\text{m}^2/\text{g}$ 至约 $4\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。在特定实施方案中;珠是单分散的超顺磁珠,其具有约 $4.5\mu\text{m}$ 的直径和约 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ 的密度。在一些实施方案中,珠是具有约 $2.8\mu\text{m}$ 的平均直径和约 $1.3\text{g}/\text{cm}^3$ 的密度的单分散的超顺磁珠。

[0299] 在一些实施方案中,以为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1的珠与细胞的比率将富集T细胞的组合物与刺激试剂一起孵育。在特定实施方案中,珠与细胞的比率为在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间、在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中,珠与细胞的比率为约1:1或为1:1。

[0300] b. 寡聚试剂

[0301] 在特定实施方案中,刺激试剂含有寡聚试剂(例如链霉亲和素突变蛋白试剂),其被缀合、连接或附接至一种或多种能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的药剂(例如配体)。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂具有能够在特定的结合位点(例如结合位点Z)上结合寡聚试剂的附接的结合结构域或结合配偶体(例如,结合配偶体C)。在一些实施方案中,多种药剂可逆地结合寡聚试剂。在各种实施方案中,寡聚试剂具有多个特定结合位点,所述多个特定结合位点在某些实施方案中在结合结构域(例如,结合配偶体C)处可逆地结合多种药剂。在一些实施方案中,在竞争试剂(例如还能够结合特定结合位点(例如结合位点Z)的试剂)的存在下结合药剂的量被降低或减少。在低聚刺激试剂中,包括抗CD3/抗CD28低聚链霉亲和素突变蛋白试剂,描述于国际PCT公开号W02018/197949中。

[0302] 在一些实施方案中,刺激试剂是或包括其中至少一种药剂(例如,能够在细胞(如T细胞)中产生信号的药剂)与寡聚试剂相关(例如可逆地相关)的可逆系统。在一些实施方案中,试剂含有能够与试剂结合(例如可逆地结合)的多个结合位点。在一些情况下,所述试剂是具有能够在细胞(如T细胞)中产生信号的至少一种附接的药剂的寡聚颗粒试剂。在一些实施方案中,药剂含有可以特异性地结合分子的表位或区域的至少一个结合位点(例如结合位点B)并且还含有与试剂的至少一个结合位点(例如,试剂的结合位点Z)结合的结合配偶体(在本文中也称为结合配偶体C)。在一些实施方案中,结合配偶体C与所述至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是非共价相互作用。在一些情况下,结合配偶体C与所述至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是共价相互作用。在一些实施方案中,结合配偶体C与所述至少一个结合位点Z之间的结合相互作用(例如非共价相互作用)是可逆的。

[0303] 在此类可逆系统中可用作寡聚试剂的物质是已知的,参见例如美国专利号5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604;和国际公开PCT申请号W02013/124474和W02014/076277。下文描述了能够形成可逆相互作用的试剂和结合配偶体以及能够逆转这种结合的物质(例如竞争试剂)的非限制性例子。

[0304] 在一些实施方案中,寡聚试剂是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白)或其混合物的寡聚物,其中这样的寡聚试剂含有用于与药剂的结合结构域(例如,结合配偶体C)可逆地缔合的一个或多个结合位点。在一些实施方案中,所述药剂的结合结构域可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或能够特异性结合链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物的其他分子。

[0305] 在某些实施方案中,一种或多种药剂(例如,能够在细胞如T细胞中产生信号的药剂)例如经由寡聚试剂上存在的多个特定结合位点(例如,结合位点Z)与寡聚试剂缔合(如可逆地结合)。在一些情况下,这导致所述药剂彼此紧密地排列,使得如果使具有由所述药剂结合或识别的细胞表面分子(至少两个拷贝)的靶细胞与所述药剂接触,则可以发生亲合力效应。

[0306] 在一些实施方案中,寡聚试剂是链霉亲和素寡聚物、链霉亲和素突变蛋白寡聚物、链霉亲和素类似物寡聚物、抗生物素蛋白寡聚物、由抗生物素蛋白突变蛋白或抗生物素蛋白类似物(如中性抗生物素蛋白)构成的寡聚物或其混合物。在特定实施方案中,寡聚试剂含有能够与药剂的结合结构域(例如,结合配偶体C)结合的特定结合位点。在一些实施方案中,结合结构域可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或能够特异性结合链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物的其他分子。

[0307] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物(如链霉亲和素样多肽)。同样,在一些方面,抗生物素蛋白包括野生型抗生物素蛋白、或者抗生物素蛋白的突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白,所述中性抗生物素蛋白是具有经修饰的精氨酸的去糖基化抗生物素蛋白,其通常展现更中性的pI并且可用作天然抗生物素蛋白的替代物)。通常,去糖基化的中性形式的抗生物素蛋白包括例如那些可商购获得的形式,如可通过Sigma Aldrich公司获得的“Extravidin”、或可获自Thermo Scientific或Invitrogen公司的“NeutrAvidin”。

[0308] 在一些实施方案中,试剂是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物。在一些实施方案中,野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)具有由Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986)1871-1882所披露的氨基酸序列(SEQ ID NO:72)。通常,链霉亲和素自然地作为四个相同亚基的四聚体存在,即它是同源四聚体,其中每个亚基含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的单一结合位点。链霉亲和素亚基的示例性序列是SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列,但是这样的序列还可以包括在来自其他链霉菌属(*Streptomyces*)物种的同源物中存在的序列。特别地,链霉亲和素的每个亚基可以展现对生物素的强结合亲和力,平衡解离常数(K_D)近似于为或约 10^{-14} M。在一些情况下,链霉亲和素可以作为其中四个结合位点中仅有一个有功能的单价四聚体存在(Howarth等人(2006) Nat.Methods,3:267-73;Zhang等人(2015) Biochem.Biophys.Res.Comm.,463:1059-63)、作为其中四个结合位点中的两个有功能的二价四聚体存在(Fairhead等人(2013) J.Mol.Biol.,426:199-214),或者可以以单体或二聚体形式存在(Wu等人(2005) J.Biol.Chem.,280:23225-31;Lim等人(2010) Biochemistry,50:8682-91)。

[0309] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是任何形式,如野生型或未经修饰的链霉亲和素,如来自链霉菌属物种的链霉亲和素或其功能活性片段,所述功能活性片段包括含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的结合位点的至少一个功能性亚基,例如通常含有SEQ ID NO:72所示的来自阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)的野生型链霉亲和素的至少一个功能性亚基或其功能活性片段。例如,在一些实施方案中,链霉亲和素可以包括野生型链霉亲和素的片段,所述片段在N末端和/或C末端被缩短。这种最小链霉亲和素包括在SEQ ID NO:72的氨基酸位置10至16的区域中的N末端开始并且在SEQ ID NO:

72的氨基酸位置133至142的区域中的C末端终止的任何链霉亲和素。在一些实施方案中,链霉亲和素的功能活性片段含有SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,如SEQ ID NO:73所示的链霉亲和素可以在对应于Ala13(其编号如SEQ ID NO:72所示)的位置处进一步含有N末端甲硫氨酸。关于链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白中残基的位置是参考在SEQ ID NO:72中残基的编号。

[0310] 链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的例子在例如WO 86/02077、DE 19641876A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中有提及。链霉亲和素突变蛋白的例子在本领域中是已知的,参见例如美国专利号5,168,049;5,506,121;6,022,951;6,156,493;6,165,750;6,103,493;或6,368,813;或国际公开的PCT申请号W02014/076277。

[0311] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可以含有不是未经修饰的或野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或者可以仅包括野生型或未经修饰的链霉亲和素的一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有至少一个亚基,所述至少一个亚基与未经修饰的或野生型链霉亲和素的亚基相比(例如与SEQ ID NO:72所示的野生型链霉亲和素亚基或例如SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:94所示的其功能活性片段相比)可以具有一个或多个氨基酸取代(置换)。

[0312] 在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白对结合结构域的结合亲和力(如解离常数(K_d))为小于或小于约 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$,但通常大于 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 。例如,肽序列(Strep-tag)(如在美国专利号5,506,121中所披露)可以用作生物素模拟物,并且证明对链霉亲和素的结合亲和力,例如 K_d 大约在 10^{-4} 与 10^{-5}M 之间。在一些情况下,可以通过在链霉亲和素分子内进行突变来进一步改善结合亲和力,参见例如美国专利号6,103,493或国际公开的PCT申请号W0 2014/076277。在一些实施方案中,结合亲和力可以通过本领域已知的方法(例如本文所述的任何方法)来确定。

[0313] 在一些实施方案中,试剂(如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白)展现出对肽配体结合配偶体的结合亲和力,所述肽配体结合配偶体可以是药剂(例如受体结合剂或选择剂)中存在的结合配偶体C。在一些实施方案中,肽序列包含具有通式His-Pro-Xaa的序列,其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,例如包含SEQ ID NO:89所示的序列。在一些实施方案中,肽序列具有在SEQ ID NO:90中所示的通式,例如在SEQ ID NO:80中所示。在一个例子中,肽序列是Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(也称为Strep-标签®,在SEQ ID NO:81中所示)。在一个例子中,肽序列是Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称为**Strep-tag® II**,如SEQ ID NO:75所示)。在一些实施方案中,肽配体含有至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列,其中在所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3个至8个氨基酸并且含有至少序列His-Pro-Xaa,其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,并且其中另一个结合模块具有相同或不同的链霉亲和素肽配体,如SEQ ID NO:90所示(参见例如国际公开的PCT申请号W0 02/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方案中,肽配体含有具有SEQ ID NO:82或83中任一个所示的式的序列。在一些实施方案中,肽配体具有SEQ ID NO:76-78和84-85中任一个所示的氨基酸序列。在大多数情况下,所有这些链霉亲和素结合肽结合相同的结合位点,即链霉亲和素的生物素结合位点。如果将一种或多种此类链霉亲和素结合肽用作结合配偶体C(例如C1和C2),经由结合配偶体C与

所述一种或多种药剂结合的多聚化试剂和/或低聚颗粒试剂通常由一种或多种链霉亲和素突变蛋白构成。

[0314] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白是如在美国专利号6,103,493中所描述的突变体。在一些实施方案中,基于野生型链霉亲和素的氨基酸序列(如SEQ ID NO:72所示的),链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域内含有至少一个突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在一个或多个残基44、45、46和/或47处含有突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有疏水性脂肪族氨基酸(例如Val、Ala、Ile或Leu)对野生型链霉亲和素的位置44处的Glu的置换,位置45处的任何氨基酸,位置46处的脂肪族氨基酸(如疏水性脂肪族氨基酸),和/或碱性氨基酸(例如Arg或Lys,如通常Arg)对位置47处的Val的置换。在一些实施方案中,Ala处于位置46和/或Arg处于位置47和/或Val或Ile处于位置44。在一些实施方案中,链霉亲和素突变体含有残基Val44-Thr45-Ala46-Arg47,例如在含有SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87或88所示的氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示(也称为链霉亲和素突变体1,SAM1)。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Ile44-Gly45-Ala46-Arg47,例如在含有SEQ ID NO:91、74或79所示的氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示的(也称为SAM2)。在一些情况下,这种链霉亲和素突变蛋白描述于例如美国专利6,103,493中,并且可以在商标**Strep-Tactin®**下商购获得。在一些实施方案中,突变蛋白链霉亲和素含有SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列。在特定实施方案中,所述分子是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的四聚体,其包含SEQ ID NO:73、87、74、92、94、88或79中任一所示的序列,作为四聚体,其是含有20个伯胺(每个单体包含1个N末端胺和4个赖氨酸)的分子。

[0315] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白展现出特征在于如下的平衡解离常数(K_D)的结合亲和力,所述 K_D 对于肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly;也称为**Strep-tag®**,如SEQ ID NO:81所示)而言等于或小于或小于约 $3.7 \times 10^{-5}M$,和/或对于肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;也称为**Strep-tag®II**,如SEQ ID NO:75所示)而言等于或小于或小于约 $7.1 \times 10^{-5}M$,和/或对于SEQ ID NO:75、82-85、76-78、80、81、89和90中任一所示的任何肽配体而言等于或小于或小于约 $7.0 \times 10^{-5}M$ 、 $5.0 \times 10^{-5}M$ 、 $1.0 \times 10^{-5}M$ 、 $5.0 \times 10^{-6}M$ 、 $1.0 \times 10^{-6}M$ 、 $5.0 \times 10^{-7}M$ 或 $1.0 \times 10^{-7}M$,但通常大于或大于约 $1 \times 10^{-13}M$ 、 $1 \times 10^{-12}M$ 或 $1 \times 10^{-11}M$ 。

[0316] 在一些实施方案中,所得的链霉亲和素突变蛋白展现出特征在于如下的平衡缔合常数(K_A)的结合亲和力,所述 K_A 对于肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly;也称为**Strep-tag®**,如SEQ ID NO:81所示)而言等于或大于或大于约 $2.7 \times 10^4 M^{-1}$,和/或对于肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;也称为**Strep-tag®II**,如SEQ ID NO:75所示)而言等于或大于或大于约 $1.4 \times 10^4 M^{-1}$,和/或对于SEQ ID NO:75、82-85、76-78、80、81、89和90中任一所示的任何肽配体而言等于或大于或大于约 $1.43 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $2 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.11 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.25 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.43 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.11 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.25 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.43 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $2 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1 \times 10^7 M^{-1}$,但通常小于 $1 \times 10^{13} M^{-1}$ 、 $1 \times 10^{12} M^{-1}$ 或 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 。

[0317] 在特定实施方案中,本文提供了由多种链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体构成和/或含有多种链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚颗粒试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚颗粒试剂含有可逆地结合或能够可逆地结合一种或多种药剂(例如刺激剂和/或选择剂)的多个结合位点。在一些实施方案中,寡聚颗粒具有在为或约70nm与为或约125nm之间(包含端值)的半径(例如,平均(average或mean)半径);在为或约 1×10^7 g/mol与为或约 1×10^9 g/mol之间(包含端值)的分子量;和/或在为或约1,000与为或约5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,包含端值。在一些实施方案中,寡聚颗粒试剂与一种或多种药剂结合(例如可逆地结合),所述一种或多种药剂例如为与细胞表面上的分子(例如受体)结合的药剂。在某些实施方案中,所述一种或多种药剂是或包含抗体或其抗原结合片段,如Fab。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂特异性地结合细胞(例如T细胞)上的一种或多种以下大分子:CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L(CD70)、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R; IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a(LFA-1)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、Notch配体(例如Delta样配体1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、和CXCR3或其片段,包括这些大分子的对应配体或其片段。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂特异性地结合细胞(例如T细胞)上的一种或多种以下大分子:CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA、和/或CD45RO。在一些实施方案中,所述一种或多种药剂包含抗体或其抗原结合片段,如Fab,并且所述抗体可以包括多克隆抗体、单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、双抗体和单链分子)以及抗体片段(例如,Fab、F(ab')₂和Fv)。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包含抗体片段(包括抗原结合片段),例如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。应当理解,任何同种型的恒定区都可以用于本文考虑的抗体,包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区,并且此类恒定区可以从任何人或动物物种(例如,鼠类物种)获得。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包含结合和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中,所述一种或多种试剂是或包含抗CD3抗体。在某些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包含结合和/或识别共受体的抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包含抗CD28抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂是或包含抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段,例如含有结合配偶体(例如链霉亲和素结合肽,例如**Strep-tag®II**)的抗体或其抗原片段。在特定实施方案中,所述一种或多种药剂是或包含含有结合配偶体(例如链霉亲和素结合肽,例如**Strep-tag®II**)的抗CD3和/或抗CD28 Fab。

[0318] 在一些实施方案中,本文提供了由多种链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体构成和/或含有多种链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚颗粒试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚颗粒试剂含有可逆地结合或能够可逆地结合一种或多种药剂(例如刺激剂和/或选择剂)的多个结合位点。在一些实施方案中,寡聚颗粒具有在为或约80nm与为或约120nm之间(包含端值)的半径(例如,平均半径);在为或约 7.5×10^6 g/mol与为或约 2×10^8 g/mol之间(包含端值)的分子量(例如平均分子量);和/或在为或约500与为或约10,000之间的量(例如平均量)的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,包含端

值。在一些实施方案中,寡聚颗粒试剂与一种或多种药剂结合(例如可逆地结合),所述一种或多种药剂例如为与细胞表面上的分子(例如受体)结合的药剂。在一些实施方案中,所述药剂是抗CD3和/或抗CD28 Fab,例如含有结合配偶体(例如链霉亲和素结合肽(例如Strep-tag®II))的Fab。在特定实施方案中,所述一种或多种药剂是含有结合配偶体(例如链霉亲和素结合肽,例如Streptag®II)的抗CD3和/或抗CD28 Fab。

[0319] 在一些实施方案中,在每 10^6 个细胞为、约或至少或至少约0.01 μ g、0.02 μ g、0.03 μ g、0.04 μ g、0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g、0.75 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、4 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g、9 μ g、或10 μ g寡聚刺激试剂的存在下刺激细胞。在一些实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约4 μ g的存在下刺激细胞。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约0.8 μ g的存在下刺激细胞。在某些方面,4 μ g寡聚刺激试剂是或包括为或约3 μ g的寡聚颗粒和为或约1 μ g的附接的药剂,例如为或约0.5 μ g的抗CD3 Fab和为或约0.5 μ g的抗CD28 Fab。

[0320] 2. 从细胞中去除刺激试剂

[0321] 在一些实施方案中,在收集、收获或配制细胞之前,将刺激试剂从细胞或细胞群中去除或分离。在一些实施方案中,在孵育(例如在本文(如在章节I-D中)所述的孵育)之后或期间,将刺激试剂从细胞或细胞群中去除或分离。在某些实施方案中,细胞或细胞群在孵育之后但在收集、收获或配制细胞的步骤之前经历去除刺激试剂的过程、程序、步骤或技术。在特定实施方案中,细胞或细胞群在孵育之后经历去除刺激试剂的过程、程序、步骤或技术。在一些方面,当在孵育期间从细胞分离或去除刺激试剂时,对于孵育的剩余持续时间,将细胞返回到与分离或去除之前相同的孵育条件。

[0322] 在某些实施方案中,从细胞中去除和/或分离刺激试剂。在特定实施方案中,在一些情况下,在孵育期间,刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合可能随时间降低。在某些实施方案中,可以添加一种或多种药剂以降低刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合。在特定实施方案中,细胞培养条件的变化(例如药剂的添加和/或培养基温度和/或pH的变化)可能降低刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合。因此,在一些实施方案中,刺激试剂可以与细胞分开地从孵育、细胞培养系统和/或溶液中去除,例如,同时不会从孵育、细胞培养系统和/或溶液中去除细胞。

[0323] 在某些实施方案中,在一定量的时间之后,将刺激试剂从细胞中分离和/或去除。在特定实施方案中,时间量是从刺激开始起的时间量。在特定实施方案中,孵育的开始被认为是或约在细胞与刺激试剂和/或含有刺激试剂的培养基或溶液接触的时候。在特定实施方案中,在刺激开始的为或约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时(包含端值)内,从细胞中去除或分离刺激试剂。在特定实施方案中,在刺激开始后或在刺激后约48小时将刺激试剂从细胞中去除或分离。在某些实施方案中,在刺激开始后或在刺激后约72小时将刺激试剂从细胞中去除或分离。在一些实施方案中,在刺激开始后或在刺激后约96小时将刺激试剂从细胞中去除或分离。

[0324] 从细胞中去除刺激试剂(例如为或含有颗粒如珠颗粒或可磁化颗粒的刺激试剂)的方法是已知的。在某些实施方案中,从细胞或细胞群中分离或去除珠刺激试剂,例如抗CD3/抗CD28抗体缀合的顺磁珠。在一些实施方案中,可以使用竞争性抗体(如未标记的抗体),其例如与刺激试剂的一抗结合并改变其对其在细胞上的抗原的亲合力,从而允许轻柔脱离。在一些情况下,在脱离之后,竞争性抗体可以保持与颗粒(例如珠颗粒)缔合,而未反

应的抗体被洗去或可以被洗去,并且细胞不含分离、选择、富集和/或激活的抗体。这样的试剂的例子是DETACaBEAD (Friedl等人1995;Entschladen等人1997)。在一些实施方案中,可以在可切割接头(例如DNA接头)的存在下除去颗粒(例如珠颗粒),由此使颗粒结合的抗体缀合至接头(例如,CELLlection、Dynal)。在一些情况下,接头区提供了可切割位点,以在分离之后例如通过添加DNase或其他释放缓冲液从细胞中除去颗粒(例如珠颗粒)。在一些实施方案中,还可以采用其他酶促方法从细胞中释放颗粒(例如珠颗粒)。在一些实施方案中,颗粒(例如珠颗粒或可磁化颗粒)是可生物降解的。

[0325] 在一些实施方案中,刺激试剂是磁性的、顺磁性的和/或超顺磁性的,和/或含有是磁性的、顺磁性的和/或超顺磁性的珠,并且可以通过将细胞暴露于磁场来从细胞中去除刺激试剂。含有用于产生磁场的磁体的合适设备的例子包括DynaMag CTS (Thermo Fisher)、磁分离器(Takara)和EasySep磁体(Stem Cell Technologies)。

[0326] 在特定实施方案中,在完成所提供的方法之前,例如在收获、收集和/或配制通过本文提供的方法产生的工程化细胞之前,将刺激试剂从细胞中去除或分离。在一些实施方案中,在工程化(例如转导或转染)细胞之后,从细胞中去除和/或分离刺激试剂。在某些实施方案中,在培育细胞之后,例如在促进增殖和/或扩增的条件下培育工程化(例如转染或转导的)细胞之前,去除刺激试剂。在特定实施方案中,在培育细胞期间细胞实现阈值数量、密度和/或扩增之后,去除刺激试剂。在一些实施方案中,在配制细胞之前,例如在形成培育的细胞,例如已经实现阈值数量、浓度或扩增的培育细胞之前,去除刺激试剂。

[0327] 在一些实施方案中,在收集、收获或配制细胞之前,将刺激性珠试剂(例如刺激性磁珠试剂)从细胞或细胞群中去除或分离。在一些实施方案中,通过在孵育(例如,本文如章节I-D中所述的孵育)期间或之后暴露于磁场,将刺激性珠试剂例如刺激性磁珠试剂从细胞或细胞群中去除或分离。在某些实施方案中,在孵育之后但在收集、收获或配制细胞的步骤之前,将细胞或细胞群暴露于磁场以去除刺激性珠试剂,例如刺激性磁珠试剂。在特定实施方案中,在孵育之后,将细胞或细胞群经历暴露于磁场以去除刺激性珠试剂,例如刺激性磁珠试剂。在一些方面,当在孵育期间将刺激性珠试剂从细胞或细胞群中分离或去除时,对于孵育的剩余持续时间,将细胞或细胞群返回到与暴露于磁场之前相同的孵育条件。

[0328] 在特定实施方案中,在刺激开始的为或约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时内(包含端值),例如通过暴露于磁场,从细胞中去除或分离刺激性珠试剂(例如刺激性磁珠试剂)。在某些实施方案中,在刺激开始后的为或约72小时,例如通过暴露于磁场,从细胞中去除或分离刺激性珠试剂(例如刺激性磁珠试剂)。在一些实施方案中,在刺激开始后的为或约96小时,例如通过暴露于磁场,将刺激性珠试剂(例如刺激性磁珠试剂)从细胞中去除或分离。

[0329] 在某些实施方案中,在一定量的时间之后,将刺激试剂从细胞中分离和/或去除。在特定实施方案中,所述时间量是从在刺激条件下起始和/或开始孵育起的时间量。在特定实施方案中,孵育的开始被认为是在或约在细胞与刺激试剂和/或含有刺激试剂的培养基或溶液接触的时候。在特定实施方案中,在孵育起始或开始后的为或约28天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天和9天内从细胞中去除或分离刺激试剂。在一些实施方案中,在将CD4+T细胞和CD8+T细胞合并、组合和/或混合到输入组合物中后的为或约28天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、

9天内,从细胞中去除或分离刺激试剂。在某些实施方案中,在从生物样品中获得、分离、富集和/或选择CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞后的为或约28天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天内,从细胞中去除或分离刺激试剂。

[0330] 在一些实施方案中,去除刺激试剂(如所描述的寡聚刺激试剂)包括向孵育的T细胞群中添加物质如竞争剂被添加至T细胞以破坏(如减少和/或终止)一种或多种刺激剂的信号传导。在一些实施方案中,所孵育的T细胞群体含有物质的存在,所述物质例如为竞争剂,例如生物素或生物素类似物(例如D-生物素)。在一些实施方案中,物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物(例如D-生物素))以如下的量存在:所述量比参考群体中或在其中孵育期间没有外源性地添加所述物质的培养的T细胞制剂中的物质的量多至少1.5倍、多至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少100倍、至少1000倍或更多。在一些实施方案中,在培养的T细胞群体中物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物(例如D-生物素))的量为从为或约10 μ M至为或约100 μ M、为或约100 μ M至为或约1mM、为或约100 μ M至为或约500 μ M、或为或约10 μ M至为或约100 μ M。在一些实施方案中,将10 μ M或约10 μ M的生物素或生物素类似物(例如D-生物素)添加至细胞或细胞群,以从细胞或细胞群中分离或去除寡聚刺激试剂。

[0331] 在某些实施方案中,所述一种或多种药剂(例如刺激或激活TCR和/或共受体的药剂)例如经由寡聚试剂上存在的多个特定结合位点(例如结合位点Z)与寡聚试剂缔合(如可逆地结合)。在一些情况下,这导致所述药剂彼此紧密地排列,使得如果使具有由所述药剂结合或识别的细胞表面分子(至少两个拷贝)的靶细胞与所述药剂接触,则可以发生亲合力效应。在一些方面,受体结合试剂在结合位点B处对细胞的受体分子具有低亲和力,使得受体结合试剂在竞争试剂的存在下与细胞解离。因此,在一些实施方案中,在竞争试剂的存在下从细胞中去除所述药剂。

[0332] 在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是具有可逆地附接的抗CD3和抗CD28Fab的链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些实施方案中,所附接的Fab含有链霉亲和素结合结构域,例如,其允许可逆地附接至链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些情况下,抗CD3和抗CD28 Fab彼此紧密地排列,使得如果使表达CD3和/或CD28的T细胞与具有可逆地附接的Fab的寡聚刺激试剂接触,则可能发生亲合力作用。在一些方面,Fab对CD3和CD28具有低亲和力,使得Fab在竞争试剂(例如生物素或生物素变体或类似物)的存在下从细胞中解离。因此,在一些实施方案中,在竞争试剂(例如D-生物素)的存在下将Fab从细胞中去除或解离。

[0333] 在一些实施方案中,在收集、收获或配制细胞之前,将刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)从细胞或细胞群中去除或分离。在一些实施方案中,在孵育(例如本文(例如在章节I-D中)所述的孵育)之后或期间通过在与竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素))接触或暴露于竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素)),将刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)从细胞或细胞群中去除或分离。在某些实施方案中,在孵育之后但在用于收集、收获或配制细胞的步骤之前,将细胞或细胞群与竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素))接触或暴露于竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素)),以去除刺激性寡聚试剂,例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂。在特定实施方案中,在孵育之后,将细胞或细胞群与竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素))接触或暴露于竞争试剂(例如生物素或生

物素类似物(如D-生物素)),以去除刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些方面,当在孵育期间,例如通过与竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素))接触或暴露于竞争试剂(例如生物素或生物素类似物(如D-生物素)),从细胞中分离或去除刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)时,对于孵育的剩余持续时间,将细胞返回到与分离或去除之前相同的孵育条件。

[0334] 在一些实施方案中,使细胞与为、约、或至少或至少约0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01mM、1mM、或10mM的竞争试剂接触,以从细胞中去除或分离寡聚刺激试剂。在各种实施方案中,使细胞与为、约、或至少或至少约0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01mM、1mM、或10mM的生物素或生物素类似物(如D-生物素)接触,以从细胞中去除或分离具有可逆地附接的抗CD3和抗CD28Fab的刺激性链霉亲和素突变蛋白寡聚物。

[0335] 在特定实施方案中,在刺激开始的为或约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时(包含端值)内,从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在特定实施方案中,在刺激开始后或在刺激后约48小时从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在某些实施方案中,在刺激开始后的为或约72小时,从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些实施方案中,在刺激开始后的为或约96小时,从细胞中去除或分离刺激性寡聚试剂(例如刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。

[0336] C.工程化细胞

[0337] 在一些实施方案中,处理步骤包括例如在将编码重组蛋白的核酸分子引入一个或多个细胞中的条件下,对细胞(例如刺激的细胞)进行工程化。此类重组蛋白的例子是重组受体,如章节II中所述的任何重组受体。用于将细胞工程化(例如用于将编码重组蛋白(如重组受体)的核酸分子引入细胞中)的方法,可以使用多种已知方法中的任何一种来进行,例如使用含有编码重组蛋白的多核苷酸的载体或其他药剂。此类载体包括病毒和非病毒系统,包括慢病毒和 γ 逆转录病毒系统,以及基于转座子的系统,如基于PiggyBac或Sleeping Beauty的基因转移系统。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的那些,包括通过病毒(如逆转录病毒或慢病毒)、转导、转座子和电穿孔。

[0338] 在某些实施方案中,在培育细胞之前,例如通过涉及转导或转染细胞的过程,使细胞和/或富集的T细胞的组合物经历工程化。在某些情况下,例如通过本文(例如在章节I-D中)提供的方法,在促进增殖和/或扩增的条件下进行培育。在特定实施方案中,在已经在刺激条件下,例如通过本文(例如在章节I-B中)提供的任何方法,刺激、激活和/或孵育细胞之后,使细胞经历工程化。在特定实施方案中,细胞是受刺激的细胞和/或细胞组合物是受刺激的细胞组合物,例如通过先前在刺激条件下的孵育,例如,如章节I-B中所述。在特定实施方案中,先前已经将一种或多种刺激组合物低温冷冻并储存,并在工程化之前解冻。

[0339] 在一些实施方案中,例如通过使此类细胞与含有编码用于例如通过转导或转染将细胞工程化的重组蛋白(例如CAR)的多核苷酸的药剂(例如慢病毒载体)接触,使设定数量和/或固定数量的细胞(例如刺激的细胞)经历工程化。在特定实施方案中,使在为或约 1×10^5 个与为或约 $50,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 1×10^6 个与为或约 $50,000 \times 10^6$ 个之间

的细胞、在为或约 10×10^6 个与为或约 $5,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 1×10^6 个与为或约 $1,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 50×10^6 个与为或约 $5,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 10×10^6 个与为或约 $1,000 \times 10^6$ 个之间的细胞、在为或约 50×10^6 个与为或约 500×10^6 个之间的细胞(例如刺激的细胞)例如通过转导或转染经历工程化。在特定实施方案中,将至少、为或为约 50×10^6 个细胞、 100×10^6 个细胞、 150×10^6 个细胞、 200×10^6 个细胞、或 250×10^6 个细胞进行工程化。在特定实施方案中,使至少约 100×10^6 个细胞经历工程化。在特定实施方案中,使多达 200×10^6 个细胞经历工程化。在特定实施方案中,使在约 100×10^6 个与约 200×10^6 个之间的细胞经历工程化。在一些实施方案中,细胞是经刺激的细胞。在特定实施方案中,细胞是活细胞。在某些实施方案中,细胞呈凋亡标记(例如膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)阴性。在某些实施方案中,细胞是已经例如通过在刺激条件下孵育被刺激的活细胞。

[0340] 在一些实施方案中,例如通过使此类细胞与含有编码重组蛋白(例如,CAR)的多核苷酸的药剂(例如,慢病毒载体)接触(例如通过转导或转染)进行工程化的细胞(例如,刺激的细胞)的数量是激活或刺激之后的细胞总数,并且多达最多 200×10^6 个总细胞。在一些实施方案中,对于源自不同供体的输入组合物,可以对激活或刺激之后的不同数量的细胞进行工程化,例如转导或转染。在一些实施方案中,在其中激活或刺激之后的细胞总数为或超过 200×10^6 个的情况下,使最多多达 200×10^6 个细胞经历工程化,而在其中激活或刺激之后的细胞总数低于 200×10^6 个的情况下,使所有激活后或刺激后的细胞经历工程化。在一些实施方案中,细胞是经刺激的细胞。在特定实施方案中,细胞是活细胞。在某些实施方案中,细胞呈凋亡标记(例如膜联蛋白V或活性半胱天冬酶3)阴性。在某些实施方案中,细胞是已经例如通过在刺激条件下孵育被刺激的活细胞。

[0341] 在一些实施方案中,通过首先刺激细胞来实现基因转移,例如通过将其与诱导诸如增殖,存活和/或激活之类的应答的刺激相结合,例如通过细胞因子或激活标记的表达来测量,然后转导激活的细胞,并将培养物扩增至足以用于临床的数量。在某些实施方案中,通过首先在刺激条件下孵育细胞(例如通过本文(例如在章节I-B中)所述的任何方法)来完成基因转移。

[0342] 在某些实施方案中,通过使组合物的一个或多个细胞与编码重组蛋白(例如,重组受体)的核酸分子接触来进行用于基因工程化的方法。在一些实施方案中,使用重组感染性病毒颗粒(例如像源自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移到细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Koste等人(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29(11):550-557。

[0343] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如,衍生自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体源自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括源自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/

或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa等人(1991)Virology 180:849-852;Burns等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109。

[0344] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等人(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeven等人(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;以及Cavalieri等人(2003)Blood.102(2):497-505中。

[0345] 在一些实施方案中,经由电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Chicaybam等人,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo等人(2000)Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,经由转座将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Manuri等人(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;以及Huang等人(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如在Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y.中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));以及磷酸锶DNA共沉淀(Brash等人,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0346] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是例如国际专利申请公开号WO 2014055668和美国专利号7,446,190中描述的那些。

[0347] 在一些实施方案中,在无血清培养基中进行工程化(例如转导或转染)。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,无血清培养基是受控培养基,其已经被处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,无血清培养基可含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0348] 在一些实施方案中,在转导佐剂的存在下使细胞(例如刺激的细胞)经历工程化,例如转导或转染。示例性转导佐剂包括但不限于聚阳离子、纤连蛋白或纤连蛋白衍生的片段或变体、以及RetroNectin。在某些实施方案中,在聚阳离子、纤连蛋白或纤连蛋白衍生的片段或变体和/或RetroNectin的存在下使细胞经历工程化。在特定实施方案中,在聚阳离子的存在下使细胞经历工程化,所述聚阳离子是聚凝胺(polybrene)、DEAE-葡聚糖、硫酸鱼精蛋白、聚-L-赖氨酸或阳离子脂质体。在特定实施方案中,在硫酸鱼精蛋白的存在下使细胞经历工程化。

[0349] 在一些实施方案中,在不存在转导佐剂的情况下,使细胞(例如刺激的细胞)经历工程化,例如转导或转染。因此,在特定实施方案中,在不存在聚阳离子、纤连蛋白或纤连蛋白衍生的片段或变体和/或RetroNectin的情况下使细胞经历工程化。在特定实施方案中,在不存在聚阳离子的情况下使细胞经历工程化,所述聚阳离子是聚凝胺、DEAE-葡聚糖、硫酸鱼精蛋白、聚-L-赖氨酸或阳离子脂质体。在特定实施方案中,在不存在硫酸鱼精蛋白的情况下使细胞经历工程化。

[0350] 在一些实施方案中,可以在激活、刺激和/或扩增期间或之后例如用T细胞受体

(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)对细胞(例如,T细胞)进行转导。例如,用于引入所需受体的基因的这种转导可以用任何合适的逆转录病毒载体来进行。然后可以使基因修饰的细胞群摆脱初始刺激物(例如CD3/CD28刺激物),并且随后用第二种类型的刺激物例如经由从头引入的受体进行刺激。这第二种类型的刺激物可以包括呈肽/MHC分子形式的抗原刺激物、基因引入的受体的同源(交联)配体(例如,CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如,通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”*Methods Mol Biol.*2012;907:645-66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine*第65卷:333-347(2014)。

[0351] 在一些方面,进一步使细胞经历工程化以促进细胞因子或其他因子的表达。另外的核酸(例如,用于引入的基因)包括用于改善治疗功效的那些,如通过促进转移细胞的活力和/或功能;用于提供选择和/或评估细胞的遗传标记的基因,如以评估体内存活或定位;改善安全性的基因,例如通过使细胞在体内对阴性选择易感,如Lupton S.D.等人,*Mol. and Cell Biol.*,11:6(1991)和Riddell等人,*Human Gene Therapy* 3:319-338(1992)所述;还参见Lupton等人的PCT/US91/08442和PCT/US94/05601的出版物,其描述了使用由将显性阳性选择性标记与阴性选择性标记融合而得到的双功能选择性融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0352] 在一些实施方案中,所述引入通过使组合物的一个或多个细胞与编码重组蛋白(例如,重组受体)的核酸分子接触来进行。在一些实施方案中,所述接触可以通过离心如旋转接种(例如离心接种)来实现。所述方法包括如国际公开号W0 2016/073602中所述的任何方法。示例性离心室包括由Biosafe SA生产和销售的那些,包括用于Sepax®和Sepax®2系统的那些,包括A-200/F和A-200离心室以及用于此类系统的各种试剂盒。示例性室、系统和处理仪器和机柜描述于例如以下文献中:美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和公开的美国专利申请公开号US2008/0171951,以及公开的国际专利申请公开号W0 00/38762,将其各自的内容通过引用以其整体并入本文。用于此类系统的示例性试剂盒包括但不限于由BioSafe SA以产品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1或CS-900.2销售的一次性试剂盒。

[0353] 在一些实施方案中,将系统与其他仪器一起包括和/或置于与其他仪器相关联,所述其他仪器包括用于操作、自动化、控制和/或监测转导步骤以及在系统中执行的一个或多个各种其他处理步骤(例如,可以使用或结合如本文或在国际公开号W0 2016/073602中描述的离心室系统进行的一个或多个处理步骤)的方面的仪器。在一些实施方案中,这种仪器容纳于机柜中。在一些实施方案中,所述仪器包括机柜,所述机柜包括外壳,所述外壳含有控制电路、离心机、罩、电机、泵、传感器、显示器和用户界面。示例性装置描述于美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和US2008/0171951中。

[0354] 在一些实施方案中,所述系统包含一系列容器,例如袋、管路、旋塞、夹子、连接器和离心室。在一些实施方案中,容器(如袋)包括一个或多个容器(如袋),其在一容器或单独的容器(如同一袋或单独的袋)中含有待转导的细胞和病毒载体颗粒。在一些实施方案中,所述系统还包括一个或多个容器(例如袋),所述容器含有介质,例如稀释剂和/或洗涤溶液,在所述方法期间将所述介质抽入室和/或其他部件中以稀释、重悬和/或洗涤组分和/

或组合物。所述容器可以连接在系统中的一个或多个位置,例如连接在对应于输入管线、稀释剂管线、洗涤管线、废液管线和/或输出管线的位置。

[0355] 在一些实施方案中,所述室与离心机相关联,离心机能够实现所述室的旋转,例如围绕其旋转轴旋转。结合细胞的转导和/或在一个或多个其他处理步骤中,旋转可以发生在孵育之前、期间和/或之后。因此,在一些实施方案中,各个处理步骤中的一个或多个在旋转下(例如在特定的力下)进行。所述室通常能够竖直或大致竖直地旋转,使得所述室在离心期间竖直放置,并且侧壁和轴是竖直或大致竖直的,且一个或多个端壁是水平或大致水平的。

[0356] 在一些实施方案中,在将组合物提供给空腔之前,可以组合或混合含有细胞的组合物和含有病毒载体颗粒的组合物、以及任选地空气。在一些实施方案中,将含有细胞的组合物和含有病毒载体颗粒的组合物、以及任选地空气单独地提供并在空腔中组合和混合。在一些实施方案中,可以以任何顺序将含有细胞的组合物和含有病毒载体颗粒的组合物、以及任选地空气提供给内部空腔。在任何此类一些实施方案中,含有细胞和病毒载体颗粒的组合物一旦被组合或混合在一起就是输入组合物,无论这是在离心室内部还是在离心室外部组合和/或混合,和/或无论将细胞和病毒载体颗粒一起还是单独地(如同时或依次地)提供给离心室。

[0357] 在一些实施方案中,在转导方法中在孵育细胞和病毒载体颗粒(如旋转)之前发生所述体积的气体(如空气)的摄入。在一些实施方案中,在转导方法中在细胞和病毒载体颗粒的孵育(如旋转)期间发生所述体积的气体(如空气)的摄入。

[0358] 在一些实施方案中,构成转导组合物的细胞或病毒载体颗粒的液体体积、以及任选地空气的体积可以是预定体积。所述体积可以是被编程到与系统相关的电路中和/或由与所述系统相关的电路控制的体积。

[0359] 在一些实施方案中,手动、半自动和/或自动地控制转导组合物和任选地气体(如空气)的摄入,直到已经将所需或预定的体积摄入室的内部空腔中为止。在一些实施方案中,与系统相关的传感器可以例如经由其颜色、流速和/或密度来检测流入和流出离心室的液体和/或气体,并且可以与相关电路通信以按照需要停止或继续摄入,直到已经实现这种所需或预定体积的摄入为止。在一些方面,可以使被编程或仅能够检测系统中的液体而非气体(例如空气)的传感器能够在不停止摄入的情况下允许气体(如空气)通过进入系统中。在一些此类实施方案中,当需要气体(如空气)摄入时,可以将一条不透明的管组放置在传感器附近的线中。在一些实施方案中,可以手动地控制气体(如空气)的摄入。

[0360] 在所提供的方法的方面中,使离心室的内部空腔经历高速旋转。在一些实施方案中,在液体输入组合物和任选地空气的摄入之前、同时、之后或间歇地实现旋转。在一些实施方案中,在液体输入组合物和任选地空气的摄入之后实现旋转。在一些实施方案中,旋转是通过在内部空腔的侧壁的内表面和/或在细胞的表面层处的为或约或至少或至少约800g、1000g、1100g、1500、1600g、1800g、2000g、2200g、2500g、3000g、3500g或4000g的相对离心力对离心室的离心进行。在一些实施方案中,旋转是通过大于或约1100g,例如通过大于或约1200g、大于或约1400g、大于或约1600g、大于或约1800g、大于或约2000g、大于或约2400g、大于或约2800g、大于或约3000g或大于或约3200g的力的离心进行。在一些实施方案中,旋转是通过为或为约1600g的力的离心进行。

[0361] 在一些实施方案中,转导方法包括在离心室中将转导组合物和任选地空气旋转或离心,持续大于或约5分钟,例如大于或约10分钟、大于或约15分钟、大于或约20分钟、大于或约30分钟、大于或约45分钟、大于或约60分钟、大于或约90分钟或大于或约120分钟。在一些实施方案中,将转导组合物和任选地空气在离心室中旋转或离心,持续大于5分钟,但持续不超过60分钟、不超过45分钟、不超过30分钟或不超过15分钟。在特定实施方案中,转导包括旋转或离心持续或持续约60分钟。

[0362] 在一些实施方案中,转导方法包括在离心室内将转导组合物和任选地空气旋转或离心,持续为或约10分钟与为或约60分钟之间、为或约15分钟与为或约60分钟之间、为或约15分钟与为或约45分钟之间、为或约30分钟与为或约60分钟之间或为或约45分钟与为或约60分钟之间(每个都包含端值),并且在内部空腔的侧壁的内表面和/或在细胞的表面层处的至少或大于或大于约1000g、1100g、1200g、1400g、1500g、1600g、1800g、2000g、2200g、2400g、2800g、3200g或3600g的力下旋转或离心。在特定实施方案中,转导方法包括在为或为约1600g下将转导组合物(例如细胞和病毒载体颗粒)旋转或离心,持续或持续约60分钟。

[0363] 在一些实施方案中,室的空腔中的气体(如空气)从室中排出。在一些实施方案中,气体(如空气)被排出到容器,所述容器作为封闭系统的一部分与离心室可操作地连接。在一些实施方案中,容器是自由或空的容器。在一些实施方案中,室的空腔中的空气(如气体)通过过滤器排出,所述过滤器经由无菌管组线可操作地连接到室的内部空腔。在一些实施方案中,使用手动、半自动或自动过程排出空气。在一些实施方案中,在从室的空腔中输送(express)含有孵育的细胞和病毒载体颗粒(例如已经开始转导的细胞或已经用病毒载体转导的细胞)的输出组合物之前、同时、间歇或随后将空气从空腔中排出。

[0364] 在一些实施方案中,将转导和/或其他孵育作为连续或半连续过程或作为其一部分进行。在一些实施方案中,连续过程涉及连续摄入细胞和病毒载体颗粒,例如转导组合物(作为单一预先存在的组合物,或者通过连续拉入同一的容器(例如空腔)中,并且从而混合其部分),和/或在孵育的至少一部分期间(例如,在离心的同时),从容器中连续输送或排出液体,以及可选地排出气体(例如空气)。在一些实施方案中,至少部分同时进行连续摄入和连续输送。在一些实施方案中,连续摄入发生在部分孵育期间,例如在部分离心期间,并且连续输送发生在孵育的单独部分期间。两者可以交替。因此,在进行孵育的同时,连续摄入和输送可以允许更大的总体积的样品被处理,例如被转导。

[0365] 在一些实施方案中,孵育是连续过程的一部分,所述方法包括在孵育的至少一部分期间,实现在室旋转期间以及在部分孵育期间将所述转导组合物连续摄入空腔中,实现在室的旋转期间通过至少一个开口从空腔中连续输送液体,任选地排出气体(例如空气)。

[0366] 在一些实施方案中,通过在以下之间交替进行半连续孵育:实现将组合物摄入空腔中,孵育,从空腔中输送液体和任选地从空腔中排出气体(例如空气)例如到输出容器,并且然后摄入含有更多细胞和用于处理的其他试剂(例如病毒载体颗粒)的后续(例如第二、第三等)组合物,并重复所述过程。例如,在一些实施方案中,孵育是半连续过程的一部分,所述方法包括在孵育之前,实现通过所述至少一个开口将转导组合物摄入空腔中,并在孵育之后,实现从空腔中输送流体;实现将包含细胞和病毒载体颗粒的另一种转导组合物摄入所述内部空腔中;并且在将所述另一种转导组合物中的所述细胞用所述载体转导的条件下在所述内部空腔中孵育所述另一种转导组合物。所述过程能以迭代的方式继续进行许多

另外的回合。在此方面,半连续或连续方法可以允许产生甚至更大体积和/或数量的细胞。

[0367] 在一些实施方案中,转导孵育的一部分是在离心室中进行,其在包括旋转或离心的条件下进行。

[0368] 在一些实施方案中,所述方法包括孵育,其中细胞和病毒载体颗粒的孵育的另外的部分是在没有旋转或离心的情况下进行,这通常是在至少一部分孵育之后进行,所述至少一部分孵育包括室的旋转或离心。在一些此类实施方案中,进一步孵育是在一定条件下实现,以使病毒载体整合到一个或多个细胞的宿主基因组中。评估或确定孵育是否已经导致病毒载体颗粒整合到宿主基因组中,并且因此凭经验确定进一步孵育的条件是在技术人员的水平内。在一些实施方案中,可以通过测量在孵育后由病毒载体颗粒基因组中含有的核酸编码的重组蛋白(如异源蛋白)的表达水平来评估病毒载体在宿主基因组中的整合。可以使用多种熟知方法来评价重组分子的表达水平,例如在细胞表面蛋白的情况下,例如通过基于亲和力的方法(例如基于免疫亲和力的方法)来检测,例如通过流式细胞术进行。在一些例子中,通过检测转导标记和/或报道基因构建体来测量表达。在一些实施方案中,编码截短的表面蛋白的核酸包括在载体内并用作其表达和/或增强的标记。

[0369] 在一些实施方案中,可以使含有细胞和病毒颗粒的组合物旋转,通常以相对较低的力或速度旋转,例如速度低于用于沉淀细胞的速度,例如从为或约600rpm至为或约1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm)。在一些实施方案中,旋转是以为或为约100g至3200g(例如,为或为约或至少或至少约100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g或3200g)的力(例如,相对离心力)来进行,如例如在室或空腔的内壁或外壁处所测量。术语“相对离心力”或RCF通常被理解为在如与旋转轴相比在空间的特定点处,相对于地球的重力,施加在物体或物质(例如细胞、样品或团粒和/或所旋转的室或其他容器中的点)上的有效力。所述值可以使用熟知的公式来确定,所述公式考虑到重力、旋转速度和旋转半径(与旋转轴的距离以及测量RCF的物体、物质或颗粒)。

[0370] 在某些实施方案中,将含有细胞和病毒颗粒的组合物旋转的持续时间为大于或约5分钟、大于或约10分钟、大于或约15分钟、大于或约20分钟、大于或约30分钟、大于或约45分钟、大于或约60分钟、大于或约90分钟、或大于或约120分钟;或者在或在约5分钟与120分钟之间、30分钟与90分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间、或45分钟与60分钟之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,将组合物旋转持续或持续约60分钟。

[0371] 在某些实施方案中,在工程化(例如转导或转染)期间以小于或小于约 1×10^7 个细胞/mL、 9×10^6 个细胞/mL、 8×10^6 个细胞/mL、 7×10^6 个细胞/mL、 6×10^6 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/mL、 4×10^6 个细胞/mL、or 3×10^6 个细胞/mL的密度培养细胞(例如刺激的细胞)。在一些实施方案中,使细胞以在为或约 1×10^3 个细胞/mL与为或约 1×10^9 个细胞/mL、为或约 1×10^4 个细胞/mL与为或约 1×10^8 个细胞/mL、为或约 1×10^5 个细胞/mL与为或约 1×10^7 个细胞/mL、或为或约 5×10^5 个细胞/mL与为或约 1×10^7 个细胞/mL之间的密度经历工程化。在特定实施方案中,使细胞以为或为约 5×10^5 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 2×10^6 个细胞/mL、 3×10^6 个细胞/mL、 4×10^6 个细胞/mL、or 5×10^6 个细胞/mL的密度经历工程化。在特定实施方案中,使细胞以为或为约 1×10^6 个细胞/mL的密度经历工程化。在某些实施方案中,旋转(例如旋转含有细胞和病毒颗粒的组合物)之后培养细胞。在某些实施方案中,已经将细胞与病毒

颗粒一起旋转。

[0372] 在一些实施方案中,将细胞工程化包括与载体(例如非病毒载体的病毒载体)一起培养、接触或一起孵育。在某些实施方案中,将细胞与载体一起培养、接触和/或一起孵育进行、进行约、或进行至少4小时、6小时、8小时、12小时、16小时、18小时、24小时、30小时、36小时、40小时、48小时、54小时、60小时、72小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、或7天或超过7天。在一些实施方案中,在基因工程化之前将细胞与载体一起培养、接触和/或一起孵育进行以下的时间量:在30分钟与2小时之间、在1小时与8小时之间、在6小时与12小时之间、在12小时与18小时之间、在16小时与24小时之间、在18小时与30小时之间、在24小时与48小时之间、在24小时与72小时之间、在42小时与54小时之间、在60小时与120小时之间、在96小时与120小时之间、在90小时和在1天与7天之间、在3天与8天之间、在1天与3天之间、在4天与6天之间、或在4天与5天之间。在一些实施方案中,将细胞与载体一起培养、接触和/或一起孵育,持续或持续约在18小时与30小时之间。在特定实施方案中,将细胞与载体一起培养、接触和/或一起孵育,持续或持续约24小时。

[0373] 在一些实施方案中,在基因工程的至少一部分(例如转导)期间,和/或在基因工程之后,将细胞转移到生物反应器袋组件中,用于培养经基因工程化的细胞,例如用于培育或扩增细胞,如上所述。

[0374] 在特定实施方案中,在一种或多种细胞因子的存在下使细胞经历工程化。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素7(IL-7)、白细胞介素9(IL-9)、白细胞介素12(IL-12)、白细胞介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括重组IL-2。

[0375] 在一些实施方案中,在一种或多种细胞因子(例如重组人细胞因子)的存在下,以在为或约1IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约250IU/mL与为或约500IU/mL之间、或在为或约500IU/mL与为或约1,000IU/mL之间的浓度,使细胞(例如受刺激的细胞)经历工程化,例如转导或转染。

[0376] 在一些实施方案中,在IL-2(例如人重组IL-2)的存在下,以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约150IU/mL之间、在为或约75IU/mL与为或约125IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、或在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间的浓度,使细胞(例如受刺激的细胞)经历工程化,例如转染或转导。在特定实施方案中,将细胞(例如受刺激的细胞和/或受刺激的细胞组合物的细胞)与重组IL-2以为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、

130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL、或100IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中,在例如为或约100IU/mL的重组IL-2(例如人重组IL-2)的存在下孵育细胞(例如受刺激的细胞)。

[0377] 在一些实施方案中,在IL-7(例如人重组IL-7)的存在下,以在为或约100IU/mL与为或约2,000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、或在为或约500IU/mL与为或约700IU/mL之间的浓度,使细胞(例如受刺激的细胞)经历工程化,例如转染或转导。在特定实施方案中,用IL-7,以为或为约50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、或1,000IU/mL的浓度,对细胞(例如受刺激的细胞)进行工程化,例如转导或转染。在特定实施方案中,在例如为或为约600IU/mL的IL-7的存在下孵育细胞,例如受刺激的细胞。

[0378] 在某些实施方案中,在IL-15(例如人重组IL-15)的存在下,以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约150IU/mL之间、在为或约75IU/mL与为或约125IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、或在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间的浓度,使细胞(例如受刺激的细胞)经历工程化,例如转染或转导。在一些实施方案中,将细胞(例如受刺激的细胞和/或受刺激的细胞组合物的细胞)与重组IL-15以为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL、或100IU/mL的浓度一起孵育。在特定实施方案中,在例如为或约100IU/mL的重组IL-15(例如人重组IL-15)的存在下孵育细胞(例如受刺激的细胞)。

[0379] 在特定实施方案中,使细胞(例如受刺激的细胞)在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下在刺激条件下经历工程化。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下在刺激条件下使细胞经历工程化,例如转导或转染。

[0380] 在一些实施方案中,所提供的方法与将含有编码重组受体的多核苷酸的病毒载体转导到少于 300×10^6 个细胞(例如受刺激细胞组合物的细胞)中一起使用。在某些实施方案中,转导了为或约 100×10^6 个细胞,例如受刺激的细胞组合物的细胞。在某些实施方案中,细胞是活细胞。在一些实施方案中,在无血清培养基中进行转导。在一些实施方案中,在IL-2、IL-7和IL-15的存在下进行转导。在特定实施方案中,细胞(例如受刺激的细胞组合物的细胞)含有至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、或至少或至少约95%的是CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。在一些实施方案中,将转导进行持续24与48小时之间、36与12小时之间、18与30小时之间,或者进行或进行约24小时。在某些实施方案中,在孵育(例如在刺激条件下孵育)的起始或开始的两天内、36小时内或30小时内开始转导步骤。

[0381] 1. 用于转导的病毒载体颗粒的制备

[0382] 病毒载体基因组通常以质粒形式构建,其可以转染到包装细胞系或生产细胞系中。在任何此类例子中,将编码重组蛋白(如重组受体)的核酸插入或定位在病毒载体的区域中,例如通常在病毒基因组的非必需区域中。在一些实施方案中,将核酸插入病毒基因组的某些病毒序列的位置中以产生具有复制缺陷的病毒。

[0383] 可以使用多种已知方法中的任何一种来产生逆转录病毒颗粒,其基因组含有病毒载体基因组的RNA拷贝。在一些实施方案中,至少两种组分参与制备基于病毒的基因传递系统:第一,包装质粒,包括结构蛋白以及生成病毒载体颗粒所必需的酶,第二,病毒载体本身,即,要转移的遗传物质。可以在设计这些组分中的一个或两个时引入生物安全保护措施。

[0384] 在一些实施方案中,包装质粒可以含有除了包膜蛋白以外的所有逆转录病毒(如HIV-1)蛋白(Naldini等人,1998)。在其他实施方案中,病毒载体可能缺乏另外的病毒基因(例如与毒力有关的那些,例如vpr、vif、vpu和nef)和/或Tat(HIV的主要反式激活因子)。在一些实施方案中,慢病毒载体(例如基于HIV的慢病毒载体)仅包含三种亲本病毒的基因:gag、pol和rev,这减少或消除了野生型病毒通过重组而重构的可能性。

[0385] 在一些实施方案中,将病毒载体基因组引入包装细胞系中,所述细胞系含有将从病毒载体基因组转录的病毒基因组RNA包装至病毒颗粒中所需的所有组分。可替代地,除了一种或多种目标序列(例如重组核酸)以外,病毒载体基因组可包含一种或多种编码病毒组分的基因。然而,在一些方面,为了防止基因组在靶细胞中复制,将复制所需的内源病毒基因去除,并在包装细胞系中单独提供。

[0386] 在一些实施方案中,用一种或多种含有生成所述颗粒所需组分的质粒载体转染包装细胞系。在一些实施方案中,用含有病毒载体基因组(包括LTR、顺式作用包装序列和目标序列,即编码抗原受体(例如CAR)的核酸)的质粒;以及编码病毒酶和/或结构组分(例如Gag、pol和/或rev)的一种或多种辅助质粒转染包装细胞系。在一些实施方案中,利用多种载体分离生成逆转录病毒载体颗粒的各种遗传组分。在一些此类实施方案中,向包装细胞提供单独的载体减少了重组事件的可能性,否则可能生成有复制能力的病毒。在一些实施方案中,可以使用具有所有逆转录病毒组分的单个质粒载体。

[0387] 在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(例如慢病毒载体颗粒)假型化以增加宿主细胞的转导效率。例如,在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(例如慢病毒载体颗粒)用VSV-G糖蛋白假型化,其提供宽细胞宿主范围,从而扩展可以转导的细胞类型。在一些实施方案中,用编码非天然包膜糖蛋白的质粒或多核苷酸转染包装细胞系,以例如包括嗜异性,多嗜性或双嗜性包膜,例如辛德毕斯病毒(Sindbis virus)包膜、GALV或VSV-G。

[0388] 在一些实施方案中,包装细胞系提供将病毒基因组RNA包装至慢病毒载体颗粒中反式作用所需的组分,包括病毒调节蛋白和结构蛋白。在一些实施方案中,包装细胞系可以是能够表达慢病毒蛋白并产生功能性慢病毒载体颗粒的任何细胞系。在一些方面,合适的包装细胞系包括293(ATCC CCL X)、293T、HeLa(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL-10)和Cf2Th(ATCC CRL 1430)细胞。

[0389] 在一些实施方案中,包装细胞系稳定地表达一种或多种病毒蛋白质。例如,在一些方面,可以构建含有gag、pol、rev和/或其他结构基因但不含LTR和包装组分的包装细胞系。在一些实施方案中,可以用编码一种或多种病毒蛋白的核酸分子以及含有编码异源蛋白的

核酸分子的病毒载体基因组和/或编码包膜糖蛋白的核酸对包装细胞系进行瞬时转染。

[0390] 在一些实施方案中,将病毒载体和包装质粒和/或辅助质粒通过转染或感染引入包装细胞系中。包装细胞系产生含有病毒载体基因组的病毒载体颗粒。用于转染或感染的方法是熟知的。非限制性例子包括磷酸钙、DEAE-葡聚糖和脂质转染方法、电穿孔和显微注射。

[0391] 在将重组质粒和逆转录病毒LTR和包装序列引入特殊细胞系(例如,通过磷酸钙沉淀)中时,包装序列可以允许待包装至病毒颗粒中的重组质粒的RNA转录,然后所述病毒颗粒可能会被分泌到培养基中。在一些实施方案中,然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选地将其浓缩,并用于基因转移。例如,在一些方面,在将包装质粒和转移载体共转染至包装细胞系后,从培养基回收病毒载体颗粒,并通过本领域技术人员使用的标准方法进行滴定。

[0392] 在一些实施方案中,可以通过引入质粒以允许产生慢病毒颗粒,而在包装细胞系(例如示例性HEK 293T细胞系)中产生逆转录病毒载体,例如慢病毒载体。在一些实施方案中,包装细胞被转染和/或含有编码gag和pol的多核苷酸,以及编码重组受体(例如抗原受体,例如CAR)的多核苷酸。在一些实施方案中,包装细胞系被任选地和/或另外用编码rev蛋白的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些实施方案中,包装细胞系被任选地和/或另外用编码非天然包膜糖蛋白(例如VSV-G)的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些此类实施方案中,在转染细胞(例如,HEK 293T细胞)后大约两天,细胞上清液含有可以回收并滴定的重组慢病毒载体。

[0393] 所回收和/或产生的逆转录病毒载体颗粒可以用于使用如所述的方法转导靶细胞。一旦进入靶细胞中,病毒RNA就被逆转录,进入细胞核中并稳定整合到宿主基因组中。在病毒RNA整合后一天或两天,可以检测到重组蛋白(例如抗原受体,例如CAR)的表达。

[0394] 2. 非病毒载体

[0395] 在一些实施方案中,通过电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见例如Chicaybam等人,(2013) PLoS ONE 8(3):e60298;和Van Tedeloo等人(2000) Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,通过转座将重组核酸转移到T细胞中(参见例如Manuri等人(2010) Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013) Molec Ther Nucl Acids 2,e74;以及Huang等人(2009) Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如在Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, N.Y.中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进的微粒轰击(Johnston, Nature, 346:776-777 (1990));以及磷酸锶DNA共沉淀(Brash等人, Mol. Cell Biol., 7:2031-2034 (1987))。

[0396] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是例如国际专利申请公开号W0 2014055668和美国专利号7,446,190中描述的那些。

[0397] 在一些实施方案中,将重组核酸经由转座子转移到T细胞中。转座子(转座元件)是可以从基因组内的一个基因座移动到另一个基因座的DNA可移动区段。这些元件经由保守的“剪切粘贴”机制移动:转座酶催化转座子从其原始位置切除,并促进其在基因组中的其他位置的重新整合。如果转座酶是由另一个转座酶基因提供,则可以移动缺乏转座酶的元件。因此,可以将转座子用于将外来DNA掺入宿主基因组中而无需使用病毒转导系统。适合

于与哺乳动物细胞(例如人原代白细胞)一起使用的转座子的例子包括但不限于睡美人(Sleeping Beauty)和Piggybac。

[0398] 基于转座子的转染是由转座酶和转座子组成的两组分系统。在一些实施方案中,将包含转座子的系统工程化成包含外来DNA(本文也称为货物DNA)(例如编码重组受体的基因),其侧翼为由伴随的转座酶识别的反向重复/正向重复(IR/DR)序列。在一些实施方案中,非病毒质粒编码在启动子的控制下的转座酶。将质粒转染到宿主细胞中导致转座酶的瞬时表达,因此对于转染后的最初时期,转座酶以足以将转座子整合到基因组DNA中的水平表达。在一些实施方案中,转座酶本身不整合到基因组DNA中,并且因此转座酶的表达随时间推移降低。在一些实施方案中,转座酶表达由宿主细胞以足以使对应转座子整合持续以下时间的水平表达:少于约4小时、少于约8小时、少于约12小时、少于约24小时、少于约2天、少于约3天、少于约4天、少于约5天、少于约6天、少于约7天、少于约2周、少于约3周、少于约4周、少于约周、或少于约8周。在一些实施方案中,引入宿主基因组中的货物DNA随后不会从宿主基因组中除去,至少是因为宿主不表达能够切除货物DNA的内源转座酶。

[0399] 睡美人(SB)是转座子的Tc/1-水手超家族的合成成员,是由鲑科鱼基因组中具有休眠元件重新构建的。基于SB转座子的转染是一个由转座酶和转座子组成的两组分系统,所述转座子含有导致精确整合到TA二核苷酸中的反向重复/正向重复(IR/DR)序列。将转座子设计成具有侧翼为IR/DR的目标表达盒。SB转座酶结合位于睡美人转座子IR上的特异性结合位点。SB转座酶介导转座子的整合,所述转座子是编码货物序列的可移动元件,在所述货物序列的两侧都侧接着具有催化性酶(SB)结合位点的反向末端重复序列。当SB通过剪切粘贴机制将基因序列在TA靶二核苷酸处插入脊椎动物染色体中时,获得稳定的表达。已将此系统用于工程化各种脊椎动物细胞类型,包括人原代外周血白细胞。在一些实施方案中,将细胞与SB转座子接触、与SB转座子一起孵育和/或用SB转座子处理,所述SB转座子包含货物基因(例如编码重组受体或CAR的基因),所述货物基因的侧翼为SB IR序列。在特定实施方案中,将待转染的细胞与包含SB转座子的质粒接触、与包含SB转座子的质粒一起孵育、和/或用包含SB转座子的质粒处理,所述SB转座子包含货物基因(例如编码CAR的基因),所述货物基因的侧翼为SB IR序列。在某些实施方案中,所述质粒还包含侧翼没有SB IR序列的编码SB转座酶的基因。

[0400] PiggyBac(PB)是可以用于将货物DNA整合到宿主(例如人)的基因组DNA中的另一种转座子系统。PB转座酶识别位于转座子两个末端的PB转座子特异性反向末端重复序列(ITR),并且高效地将内容物从原始位点移出并将所述内容物高效地整合到TTAA染色体位点中。PB转座子系统使得能够将PB载体中两个ITR之间的目标基因移动到靶基因组中。已将PB系统用于工程化各种脊椎动物细胞类型,包括人原代细胞。在一些实施方案中,将待转染的细胞与PB转座子接触、与PB转座子一起孵育、和/或用PB转座子处理,所述PB转座子包含货物基因(例如编码CAR的基因),所述货物基因的侧翼为PB IR序列。在特定实施方案中,将待转染的细胞与包含PB转座子的质粒接触、与包含PB转座子的质粒一起孵育、和/或用包含PB转座子的质粒处理,所述PB转座子包含货物基因(例如编码CAR的基因),所述货物基因的侧翼为PB IR序列。在某些实施方案中,所述质粒还包含侧翼没有PB IR序列的编码SB转座酶的基因。

[0401] 在一些实施方案中,可以通过限制酶切割、连接和分子克隆的标准方法来产生用

于主题方法中的转座子/转座酶的各种元件,例如一种或多种SB或PB载体。用于构建主题载体的一种方案包括以下步骤。首先,用限制性核酸内切酶从初始来源(例如包含转座酶基因的载体)切割经纯化的核酸片段,所述核酸片段含有所需组分核苷酸序列以及外来序列。然后使用常规分离方法(例如通过琼脂糖凝胶电泳)将含有所需核苷酸序列的片段与不同大小的不需要片段分离。将所需片段从凝胶上切下,并以适当的构型连接在一起,从而产生含有所需序列(例如如上所述的与主题载体的各种元件对应的序列)的环状核酸或质粒。然后,在需要的情况下,在原核宿主(例如大肠杆菌)中扩增如此构建的环状分子。这些步骤中涉及的切割、质粒构建、细胞转化和质粒生产的程序对本领域技术人员而言是熟知的,并且限制性酶切和连接所需的酶可商购获得。(参见例如,R.Wu编辑,Methods in Enzymology,第68卷,Academic Press,N.Y. (1979);T.Maniatis,E.F.Fritsch和J.Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1982);目录号1982-83,New England Biolabs,Inc.;目录号1982-83,Bethesda Research Laboratories,Inc.在下文实验章节提供了如何构建在主题方法中使用的载体的例子。在WO 98/40510和WO 99/25817中也披露了代表性的“睡美人”转座子系统的制备)。

[0402] 在一些实施方案中,用包含转座酶基因的质粒和包含转座子的质粒进行用转座子的转导,所述转座子含有侧翼为由转座酶识别的反向重复/正向重复(IR/DR)序列的货物DNA序列。在某些实施方案中,货物DNA序列编码异源蛋白质,例如重组T细胞受体或CAR。在一些实施方案中,质粒包含转座酶和转座子。在一些实施方案中,转座酶在遍在启动子或适合于驱动转座酶在靶细胞中表达的任何启动子的控制下。遍在启动子包括但不限于EF1a、CMB、SV40、PGK1、Ubc、人 β -肌动蛋白、CAG、TRE、UAS、Ac5、CaMKIIa和U6。在一些实施方案中,货物DNA包含选择盒,所述选择盒允许选择将货物DNA稳定整合到基因组DNA中的细胞。合适的选择盒包括但不限于编码以下的选择盒:卡那霉素抗性基因、壮观霉素抗性基因、链霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因、羧苄青霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、博来霉素抗性基因、红霉素抗性基因和多粘菌素B抗性基因。

[0403] 在一些实施方案中,将用于用转座子转导的组分(例如包含SB转座酶和SB转座子的质粒)引入靶细胞中。可以采用任何方便的方案,其中取决于靶细胞的位置,所述方案可以将系统组分体外或体内引入靶细胞中。例如,在靶细胞是分离的细胞的情况下,可以例如通过使用标准转化技术,在容许靶细胞活力的细胞培养条件下将所述系统直接引入所述细胞中。此类技术包括但不必限于:病毒感染、转化、缀合、原生质体融合、电穿孔、粒子枪技术、磷酸钙沉淀、直接显微注射、病毒载体递送等。方法的选择通常取决于待转化的细胞的类型和发生转化的环境(即体外、离体或体内)。这些方法的一般性讨论可以在Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology,第3版,Wiley&Sons,1995中找到。

[0404] 在一些实施方案中,在足以从携带转座子的载体上切下反向重复侧翼核酸并且随后将切下的核酸整合到靶细胞的基因组中的条件下,将SB转座子和SB转座酶来源引入多细胞生物体(例如哺乳动物或人)的靶细胞中。一些实施方案还包括确保必需的转座酶活性连同引入的转座子一起存在于靶细胞中的步骤。取决于转座子载体本身的结构,即载体是否包括编码具有转座酶活性的产物的区域,所述方法还可以包括将第二载体引入编码必需转座酶活性的靶细胞中。

[0405] 在一些实施方案中,引入细胞中的包含转座子的载体核酸的量和编码转座酶的载体核酸的量足以提供所需的将转座子核酸切下并插入靶细胞基因组中。这样,引入的载体核酸的量应提供足够量的转座酶活性和足够拷贝数的期望插入靶细胞中的核酸。引入靶细胞中的载体核酸的量取决于所采用的特定引入方案(例如所采用的特定离体给予方案)的效率而变化。

[0406] 一旦载体DNA与必需的转座酶组合进入了靶细胞,就经由所提供的转座酶从载体上切下侧翼为反向重复序列的载体核酸区域(即位于睡美人转座酶识别的反向重复序列之间的载体核酸)并将其插入靶细胞的基因组中。这样,载体DNA被引入靶细胞中后进行随后的转座酶介导的切除,并且由载体携带的外来核酸插入靶细胞的基因组中。在特定实施方案中,将载体整合到至少或至少约1%、至少或至少约2%、至少或至少约3%、至少或至少约4%、至少或至少约5%、至少或至少约6%、至少或至少约7%、至少或至少约8%、至少或至少约9%、至少或至少约10%、至少或至少约15%、或至少或至少约20%的用SB转座子和/或SB转座酶转染的细胞的基因组中。在一些实施方案中,核酸整合到靶细胞基因组中是稳定的,即,载体核酸保持存在于靶细胞基因组中持续超过瞬时时间段,并且一部分染色体遗传物质传递到靶细胞的后代。

[0407] 在某些实施方案中,转座子用于将各种大小的核酸(即多核苷酸)整合到靶细胞基因组中。在一些实施方案中,使用主题方法插入靶细胞基因组中的DNA的大小范围为从为或约0.1kb至为或约200kb、从为或约0.5kb至为或约100kb、从为或约1.0kb至为或约8.0kb、从为或约1.0至为或约200kb、从为或约1.0至为或约10kb、从为或约10kb至为或约50kb、从为或约50kb至为或约100kb、或从为或约100kb至为或约200kb。在一些实施方案中,使用主题方法插入靶细胞基因组中的DNA的大小范围是从为或约1.0kb至为或约8.0kb。在一些实施方案中,使用主题方法插入靶细胞基因组中的DNA大小的范围为从为或约1.0kb至为或约200kb。在特定实施方案中,使用主题方法插入靶细胞基因组中的DNA大小的范围为从为或约1.0kb至为或约8.0kb。

[0408] D. 培育和/或扩增细胞

[0409] 在一些实施方案中,所提供的方法包括用于培育细胞(例如通过在促进增殖和/或扩增的条件下培育细胞)的一个或多个步骤。在一些实施方案中,在将细胞进行基因工程化(例如通过转导或转染将重组多肽引入细胞中)之后,在促进增殖和/或扩增的条件下培育细胞(例如工程化的CD4⁺和CD8⁺T细胞)。在特定实施方案中,在已经在刺激条件下孵育细胞之后和/或在已经用重组多核苷酸(例如编码重组受体的多核苷酸)转导或转染细胞之后培育细胞。在一些实施方案中,培育产生培育的细胞。在某些实施方案中,培育产生培育的组合物,例如培育的细胞的组合物。在一些实施方案中,所述一个或多个处理步骤包括刺激分离的细胞(例如选择的细胞群)的步骤。孵育可以是在基因工程化之前或与其结合,所述基因工程化例如是由本文(例如在章节I-C中)所述的转导方法的实施方案引起的基因工程化。在一些实施方案中,刺激导致细胞的激活和/或增殖,例如在转导之前。

[0410] 在某些实施方案中,在例如通过本文(例如章节I-E)提供的方法收集和配制细胞之前,例如在促进扩增和/或增殖的条件下培育细胞和/或工程化T细胞的组合物。在特定实施方案中,在例如通过本文(例如在章节I-C中)提供的任何方法已经将细胞工程化、转导和/或转染之后培育细胞。在特定实施方案中,先前已经将工程化组合物低温冷冻并储存,

并在培育之前解冻。

[0411] 在某些实施方案中,培育细胞组合物。在特定实施方案中,组合物中的细胞的约或至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%是T CD3+细胞。在某些实施方案中,组合物中的细胞的约或至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%是CD4+或CD8+T细胞。

[0412] 在一些实施方案中,培育至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约90%、或至少或至少约95%的经历或已经经历工程化、转染和/或转导的细胞。在特定实施方案中,培育经历或已经经历工程化、转染和/或转导的细胞的全部或约全部。

[0413] 在一些实施方案中,在为、为约、或为至少100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、1,000mL、1,200mL、1,400mL、1,600mL、1,800mL、2,000mL、2,200mL、或2,400mL的体积的培养基中培育细胞(例如工程化细胞)。在一些实施方案中,以初始体积培育细胞,所述初始体积稍后被调节至不同的体积。在特定实施方案中,所述体积稍后在培育期间被调节。在特定实施方案中,所述体积从培育期间的初始体积增加。在某些实施方案中,当细胞在培育期间实现密度时,所述体积被增加。在某些实施方案中,初始体积为或为约500mL。

[0414] 在特定实施方案中,当细胞在培育期间实现密度或浓度时,所述体积从初始体积增加。在特定实施方案中,当细胞实现为、约或至少或至少约 0.1×10^6 个细胞/mL、 0.2×10^6 个细胞/mL、 0.4×10^6 个细胞/mL、 0.6×10^6 个细胞/mL、 0.8×10^6 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 1.2×10^6 个细胞/mL、 1.4×10^6 个细胞/mL、 1.6×10^6 个细胞/mL、 1.8×10^6 个细胞/mL、 2.0×10^6 个细胞/mL、 2.5×10^6 个细胞/mL、 3.0×10^6 个细胞/mL、 3.5×10^6 个细胞/mL、 4.0×10^6 个细胞/mL、 4.5×10^6 个细胞/mL、 5.0×10^6 个细胞/mL、 6×10^6 个细胞/mL、 8×10^6 个细胞/mL、或 10×10^6 个细胞/mL的密度和/或浓度时,所述体积被增加。在一些实施方案中,密度和/或浓度是培养物中活细胞的。在一些实施方案中,当细胞实现为、至少或约 0.6×10^6 个细胞/mL的密度和/或浓度时,所述体积从初始体积增加。

[0415] 在一些实施方案中,细胞实现密度和/或浓度,并且所述体积被增加了、增加约、或增加至少或至少约100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、1,000mL、1,200mL、1,400mL、1,600mL、1,800mL、2,000mL、2,200mL或2,400mL。在一些实施方案中,所述体积被增加了500mL。在特定实施方案中,所述体积被增加至为、约、或至少或至少约500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、1,000mL、1,200mL、1,400mL、1,600mL、1,800mL、2,000mL、2,200mL或2,400mL的体积。在某些实施方案中,所述体积被增加至1,000mL的体积。在某些实施方案中,所述体积以每1、2、3、4、5、6、7、8、9或10分钟为、至少为或约、或约5mL、10mL、20mL、25mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、75mL、80mL、90mL、或100mL的速率被增加。在某些实施方案中,所述速率是每8分钟为或为约50mL。

[0416] 在一些实施方案中,最初以500mL的体积培育细胞(例如工程化细胞)。在特定实施

方案中,当细胞在培育期间达到 0.6×10^6 个细胞/mL的密度或浓度时,所述体积被增加至1,000mL。

[0417] 在一些实施方案中,在无血清培养基中进行培育。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,无血清培养基是受控培养基,其已经被处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,无血清培养基可含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0418] 在一些实施方案中,所提供的方法与在促进扩增和/或增殖的条件下培育细胞的步骤结合使用。此类条件包括针对以下而设计的那些条件:诱导群体中的细胞的增殖、扩增、激活和/或存活,模拟抗原暴露,和/或引发细胞用于基因工程化(如用于引入重组抗原受体)。

[0419] 在一些实施方案中,培育的条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0420] 在一些实施方案中,在培育后和/或之后从细胞中去除和/或分离刺激试剂。在某些实施方案中,在培育之后和/或后以及在配制细胞(例如配制培育的输出细胞的输出组合物)之前,从细胞中去除和/或分离刺激剂。在一些实施方案中,刺激试剂是本文(例如在章节I-B-1中)所述的刺激试剂。在特定实施方案中,如本文(例如在章节I-B-2中)所述,从细胞中去除和/或分离刺激试剂。

[0421] 所述条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0422] 在一些方面,孵育是根据多种技术来进行,例如以下文献中所述的那些技术:授予Riddell等人的美国专利号6,040,177;Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood*. 1:72-82;和/或Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0423] 在一些实施方案中,培育的至少一部分在离心室的内部空腔中例如在离心旋转下进行,如在国际公开号W02016/073602中所述。在一些实施方案中,在离心室中进行的孵育的至少一部分包括与一种或多种试剂混合以诱导刺激和/或激活。在一些实施方案中,将细胞(如所选择的细胞)与刺激条件或刺激剂在离心室中混合。在此类过程的一些方面,将一定体积的细胞与一定量的一种或多种刺激条件或刺激剂混合,所述刺激条件或刺激剂远小于在细胞培养板或其他系统中进行类似刺激时通常使用的刺激条件或刺激剂。

[0424] 在一些实施方案中,将刺激剂添加至室空腔中的细胞,所添加的量与例如在周期性振荡或旋转的管或袋中进行选择而不在离心室中混合时,实现相同数量的细胞或相同体积的细胞的大致相同或类似的选择效率通常使用或将需要的刺激剂的量相比显著较小(例如不大于所述量的5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%)。在一些实施方案中,在向细胞和刺激剂添加培育缓冲液以实现例如10mL至2,000mL,例如至少或至少约或约或10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL、200mL、300mL、400mL、

500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、1,000mL、1,200mL、1,400mL、1,600mL、1,800mL、2,000mL、2,200mL或2,400mL的目标体积的情况下进行培育。在一些实施方案中,在添加细胞之前预先混合孵育缓冲液和刺激剂。在一些实施方案中,将孵育缓冲液和刺激剂单独添加至细胞中。在一些实施方案中,在周期性温和混合条件下进行刺激孵育,这可能有助于促进能量上有利的相互作用,并且从而允许使用较少的总体刺激剂,同时实现细胞的刺激和激活。

[0425] 在一些实施方案中,孵育通常在混合条件下进行,例如在旋转的存在下,通常以相对低的力或速度旋转,例如速度低于用于使细胞沉淀的速度,例如从或从约600rpm至或至约1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm或1500rpm或1700rpm),例如在样品或室壁或其他容器壁处的一定RCF下,所述RCF为从或从约80g至100g(例如,为或约或至少80g、85g、90g、95g或100g)。在一些实施方案中,旋转是使用以这种低速旋转和之后的休息时间段的重复间隔来进行,例如旋转和/或休息1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒,例如旋转大约1或2秒,然后休息大约5、6、7或8秒。

[0426] 在一些实施方案中,例如与刺激剂一起孵育的总持续时间在或在约1小时与96小时之间、1小时与72小时之间、1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间或12小时与24小时之间,例如至少或至少约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时或72小时。在一些实施方案中,进一步孵育进行持续在或约在1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间或12小时与24小时之间的时间,包含端值。

[0427] 在特定实施方案中,在一种或多种细胞因子的存在下培育富集的T细胞的组合物。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素7(IL-7)、白细胞介素9(IL-9)、白细胞介素12(IL-12)、白细胞介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括重组IL-2。

[0428] 在一些实施方案中,在细胞因子(例如重组人细胞因子)的存在下以在为或约1IU/mL与为或约2,000IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1,000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2,000IU/mL之间、或在为或约100IU/mL与为或约1,500IU/mL之间的浓度培育细胞(例如工程化细胞)。

[0429] 在一些实施方案中,将细胞(例如工程化细胞)与IL-2(例如人重组IL-2)以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约150IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、或在为或约150IU/mL与为或约300IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起培育。在特定实施方案中,将细胞(例如输入组合物的细胞)与重组IL-2以为、为约、或至少或至少约100IU/mL、

120IU/mL、140IU/mL、160IU/mL、180IU/mL、200IU/mL、220IU/mL、240IU/mL、260IU/mL、280IU/mL、300IU/mL、320IU/mL、340IU/mL、360IU/mL、380IU/mL、或400IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中,在例如为或约200IU/mL的重组IL-2(例如人重组IL-2)的存在下培育细胞(例如输入细胞)。

[0430] 在一些实施方案中,将细胞(例如工程化细胞)与重组IL-7(例如人重组IL-7)以在为或约100IU/mL与为或约2,000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1,500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1200IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1600IU/mL之间、在为或约900IU/mL与为或约1,800IU/mL之间、或在为或约1,000IU/mL与为或约1,500IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起培育。在特定实施方案中,将细胞(例如工程化细胞)与IL-7以为、至少或至少约、或为约200IU/mL、300IU/mL、400IU/mL、500IU/mL、600IU/mL、700IU/mL、800IU/mL、900IU/mL、1,000IU/mL、1,200IU/mL、1,400IU/mL、1,600IU/mL、1,800IU/mL、2,000IU/mL、2,200IU/mL、或2,400IU/mL的浓度一起孵育。在特定实施方案中,在例如为或约1,200IU/mL的IL-7的存在下培育细胞,例如工程化细胞。

[0431] 在一些实施方案中,将细胞(例如工程化细胞)与IL-15(例如人重组IL-15)以在为或约1IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约250IU/mL之间、在为或约150IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、或在为或约150IU/mL与为或约150IU/mL之间的浓度例如在无血清培养基中一起培育。在特定实施方案中,将细胞(例如工程化组合物的细胞)与重组IL-15以为、为约、或至少或至少约100IU/mL、120IU/mL、140IU/mL、160IU/mL、180IU/mL、200IU/mL、220IU/mL、240IU/mL、260IU/mL、280IU/mL、300IU/mL、320IU/mL、340IU/mL、360IU/mL、380IU/mL、或400IU/mL的浓度一起孵育。在一些实施方案中,在例如为或约200IU/mL的重组IL-15(例如人重组IL-15)的存在下培育细胞(例如工程化T细胞)。

[0432] 在特定实施方案中,在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下例如在无血清培养基中培育细胞(例如工程化细胞和/或来自工程化组合物的细胞)。在一些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下培育细胞。

[0433] 在特定实施方案中,在封闭系统中进行培育。在某些实施方案中,在无菌条件下在封闭系统中进行培育。在特定实施方案中,在与所提供系统的一个或多个步骤相同的封闭系统中进行培育。在一些实施方案中,将富集的T细胞的组合物从封闭系统中去除并且置于用于培育的生物反应器中和/或与其连接。合适的用于培育的生物反应器的例子包括但不限于GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统和Pa11 XRS生物反应器系统。在一些实施方案中,生物反应器用于在培育步骤的至少一部分期间灌注和/或混合细胞。

[0434] 在一些实施方案中,在密闭的、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育的细胞在培育期间比没有生物反应器的情况下培育的细胞(例如在静态条件下(例如在没有混合、摇摆、运动和/或灌注的情况下)培育的细胞)经历更快的扩增。在一些实施方案中,在密闭的、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育的细胞在21天、14

天、10天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时内达到或实现阈值扩增、细胞计数、浓度和/或密度。在一些实施方案中,与在其中没有在密闭的、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育细胞的示例性和替代性过程中培育的细胞相比,在密闭的、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育的细胞达到或实现至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约100%、至少或至少约150%、至少或至少约1倍、至少或至少约2倍、至少或至少约3倍、至少或至少约4倍、至少或至少约5倍的阈值扩增、浓度、细胞计数和/或密度。

[0435] 在一些实施方案中,混合是或包括摇摆和/或运动。在一些情况下,生物反应器可以经受运动或摇摆,其在一些方面可以增加氧气传递。使生物反应器运动可以包括但不限于沿着水平轴线旋转、沿着竖直轴线旋转、沿着生物反应器的倾斜(tilted或inclined)的水平轴线的摇摆运动、或其任何组合。在一些实施方案中,在摇摆的情况下进行孵育的至少一部分。可以调节摇摆速度和摇摆角度以实现所希望的搅动。在一些实施方案中,摇摆角度为20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°或1°。在某些实施方案中,摇摆角度在6-16°之间。在其他实施方案中,摇摆角度在7-16°之间。在其他实施方案中,摇摆角度在8-12°之间。在一些实施方案中,摇摆速率为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40rpm。在一些实施方案中,摇摆速率在4rpm与12rpm之间,例如在4rpm与6rpm之间,包含端值。

[0436] 在一些实施方案中,生物反应器将温度维持在37°C或附近,并且将CO₂水平维持在5%或附近,并且稳定的空气流维持在为、为约、或至少或至少约0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min、或2.0L/min或大于2.0L/min。在某些实施方案中,例如取决于与培育起始有关的时间安排和/或培育细胞的密度,培育的至少一部分是在灌注的情况下(例如以750mL/天和/或1500mL/天的速率)进行的。在一些实施方案中,在摇摆运动(例如以在5°与10°之间(如6°)的角度,以恒定摇摆速度(例如在5RPM与15RPM之间(如6RPM或10RPM)的速度))的情况下进行细胞培养物扩增的至少一部分。

[0437] 在一些实施方案中,培育步骤的所述至少一部分是在恒定灌注(例如在缓慢的稳定速率下的灌注)下进行。在一些实施方案中,灌注是或包括液体(例如用过的培养基)的流出和新鲜培养基的流入。在某些实施方案中,灌注用新鲜培养基替代用过的培养基。在一些实施方案中,培育的至少一部分是在灌注下以为或约或至少为或约100mL/天、200mL/天、250mL/天、275mL/天、290mL/天、300mL/天、350mL/天、400mL/天、450mL/天、500mL/天、550mL/天、575mL/天、580mL/天、600mL/天、650mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、850mL/天、900mL/天、950mL/天、1000mL/天、1100mL/天、1160mL/天、1200mL/天、1400mL/天、1500mL/天、1600mL/天、1800mL/天、2000mL/天、2200mL/天、或2400mL/天的稳定速率进行。

[0438] 在特定实施方案中,在没有灌注的条件下起始培育,并且在设定和/或预定的时间量(例如在培育起始或开始后为或约或至少12小时、24小时、36小时、48小时、60小时、或72小时或超过72小时)之后起始灌注。在特定实施方案中,当细胞的密度或浓度达到设定或预定的密度或浓度时起始灌注。在一些实施方案中,当培育的细胞达到为、约、或至少或至少

约 0.1×10^6 个细胞/mL、 0.2×10^6 个细胞/mL、 0.4×10^6 个细胞/mL、 0.6×10^6 个细胞/mL、 0.8×10^6 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 1.2×10^6 个细胞/mL、 1.4×10^6 个细胞/mL、 1.6×10^6 个细胞/mL、 1.8×10^6 个细胞/mL、 2.0×10^6 个细胞/mL、 2.5×10^6 个细胞/mL、 3.0×10^6 个细胞/mL、 3.5×10^6 个细胞/mL、 4.0×10^6 个细胞/mL、 4.5×10^6 个细胞/mL、 5.0×10^6 个细胞/mL、 6×10^6 个细胞/mL、 8×10^6 个细胞/mL、或 10×10^6 个细胞/mL、或其活细胞的密度或浓度时,起始灌注。

[0439] 在特定实施方案中,在培育期间以不同的速度进行灌注。例如,在一些实施方案中,当灌注的速率取决于培育细胞的密度和/或浓度时。在某些实施方案中,当细胞达到设定的或预定的密度或浓度时,灌注速率增加。在培育期间,灌注速率可以改变(例如,从一个稳定的灌注速率改变为增加的稳定灌注速率)一次、两次、三次、四次、五次、超过五次、超过十次、超过15次、超过20次、超过25次、超过50次或超过100次。在一些实施方案中,当细胞达到为、约、或至少或至少约 0.6×10^6 个细胞/mL、 0.8×10^6 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 1.2×10^6 个细胞/mL、 1.4×10^6 个细胞/mL、 1.6×10^6 个细胞/mL、 1.8×10^6 个细胞/mL、 2.0×10^6 个细胞/mL、 2.5×10^6 个细胞/mL、 3.0×10^6 个细胞/mL、 3.5×10^6 个细胞/mL、 4.0×10^6 个细胞/mL、 4.5×10^6 个细胞/mL、 5.0×10^6 个细胞/mL、 6×10^6 个细胞/mL、 8×10^6 个细胞/mL、或 10×10^6 个细胞/mL、或其活细胞的设定或预定细胞密度或浓度时,稳定灌注速率增加。

[0440] 在一些实施方案中,在没有灌注的条件下起始培育,并且当细胞的密度或浓度达到设定或预定的密度或浓度时起始灌注。在一些实施方案中,当细胞的密度或浓度达到设定或预定的密度或浓度时,以为、约、或至少或至少约100mL/天、200mL/天、250mL/天、275mL/天、290mL/天、300mL/天、350mL/天、400mL/天、450mL/天、500mL/天、550mL/天、575mL/天、580mL/天、600mL/天、650mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、850mL/天、900mL/天、950mL/天、1000mL/天、1100mL/天、1160mL/天、1200mL/天、1400mL/天、1600mL/天、1800mL/天、2000mL/天、2200mL/天、或2400mL/天的速率起始灌注。在一些实施方案中,当培育的细胞达到为、约、或至少或至少约 0.1×10^6 个细胞/mL、 0.2×10^6 个细胞/mL、 0.4×10^6 个细胞/mL、 0.6×10^6 个细胞/mL、 0.8×10^6 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 1.2×10^6 个细胞/mL、 1.4×10^6 个细胞/mL、 1.6×10^6 个细胞/mL、 1.8×10^6 个细胞/mL、 2.0×10^6 个细胞/mL、 2.5×10^6 个细胞/mL、 3.0×10^6 个细胞/mL、 3.5×10^6 个细胞/mL、 4.0×10^6 个细胞/mL、 4.5×10^6 个细胞/mL、 5.0×10^6 个细胞/mL、 6×10^6 个细胞/mL、 8×10^6 个细胞/mL、或 10×10^6 个细胞/mL、或其活细胞的密度或浓度时,起始灌注。在一些实施方案中,当以为、约、或至少或至少约300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、或1000mL的体积培育细胞时进行灌注。在一些实施方案中,体积是1000mL。

[0441] 在某些实施方案中,培育的至少一部分使用某一速率下的灌注进行,并且当细胞的密度或浓度达到设定或预定的密度或浓度时,将灌注速率增加至、至约、或至少或至少约100mL/天、200mL/天、250mL/天、275mL/天、290mL/天、300mL/天、350mL/天、400mL/天、450mL/天、500mL/天、550mL/天、575mL/天、580mL/天、600mL/天、650mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、850mL/天、900mL/天、950mL/天、1000mL/天、1100mL/天、1160mL/天、1200mL/天、1400mL/天、1600mL/天、1800mL/天、2000mL/天、2200mL/天、或2400mL/天。在一些实施方案中,当培育的细胞达到为、约、或至少或至少约 0.1×10^6 个细胞/mL、 0.2×10^6 个细胞/mL、 0.4×10^6 个细胞/mL、 0.6×10^6 个细胞/mL、 0.8×10^6 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL、 1.2×10^6 个细胞/mL、 1.4×10^6 个细胞/mL、 1.6×10^6 个细胞/mL、 1.8×10^6 个细胞/mL、 2.0×10^6 个细胞/mL、

2.5x10⁶个细胞/mL、3.0x10⁶个细胞/mL、3.5x10⁶个细胞/mL、4.0x10⁶个细胞/mL、4.5x10⁶个细胞/mL、5.0x10⁶个细胞/mL、6x10⁶个细胞/mL、8x10⁶个细胞/mL、或10x10⁶个细胞/mL、或其活细胞的密度或浓度时,起始灌注。

[0442] 在一些实施方案中,在某些实施方案中,在没有灌注或使用在某一速率下的灌注的条件下起始培育,并且当细胞的密度或浓度达到为、约或至少0.61x10⁶个细胞/mL时,将灌注速率增加至、至约或至少750mL/天。在某些实施方案中,当以为、约、或至少1000mL的体积培育细胞时,当细胞的密度或浓度达到为、约或至少0.61x10⁶个细胞/mL的浓度时,以为、约、或至少750mL/天的速率灌注细胞。在一些实施方案中,当细胞的密度或浓度达到为、约或至少2x10⁶个细胞/mL时,将灌注速率增加至、至约或至少1500mL/天。

[0443] 在一些方面,使用灌注(如以高灌注速率,例如,以为、约、或至少或至少约500mL/天、600mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、900mL/天、1000mL/天、1100mL/天、1200mL/天、1300mL/天、1400mL/天、1500mL/天、1600mL/天、1700mL/天、1800mL/天、1900mL/天、或2000mL/天的培育,例如通过增加和/或优化细胞的养分利用率、维持pH和/或最小化细胞废物的存在而改善细胞健康、活力、存活、增殖、扩增和/或功能。

[0444] 在一些方面,使用灌注的培育可以改善残留过程试剂的去除和/或减少。在某些实施方案中,残留过程试剂可能干扰对在过程期间或之后进行的测定、测量和/或测试的解释和/或使其复杂化。此类测定可以包括但不限于无菌性、内毒素、残留珠、病毒DNA(例如,可复制型病毒DNA)的测量;细胞计数;活力测定;细胞健康测定;和细胞活性测定。在一些实施方案中,与较低的灌注速率相比,较高的灌注速率清除更多的残留过程试剂。

[0445] 在一些实施方案中,在表面活性剂的存在下培育富集细胞的组合物。在特定实施方案中,培育组合物的细胞减少了在培育期间可能发生的、例如由于混合、摇摆、运动和/或灌注引起的剪切应力的量。在一些实施方案中,表面活性剂是或包括降低液体和/或固体的表面张力的药剂。例如,表面活性剂包括脂肪醇(例如,甾醇)、聚氧乙二醇辛基酚醚(例如Triton X-100)或聚氧乙二醇失水山梨糖醇烷基酯(例如聚山梨醇酯20、40、60)。在一些实施方案中,表面活性剂是或包括添加至其中的阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂或非离子表面活性剂。在某些实施方案中,表面活性剂选自聚山梨醇酯80(PS80)、聚山梨醇酯20(PS20)、泊洛沙姆188(P188)。在某些实施方案中,表面活性剂是泊洛沙姆,例如泊洛沙姆188。

[0446] 在某些实施方案中,在不存在表面活性剂的情况下进行培育。

[0447] 在特定实施方案中,当细胞实现阈值量、浓度和/或扩增时,培育结束。在一些实施方案中,当细胞实现阈值总细胞量(例如阈值细胞计数)时,培育结束。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少或至少约50x10⁶个细胞、100x10⁶个细胞、200x10⁶个细胞、300x10⁶个细胞、400x10⁶个细胞、600x10⁶个细胞、800x10⁶个细胞、1000x10⁶个细胞、1200x10⁶个细胞、1400x10⁶个细胞、1600x10⁶个细胞、1800x10⁶个细胞、2000x10⁶个细胞、2500x10⁶个细胞、3000x10⁶个细胞、3500x10⁶个细胞、5000x10⁶个细胞、3500x10⁶个细胞、10,000x10⁶个细胞、12,000x10⁶个细胞、15,000x10⁶个细胞或20,000x10⁶个细胞、或其活细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少3500x10⁶个细胞或5500x10⁶个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为少于约5500x10⁶个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为少于约3500x10⁶个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为少

于约 3000×10^6 个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少 2500×10^6 个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少 2000×10^6 个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少 3000×10^6 个细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数在为或约 3000×10^6 个细胞与约或为 2000×10^6 个细胞之间。在特定实施方案中,当细胞实现阈值细胞计数时,培育结束。在一些实施方案中,在实现阈值细胞计数后的为、为约6小时、12小时、24小时、36小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、或7天或更多天时,或者在为或约6小时、12小时、24小时、36小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、或7天或更多天内,培育结束。在特定实施方案中,在实现阈值细胞计数后为或为约1天时培育结束。在某些实施方案中,在实现阈值细胞计数后的在18与30小时之间培育结束。

[0448] 在特定实施方案中,当细胞实现阈值细胞密度或浓度时,培育结束。在一些实施方案中,输出组合物的阈值细胞密度或浓度为或为约或为至少或至少约 1×10^6 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/mL、 10×10^6 个细胞/mL、 15×10^6 个细胞/mL、 20×10^6 个细胞/mL、 25×10^6 个细胞/mL、 30×10^6 个细胞/mL、 35×10^6 个细胞/mL、 40×10^6 个细胞/mL、 45×10^6 个细胞/mL、 50×10^6 个细胞/mL、 55×10^6 个细胞/mL、 60×10^6 个细胞/mL、 65×10^6 个细胞/mL、 70×10^6 个细胞/mL、 75×10^6 个细胞/mL、 80×10^6 个细胞/mL、 85×10^6 个细胞/mL、 90×10^6 个细胞/mL、 95×10^6 个细胞/mL、 100×10^6 个细胞/mL、或其活细胞。在一些实施方案中,多种输出组合物的平均或中值阈值细胞密度或浓度为或为约或为至少或至少约 1×10^6 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/mL、 10×10^6 个细胞/mL、 15×10^6 个细胞/mL、 20×10^6 个细胞/mL、 25×10^6 个细胞/mL、 30×10^6 个细胞/mL、 35×10^6 个细胞/mL、 40×10^6 个细胞/mL、 45×10^6 个细胞/mL、 50×10^6 个细胞/mL、 55×10^6 个细胞/mL、 60×10^6 个细胞/mL、 65×10^6 个细胞/mL、 70×10^6 个细胞/mL、 75×10^6 个细胞/mL、 80×10^6 个细胞/mL、 85×10^6 个细胞/mL、 90×10^6 个细胞/mL、 95×10^6 个细胞/mL、 100×10^6 个细胞/mL、或其活细胞。

[0449] 在特定实施方案中,在细胞实现阈值量、浓度和/或扩增之前约一天或约24小时(例如,在细胞实现阈值细胞总量(例如阈值细胞计数)之前),细胞的总量为或为约、或为至少或至少约 50×10^6 个细胞、 100×10^6 个细胞、 200×10^6 个细胞、 300×10^6 个细胞、 400×10^6 个细胞、 600×10^6 个细胞、 800×10^6 个细胞、 1000×10^6 个细胞、 1200×10^6 个细胞、 1400×10^6 个细胞、 1600×10^6 个细胞、 1800×10^6 个细胞、 2000×10^6 个细胞、 2500×10^6 个细胞、 3000×10^6 个细胞、 3500×10^6 个细胞、 5000×10^6 个细胞、 3500×10^6 个细胞、 $10,000 \times 10^6$ 个细胞、 $12,000 \times 10^6$ 个细胞、 $15,000 \times 10^6$ 个细胞或 $20,000 \times 10^6$ 个细胞、或其活细胞。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞计数之前约一天或约24小时,细胞的总量在为或约 100×10^6 个细胞与为或约 4000×10^6 个细胞之间。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞计数之前为或约一天或者为或约24小时,细胞的总量为少于或少于约 3000×10^6 个细胞。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞计数之前为或约一天或为或约24小时,细胞的总量在为或约 500×10^6 个细胞与为或约 1500×10^6 个细胞之间。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞计数之前为或约一天或为或约24小时,细胞的总量在为或约 500×10^6 个细胞与为或约 1000×10^6 个细胞之间。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞计数之前为或约一天或为或约24小时,细胞的总量为或为约或为至少 900×10^6 个细胞。

[0450] 在特定实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少或至少约 1000×10^6 个细胞、 1200×10^6 个细胞、 1400×10^6 个细胞、 1600×10^6 个细胞、 1800×10^6 个细胞、 2000×10^6 个细胞、 2500×10^6 个细胞、 3000×10^6 个细胞、 3500×10^6 个细胞、或其活细胞,而在细胞实现阈值细胞计

数之前约一天或约24小时,细胞的总量为或为约或为至少 100×10^6 个细胞、 200×10^6 个细胞、 300×10^6 个细胞、 400×10^6 个细胞、 600×10^6 个细胞、 800×10^6 个细胞、 1000×10^6 个细胞、 1200×10^6 个细胞、 1400×10^6 个细胞、或 1600×10^6 个细胞、或其活细胞。在一些实施方案中,阈值细胞计数在为或约 2000×10^6 个细胞与为或约 3000×10^6 个细胞、或其活细胞之间,而在细胞实现阈值细胞计数之前为或约一天或为或约24小时,细胞的总量在为或约 500×10^6 个细胞与为或约 1500×10^6 个细胞、或其活细胞之间。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约 2500×10^6 个细胞或其活细胞,而在细胞实现阈值细胞计数之前约一天或约24小时,细胞的总量为或为约 900×10^6 个细胞或其活细胞。

[0451] 在一些实施方案中,将培育步骤进行使细胞实现阈值量、密度和/或扩增所需的时间量。在一些实施方案中,将培育进行或进行约、或进行少于或少于约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、2天、3天4天、5天、5.5天、6天、7天、7.5天、8天、9天、10天、1周、2周、3周或4周。在特定实施方案中,从不同的生物样品中分离、富集和/或选择的富集T细胞的多种分开的组合物的细胞实现阈值密度所需的平均时间量为、为约或为少于或少于约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、2天、3天4天、5天、6天、7天、7天、8天、9天、10天、1周、2周、3周或4周。在某些实施方案中,从不同的生物样品中分离、富集和/或选择的富集T细胞的多种分开组合物的细胞实现阈值密度所需的平均时间量为、为约或为少于或少于约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、2天、3天4天、5天、6天、7天、7天、8天、9天、10天、1周、2周、3周或4周。

[0452] 在一些实施方案中,当细胞实现约 5500×10^6 个细胞的阈值细胞总量(例如阈值细胞计数)时,培育结束,并且细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量在约6天与约7天之间或在6天与7天之间。

[0453] 在一些实施方案中,当细胞实现为或约 5500×10^6 个细胞的阈值细胞总量(例如阈值细胞计数)时,培育结束(例如,当细胞准备好以便收获时)。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞量(例如,阈值细胞计数)之前为或约一天或为或约24小时,细胞的总量为或为约 3000×10^6 个细胞。在一些实施方案中,在细胞实现为或约 5500×10^6 个细胞的阈值细胞计数之前的一天,细胞的总量为或为约 3000×10^6 个细胞。在一些实施方案中,细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量在为或约6天与为或约10天之间或在6天与10天之间,例如在为或约7天与为或约10天之间或在7天与10天之间。在一些实施方案中,细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量的中值为或为约8天或为8天。

[0454] 在一些实施方案中,当细胞实现为或约 2000×10^6 个细胞、为或约 2500×10^6 个细胞、或为或约 3000×10^6 个细胞的阈值细胞总量(例如阈值细胞计数)时,培育结束,并且细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量在为或约4天与为或约5天之间、为或约5天、或5天。在一些实施方案中,阈值细胞计数在为或约 3000×10^6 个细胞与为或约 2000×10^6 个细胞之间,并且细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量在为或约4天与为或约5天之间、为或约5天、或5天。

[0455] 在一些实施方案中,当细胞实现为或约 2500×10^6 个细胞的阈值细胞总量(例如阈值细胞计数)时,培育结束(例如,当细胞准备好以便收获时)。在一些实施方案中,在细胞实现阈值细胞量(例如,阈值细胞计数)之前为或约一天或为或约24小时,细胞的总量为或为约 900×10^6 个细胞。在一些实施方案中,在细胞实现为或约 2500×10^6 个细胞的阈值细胞计数

之前的一天,细胞的总量为或为约 900×10^6 个细胞。在一些实施方案中,细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量在为或约6天与为或约9天之间或在6天与9天之间。在一些实施方案中,细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量在为或约5天与为或约9天之间或在5天与9天之间。在一些实施方案中,细胞从培育开始起实现阈值量所需的时间量的中值为或为约7天或为7天。

[0456] 在一些实施方案中,将培育进行至少最少的时间量。在一些实施方案中,即使在最少的时间量之前实现阈值,也将培育进行至少14天、至少12天、至少10天、至少7天、至少6天、至少5天、至少4天、至少3天、至少2天、至少36小时、至少24小时、至少12小时或至少6小时。在一些实施方案中,最少时间量为、为约或为至少7天、8天、9天或10天。在某些实施方案中,最少时间量为8天。

[0457] 在某些实施方案中,将培育进行至少最少的时间量。在某些实施方案中,进行培育,直至从在刺激试剂下孵育的起始或开始起(例如从当细胞与刺激试剂接触时起;从当将细胞和/或细胞组合物(例如CD4+和CD8+细胞)混合以产生输入组合物时起)已经经过为、约或至少8天、9天、10天、11天、12天或13天。

[0458] 在某些实施方案中,培育的细胞是输出细胞。在一些实施方案中,已经培育的富集T细胞的组合物是富集T细胞的输出组合物。在特定实施方案中,已经培育的CD4+T细胞和/或CD8+T细胞是输出CD4+和/或CD8+T细胞。

[0459] 在某些实施方案中,在细胞群的为、约或至少一次、二次、三次、四次、五次、六次、八次、十次、二十次或更多次的细胞倍增(例如在培育或扩增期间发生的倍增)之前,收获细胞。在特定实施方案中,可以通过测量在不同的时间点(例如在培育或扩增过程的不同时间或阶段)在群体中的活细胞数量来计算细胞倍增的量。在特定实施方案中,可以通过将在一个时间点的活细胞的总量与在较早时间点存在的活细胞的总数量进行比较来计算细胞倍增。在某些实施方案中,在细胞群的为、约或至少一次、二次、三次、四次、五次、六次、八次、十次、二十次或更多次的细胞倍增(例如在培育或扩增期间发生的倍增)之前,完成培育或扩增。在某些方面,通过确定当开始培育或扩增时以及当完成培育或扩增时的总有核细胞数量(TNC),并且然后确定完成时的TNC除以开始时的TNC的乘积的自然对数,并且然后将乘积的所述自然对数除以2的自然对数,计算细胞倍增。

[0460] 在各种实施方案中,在输入群体的细胞已经倍增超过三倍、两倍或一倍之前的时间收集或收获细胞。在一些方面,减少在培育或扩增期间可能发生的倍增将在一些实施方案中增加为幼稚样和/或记忆表型(如中枢记忆表型)的工程化T细胞的份额。在一些实施方案中,增加在培育或扩增过程期间的倍增会增加在培育或扩增过程期间可能发生的T细胞分化。在一些方面,可以预期,对于用于产生或生产工程化细胞组合物的过程,减少在所述过程期间(例如在培育或扩增期间)发生的扩增或细胞倍增会增加所得的工程化细胞组合物的幼稚样T细胞和/或具有记忆表型(如中枢记忆表型)的T细胞的量或份额。在特定方面,增加在所述过程期间发生的扩增或细胞倍增会增加所得的工程化细胞组合物的分化T细胞的量或份额。在一些方面,可以预期,增加或扩大在所得的工程化细胞组合物中的幼稚样细胞和/或具有记忆表型(如中枢记忆表型)的T细胞的份额的过程(如本文提供的过程)可以增加在给予工程化细胞组合物之后例如在体内的效力、功效和持久性。

[0461] 在一些方面,使用以下公式确定在群体中发生的倍增数:

[0462] 1)
$$\text{细胞倍增数} = \frac{\ln\left(\frac{\text{收获时的TNC}}{\text{激活后3天时的TNC}}\right)}{\ln 2}$$
 在某些实施方案中,使用所述

公式确定的细胞组合物的群体倍增值为或为约或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值为或为约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值在约3.0与约9.0之间、或在约5与约7.5之间。

[0463] 在一些方面,使用以下公式确定在群体中发生的倍增数:

[0464] 2)
$$\text{细胞倍增数} = \frac{\ln\left(\frac{\text{收获时的TNC}}{\text{刺激开始时的TNC}}\right)}{\ln 2}$$
 在某些实施方案中,使用所述公式

确定的细胞组合物的群体倍增值为或为约或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值为或为约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值在约3.0与约9.0之间、或在约5与约7.5之间。

[0465] 在某些实施方案中,使用以下公式确定在群体中发生的倍增数:

[0466] 3)
$$\text{细胞倍增数} = \frac{\ln\left(\frac{\text{收获时的TNC}}{\text{刺激后的TNC}}\right)}{\ln 2}$$
 在某些实施方案中,使用所述公式确定的

细胞组合物的群体倍增值为或为约或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值为或为约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值在约3.0与约9.0之间、或在约5与约7.5之间。

[0467] 在各种实施方案中,使用以下公式确定在群体中发生的倍增数:

[0468] 4)
$$\text{细胞倍增数} = \frac{\ln\left(\frac{\text{收获时的TNC}}{\text{转导时的TNC}}\right)}{\ln 2}$$
 在某些实施方案中,使用所述公式确定

的细胞组合物的群体倍增值为或为约或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值为或为约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、

9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值在约3.0与约9.0之间、或在约5与约7.5之间。

[0469] 在特定实施方案中,使用以下公式确定在群体中发生的倍增数:

$$[0470] \quad 5) \quad \text{细胞倍增数} = \frac{\ln \left(\frac{\text{收获时的TNC}}{\text{培育或扩增开始时的TNC}} \right)}{\ln 2} \quad \text{在某些实施方案中,使用所述}$$

公式确定的细胞组合物的群体倍增值为或为约或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值为或为约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值在约3.0与约9.0之间、或在约5与约7.5之间。

[0471] 在某些实施方案中,在细胞总数(例如培育细胞或经历扩增的细胞总数)为输入群体的细胞数量(与刺激试剂接触的细胞总数)的大于或大于约一倍、二倍、三倍、四倍、五倍、六倍、八倍、十倍、二十倍或超过二十倍之前,完成培育或扩增。在某些实施方案中,在细胞总数(例如培育细胞或经历扩增的细胞总数)是输入群体的细胞数量(与刺激试剂接触的细胞总数)的为、为约、或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、或10.0倍之前,完成培育或扩增。在各种实施方案中,在培育细胞的总数是转化、转导或旋转接种的细胞总数(例如与病毒载体接触的细胞总数)的大于或大于约一倍、二倍、三倍、四倍、五倍、六倍、八倍、十倍、二十倍或超过二十倍之前,完成培育或扩增。在某些实施方案中,在细胞总数(例如培育细胞或经历扩增的细胞总数)是转化、转导或旋转接种的细胞总数(例如与病毒载体接触的细胞总数)的为、为约、或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、或10.0倍之前,完成培育或扩增。在某些实施方案中,细胞组合物的群体倍增值为或为约或为大于或大于约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值为或为约2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0。在某些实施方案中,多种细胞组合物的平均群体倍增值在约3.0与约9.0之间、或在约5与约7.5之间。在某些实施方案中,细胞是T细胞、活T细胞、CD3+T细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、表达CAR的T细胞、或任何前述的组合。

[0472] 在特定实施方案中,当培育结束时,输出组合物中的细胞实现为或为约以下的细胞密度或浓度,或多种输出组合物中的细胞实现为或为约以下的平均或中值细胞密度或浓度: 1×10^6 个细胞/mL、 5×10^6 个细胞/mL、 10×10^6 个细胞/mL、 15×10^6 个细胞/mL、 20×10^6 个细胞/mL、 25×10^6 个细胞/mL、 30×10^6 个细胞/mL、 35×10^6 个细胞/mL、 40×10^6 个细胞/mL、 45×10^6 个细胞/mL、 50×10^6 个细胞/mL、 55×10^6 个细胞/mL、 60×10^6 个细胞/mL、 65×10^6 个细胞/mL、 70×10^6 个细胞/mL、 75×10^6 个细胞/mL、 80×10^6 个细胞/mL、 85×10^6 个细胞/mL、 90×10^6 个细胞/mL、 95×10^6 个细胞/mL、 100×10^6 个细胞/mL、或其活细胞。在特定实施方案中,当培育结束时,输出组合物中的细胞实现以下的细胞密度或浓度,或多种输出组合物中的细胞实现以下的平均或中

值细胞密度或浓度：在或在约 15×10^6 个细胞/mL与约 45×10^6 个细胞/mL之间、在或在约 20×10^6 个细胞/mL与约 40×10^6 个细胞/mL之间，例如约 21×10^6 个细胞/mL、 22×10^6 个细胞/mL、 23×10^6 个细胞/mL、 24×10^6 个细胞/mL、 25×10^6 个细胞/mL、 26×10^6 个细胞/mL、 27×10^6 个细胞/mL、 28×10^6 个细胞/mL、 29×10^6 个细胞/mL、 30×10^6 个细胞/mL、 31×10^6 个细胞/mL、 32×10^6 个细胞/mL、 33×10^6 个细胞/mL、 34×10^6 个细胞/mL、 35×10^6 个细胞/mL、 36×10^6 个细胞/mL、 37×10^6 个细胞/mL、 38×10^6 个细胞/mL、或 39×10^6 个细胞/mL。在一些实施方案中，平均或中值细胞密度或浓度在约 30×10^6 个细胞/mL与约 40×10^6 个细胞/mL之间、在约 15×10^6 个细胞/mL与约 25×10^6 个细胞/mL之间、在约 35×10^6 个细胞/mL与约 40×10^6 个细胞/mL之间、或在约 20×10^6 个细胞/mL与约 25×10^6 个细胞/mL之间。

[0473] 在培育期间监测细胞

[0474] 在一些实施方案中，在培育步骤期间监测细胞。可以进行监测，例如以确定（例如，测量、定量）细胞形态、细胞活力、细胞死亡和/或细胞浓度（例如，活细胞浓度、活细胞计数）。在一些实施方案中，监测是手动进行的，例如由人类操作者进行。在一些实施方案中，监测通过自动化系统进行。自动化系统可能需要最少的人工输入或不需要人工输入来监测培育的细胞。在一些实施方案中，监测是手动和通过自动化系统进行的。

[0475] 在某些实施方案中，通过不需要人工输入的自动化系统来监测细胞。在一些实施方案中，所述自动化系统与生物反应器（例如本文所述的生物反应器）兼容，使得正在经历培育的细胞可以从生物反应器中被去除、监测并随后返回到生物反应器中。在一些实施方案中，监测和培育以闭环配置发生。在一些方面，在闭环配置中，自动化系统和生物反应器保持无菌的。在实施方案中，自动化系统是无菌的。在一些实施方案中，自动化系统是在线系统。

[0476] 在一些实施方案中，自动化系统包括使用光学技术（例如显微术）检测细胞形态、细胞活力、细胞死亡和/或细胞浓度（例如活细胞浓度、活细胞计数）。本文考虑了适合于确定例如细胞特征、活力以及浓度和计数的任何光学技术。有用的光学技术的非限制性例子包括明视野显微术、荧光显微术、微分干涉差显微术、相差显微术、数字全息显微术（DHM）、差分数字全息显微术（DDHM）或其组合。差分数字全息显微术（DDHM）和差分DHM可以在本文中互换使用。在某些实施方案中，自动化系统包括差分数字全息显微镜。在某些实施方案中，自动化系统包括差分数字全息显微镜，包括照明装置（例如，激光、LED）。DDHM方法学和用途的描述可以在例如以下中找到：US 7,362,449；EP 1,631,788；US 9,904,248；和US 9,684,281，其通过引用以其整体并入本文。

[0477] DDHM允许对细胞进行无标签的无损成像，从而产生高对比度的全息图像。可以对图像进行对象分割和进一步分析，以获得定量地描述所成像的对象（例如，培育的细胞、细胞碎片）的多个形态特征。这样，可以使用例如图像获取、图像处理、图像分割和特征提取的步骤直接从DDHM评估或计算各种特征（例如，细胞形态、细胞活力、细胞浓度、细胞计数）。在一些实施方案中，自动化系统包括数字记录设备以记录全息图像。在一些实施方案中，自动化系统包括计算机，所述计算机包括用于分析全息图像的算法。在一些实施方案中，自动化系统包括用于显示全息图像分析结果的监测器和/或计算机。在一些实施方案中，分析是自动化的（即，能够在没有用户输入的情况下进行）。用于在培育步骤期间监测细胞的合适的自动化系统的例子包括但不限于Ovizio iLine F（Ovizio Imaging Systems NV/SA，比利

时布鲁塞尔)。

[0478] 在某些实施方案中,在培育步骤期间连续进行监测。在一些实施方案中,在培育步骤期间实时进行监测。在一些实施方案中,在培育步骤期间的离散时间点进行监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每15分钟进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每30分钟进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每45分钟进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每2小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每4小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每6小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每8小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每10小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每12小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每14小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每16小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每18小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每20小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每22小时进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内每天至少进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每两天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每三天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每四天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每五天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每六天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每七天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每八天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每九天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤的持续时间内至少每十天进行一次监测。在一些实施方案中,在培育步骤期间至少进行一次监测。

[0479] 在一些实施方案中,可以通过监测(包括使用诸如DHM或DDHM的光学技术)来确定的细胞特征包括细胞活力、细胞浓度、细胞数量和/或细胞密度。在一些实施方案中,表征或确定细胞活力。在一些实施方案中,表征或确定细胞浓度、密度和/或数量。在一些实施方案中,表征或确定活细胞浓度、活细胞数量和/或活细胞密度。在一些实施方案中,例如上文所述,通过自动化系统监测培育的细胞,直到达到扩增的阈值。在一些实施方案中,一旦达到扩增的阈值,就例如通过自动化或手动方法例如由人类操作者收获培育的细胞。扩增的阈值可能取决于由自动化系统确定的培养细胞的总浓度、密度和/或数量。可替代地,扩增的阈值可能取决于活细胞浓度、密度和/或数量。数量和计数可以在本文中互换使用。

[0480] 在一些实施方案中,如所述的在例如药学上可接受的载体的存在下配制收获的细胞。在一些实施方案中,在低温保护剂的存在下配制收获的细胞。

[0481] E. 配制细胞

[0482] 在一些实施方案中,用于制造、产生或生产细胞疗法和/或工程化细胞的一个或多个处理步骤(例如在离心室和/或封闭系统中进行的)可以包括在培养(例如培育和扩增)和/或如所述的一个或多个其他处理步骤之前或之后配制细胞,例如配制由所提供的转导

处理步骤产生的基因工程化细胞。在一些实施方案中,所提供的与细胞配制相关的方法包括在封闭系统中处理转导的细胞,例如使用上述处理步骤转导和/或扩增的细胞。

[0483] 在一些实施方案中,在配制之前从细胞中去除和/或分离刺激试剂。在特定实施方案中,在培育之后从细胞中去除和/或分离刺激试剂。在某些实施方案中,例如在促进增殖和/或扩增的条件下,在培育之后和在配制培育的细胞之前,从细胞中去除和/或分离刺激剂。在某些实施方案中,刺激试剂是本文(例如在章节I-B-1中)所述的刺激试剂。在特定实施方案中,如本文(例如在章节I-B-2中)所述,从细胞中去除和/或分离刺激试剂。

[0484] 在一些实施方案中,在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增后在0天与10天之间、在0天与5天之间、在2天与7天之间、在0.5天与4天之间、或在1天与3天之间配制细胞。在某些实施方案中,在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增后为或为或约12小时、18小时、24小时、1天、2天或3天或在12小时、18小时、24小时、1天、2天或3天内配制细胞。在一些实施方案中,在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增后为或约1天内配制细胞。

[0485] 在一些实施方案中,所提供的用于制造、产生或生产细胞疗法和/或工程化细胞的方法可以包括在孵育、工程化和培育和/或如所述的一个或多个其他处理步骤之前或之后配制细胞,例如配制由所提供的处理步骤产生的基因工程化细胞。在一些实施方案中,所提供的与细胞配制相关的方法包括在封闭系统中处理转导的细胞,例如使用上述处理步骤转导和/或扩增的细胞。在一些实施方案中,提供包含用重组抗原受体(例如,CAR或TCR)工程化的细胞的所述剂量作为组合物或配制品,如药物组合物或配制品。这种组合物可以根据所提供的方法如在预防或治疗疾病、病症和障碍或检测、诊断和预后方法中使用。

[0486] 在一些情况下,在用于制造、产生或生产细胞疗法和/或工程化细胞的一个或多个步骤(例如在离心室和/或封闭系统中进行的)中处理细胞,可以包括在培养(例如培育和扩增)和/或如所述的一个或多个其他处理步骤之前或之后配制细胞,例如配制由所提供的转导处理步骤产生的基因工程化细胞。在一些情况下,可以以用于剂量给予(例如用于单一单位剂量给予或多剂量给予)的量配制细胞。在一些实施方案中,所提供的与细胞配制相关的方法包括在封闭系统中处理转导的细胞,例如使用上述处理步骤转导和/或扩增的细胞。

[0487] 在某些实施方案中,配制富集的T细胞的一种或多种组合物。在特定实施方案中,在一种或多种组合物已经被工程化和/或培育之后,配制富集的T细胞的一种或多种组合物。在特定实施方案中,一种或多种组合物是输入组合物。在一些实施方案中,先前已经将一种或多种输入组合物低温冷冻并储存,并在孵育之前解冻。

[0488] 在某些实施方案中,配制的细胞是输出细胞。在一些实施方案中,所配制的富集T细胞的组合物是富集T细胞的输出组合物。在特定实施方案中,所配制的CD4+T细胞和所配制的CD8+T细胞是输出CD4+和CD8+T细胞。在特定实施方案中,所配制的细胞组合物(例如配制的富集CD4+和CD8+细胞的组合物)是输出细胞组合物,例如,富集CD4+和CD8+细胞的输出组合物。

[0489] 在一些实施方案中,可以将细胞配制在容器(如袋或小瓶)中。在一些实施方案中,在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增后在0天与10天之间、在0天与5天之间、在2天与7天之间、在0.5天与4天之间、或在1天与3天之间配制细胞。在某些实施方案中,在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增后为或为或约12小时、18小时、24小时、1

天、2天或3天或在12小时、18小时、24小时、1天、2天或3天内配制细胞。在一些实施方案中，在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增后为或约1天内配制细胞。

[0490] 在某些实施方案中，例如，将细胞培育最少的持续时间或最少的时间量，例如使得与如果将细胞在培育期间较早的时间点配制相比，以较低的激活状态收获所述细胞，而不管何时实现阈值。在一些实施方案中，在培育期间已经实现阈值细胞计数、密度和/或扩增之后，将细胞培育在0天与3天之间，例如在0天与3天之间、在1天与2天之间、为或为约1天、为或为约2天、为或为约3天。在某些实施方案中，细胞达到阈值细胞计数、密度和/或扩增，并且在配制之前保持培育最少的时间或持续时间。在一些实施方案中，不将已经实现阈值的细胞配制，直到它们已经被培育最少的持续时间和/或时间量，例如在1天与14天之间、2天与7天、或3天与6天之间的最少时间或持续时间、或者为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天或超过7天的最少培育时间或持续时间为止。在一些实施方案中，最少的培育时间或持续时间在3天与6天之间。

[0491] 在一些实施方案中，将细胞配制在药学上可接受的缓冲液中，所述药学上可接受的缓冲液在一些方面可以包括药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中，所述处理包括将培养基更换为药学上可接受或期望用于给予至受试者的培养基或配制缓冲液。在一些实施方案中，处理步骤可以涉及洗涤转导的和/或扩增的细胞以替换在药学上可接受的缓冲液中的细胞，所述药学上可接受的缓冲液可以包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。包括药学上可接受的载体或赋形剂的此类药物形式的例子可以是在下文与用于将细胞和组合物给予至受试者的可接受形式结合进行描述的任何形式。在一些实施方案中，药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量（例如治疗有效量或预防有效量）的细胞。

[0492] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0493] 在一些方面，载体的选择部分取决于特定细胞和/或给予方法。因此，存在多种合适的配制品。例如，药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面，使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A. 编辑(1980)中。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒，并且包括但不限于：缓冲液，如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲氯铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚、丁醇或苄醇；烷基对羟基苯甲酸酯，如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约10个残基）多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖类，如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐抗衡离子，如钠；金属络合物（例如锌-蛋白质络合物）；和/或非离子表面活性剂，如聚乙二醇（PEG）。

[0494] 在一些方面，组合物中包含缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面，使用两种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲

剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版(2005年5月1日)中。

[0495] 配制品可以包括水溶液。所述配制品或组合物还可含有可用于用细胞治疗的特定适应症、疾病或病症的多于一种活性成分, 优选具有与所述细胞互补的活性的那些成分, 其中各自的活性不会相互产生不利影响。此类活性成分以有效用于既定目的的量合适地组合存在。因此, 在一些实施方案中, 药物组合物还包括其他药物活性药剂或药物, 例如化学治疗剂, 例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱和/或长春新碱。

[0496] 在一些实施方案中, 组合物被提供为无菌液体制剂(例如, 等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物), 其在一些方面可以被缓冲至选择的pH。液体组合物可以包含载体, 所述载体可以是溶剂或分散介质, 所述溶剂或分散介质含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如, 甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。无菌可注射溶液可以通过将细胞掺入溶剂中来制备, 如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。所述组合物可以含有辅助物质, 例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂和/或颜料, 这取决于给予途径和所需的制剂。在一些方面, 可以查阅标准文本来制备合适的制剂。

[0497] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂, 包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚和山梨酸)来确保对微生物作用的防止。可以通过使用吸收延迟剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0498] 在一些实施方案中, 配制缓冲液含有低温保存剂。在一些实施方案中, 用低温保存剂溶液配制细胞, 所述低温保存剂溶液含有1.0%至30%的DMSO溶液, 例如5%至20%的DMSO溶液、或5%至10%的DMSO溶液。在一些实施方案中, 低温保存溶液是或含有例如含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS、或其他合适的细胞冷冻介质。在一些实施方案中, 低温保存剂溶液是或含有例如至少或约7.5% DMSO。在一些实施方案中, 处理步骤可以涉及洗涤转导的和/或扩增的细胞以替换在低温保存剂溶液中的细胞。在一些实施方案中, 将细胞以为或约12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%或5.0% DMSO、或在1%与15%之间、在6%与12%之间、在5%与10%之间、或在6%与8%之间的DMSO的终浓度冷冻(例如, 低温冷冻或低温保存)在介质和/或溶液中。在特定实施方案中, 将细胞以等于或约5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%、或0.25% HAS、或在0.1%与-5%之间、在0.25%与4%之间、在0.5%与2%之间、或在1%与2%之间的HSA的终浓度冷冻(例如, 低温冷冻或低温保存)在介质和/或溶液中。

[0499] 在特定实施方案中, 将已经被刺激、工程化和/或培育的富集的T细胞(例如T细胞)的组合物配制、低温冷冻、并且然后储存一定时间量。在某些实施方案中, 所配制的低温冷冻的细胞被储存直到将细胞释放用于输注。在特定实施方案中, 所配制的低温冷冻的细胞储存持续1天与6个月之间、在1个月与3个月之间、在1天与14天之间、在1天与7天之间、在3天与6天之间、在6个月与12个月之间、或长于12个月。在一些实施方案中, 将细胞低温冷冻

并储存持续、持续约、或持续少于1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在某些实施方案中,在储存之后,将细胞解冻并给予至受试者。在某些实施方案中,将细胞储存持续或持续约5天。

[0500] 在一些实施方案中,使用一个或多个处理步骤来进行配制,所述一个或多个处理步骤包括洗涤、稀释或浓缩细胞,如培养或扩增的细胞。在一些实施方案中,所述处理可以包括将细胞稀释或浓缩至所需浓度或数量,例如包括用于以给定剂量或其分数给予的细胞数量的单位剂型组合物。在一些实施方案中,处理步骤可以包括减小体积,从而根据需要增加细胞的浓度。在一些实施方案中,处理步骤可以包括添加体积,从而根据需要降低细胞的浓度。在一些实施方案中,所述处理包括向转导和/或扩增的细胞中添加一定体积的配制缓冲液。在一些实施方案中,配制缓冲液的体积是从或从约10mL至1000mL,例如至少或至少约或约50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL或1000mL。

[0501] 在一些实施方案中,用于配制细胞组合物的此类处理步骤在封闭系统中进行。此类处理步骤的例子可以使用与跟细胞处理系统相关的一个或多个系统或套件结合的离心室(例如由Biosafe SA生产和出售的离心室,包括用于与Sepax®或Sepax 2®细胞处理系统一起使用的那些)来进行。在国际公开号W02016/073602中描述了示例性系统和过程。在一些实施方案中,所述方法包括从离心室的内部空腔中输送配制的组合物,所述配制的组合物是在如所述的任何上述实施方案中配制在配制缓冲液(如药学上可接受的缓冲液)中的细胞的所得组合物。在一些实施方案中,所配制的组合物的输送是到容器,如作为封闭系统的一部分与离心室可操作地连接的袋。在一些实施方案中,容器(如袋)在输出线或输出位置处与系统连接。

[0502] 在一些实施方案中,封闭系统(例如与离心室或细胞处理系统相关)包括多端口输出套件,所述多端口输出套件含有在管组线的每一端与端口关联的多路管组歧管,一个或多个容器可以与所述端口连接以输送所配制的组合物。在一些方面,可以将所需数量或多个输出容器(例如,袋)无菌地连接至多端口输出的一个或多个(通常两个或更多个,如至少3、4、5、6、7、8个或更多个)端口。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个容器(例如,袋)附接到端口,或者附接到少于所有端口。因此,在一些实施方案中,所述系统可以实现将输出组合物输送到多个输出袋中。

[0503] 在一些方面,可以以用于剂量给予(例如用于单一单位剂量给予或多剂量给予)的量将细胞输送到多个输出袋中的一个或多个。例如,在一些实施方案中,输出袋每个可以含有用于以给定剂量或其分数给予的细胞数量。因此,在一些方面,每个袋可以含有用于给予的单一单位剂量或可以含有所需剂量的一部分,使得多个输出袋中的超过一个(例如输出袋中的两个、或输出袋中的三个)一起构成用于给予的剂量。

[0504] 因此,容器(例如输出袋)通常含有待给予的细胞,例如,其一个或多个单位剂量。单位剂量可以是待给予至受试者的细胞的量或数量,或者是待给予的细胞的数量的两倍(或更多)。它可以是待给予至受试者的细胞的最低剂量或最低可能剂量。

[0505] 在一些实施方案中,每个容器(例如袋)单独地包含单位剂量的细胞。因此,在一些实施方案中,每个容器包含相同或大约或基本相同数量的细胞。在一些实施方案中,每个单位剂量含有至少或至少约 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、或 1×10^8 个工程化细胞、总细胞、T细胞或PBMC。在一些实施方案中,每个袋中所配制的细胞组合物的体积为10mL至100mL,例如至少或至少约20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL或100mL。

[0506] 在一些实施方案中,将通过所述方法产生的此类细胞或包含此类细胞的组合物给予至受试者以治疗疾病或病症。

[0507] F.过程的示例性特征

[0508] 在特定实施方案中,所提供的方法与从一种或多种输入组合物和/或从单一生物样品生产或产生富集T细胞的输出组合物的过程结合使用。在某些实施方案中,输出组合物含有表达重组受体(例如TCR或CAR)的细胞。在特定实施方案中,输出组合物的细胞适合于作为疗法(例如自体细胞疗法)给予至受试者。在一些实施方案中,输出组合物是富集CD4⁺和CD8⁺T细胞的组合物。

[0509] 在一些实施方案中,所提供的方法与用于产生或生产输出细胞和/或富集T细胞的输出组合物的整个过程结合使用,所述过程例如是包括以下中的一些或全部步骤的过程:收集或获得生物样品;从生物样品中分离、选择或富集输入细胞;低温冷冻和储存输入细胞;解冻和/或在刺激条件下孵育输入细胞;将所刺激的细胞进行工程化以表达或含有重组多核苷酸,例如编码重组受体如CAR的多核苷酸;将工程化细胞培育至阈值量、密度或扩增;将培育的细胞配制在输出组合物中;和/或低温冷冻和储存配制的输出细胞,直到细胞被释放用于输注和/或适合于被给予至受试者。在一些实施方案中,整个过程用富集T细胞(例如CD4⁺和CD8⁺T细胞)的单一组合物进行。在某些实施方案中,所述过程用富集T细胞的两种或更多种输入组合物进行,所述两种或更多种输入组合物在所述过程之前和/或期间被组合以产生或生产富集T细胞的单一输出组合物。在一些实施方案中,富集的T细胞是或包含工程化的T细胞,例如,转导以表达重组受体的T细胞。

[0510] 在一些实施方案中,将与所提供方法相关的过程与替代性过程进行比较。在特定实施方案中,替代性过程可以在一个或多个特定方面不同,但是另外含有与所提供方法相关的过程的相似或相同的特征、方面、步骤、阶段、试剂和/或条件。在一些实施方案中,替代性过程与所提供方法相关的过程相似,但是以包括但不限于以下中的一种或多种的方式不同:不同的试剂和/或培养基配方;在孵育、转导、转染和/或培育期间血清的存在;输入组合物的不同细胞组成,例如CD4⁺与CD8⁺T细胞的比率;在刺激条件下孵育的输入细胞的量和/或浓度不同;不同的刺激条件和/或不同的刺激试剂;刺激试剂与细胞的比率不同;不同的载体和/或转导方法;孵育、转导和/或转染细胞的时间安排或顺序不同;在孵育、转导、转染和/或培育期间不存在一种或多种重组细胞因子或一种或多种重组细胞因子的不同存在;转导的细胞的量和/或浓度不同;培育期间不同的摇摆和/或灌注条件;和/或在培育期间实现的不同的阈值量、密度或扩增。

[0511] 在某些实施方案中,在为或约35天、34天、33天、32天、31天、30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天、或少于9天的持续时间和/或时间量内完成所述过程。在一些实施方案中,在25天内完成所述过程。在某些实施方案中,在21天内完成所述过程。在特定实施方案中,在14天与18天之间的持续时间和/或时间量内完成所述过程。在一些实施方案中,在发生以下情况时认为所述过程完成:收获和/或配制了所述组合物;组合物准备好被收获和/或配制;组合物已经达到用于收获的目标阈值;组合物被释放和/或准备进行配制后测试;组合物准备好被给予至受试者,和/或组合物被给予至受试者;包括低温冷冻组合物的储存时间。在特定实施方案中,当对从同一生物样品获得的富集T细胞的超过一种组合物进行所

述过程时,当来自同一生物样品的每一种和每种组合物的至少一种代表性样品已经完成所述过程时,所述过程完成。

[0512] 在一些实施方案中,在如从生物样品的起始或收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集输入细胞到当细胞被释放用于输注时所测量的21天内,所述过程完成。在特定实施方案中,如从生物样品的起始或收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集输入细胞到当输出细胞准备好进行配制后测试、被释放用于输注和/或准备好被给予至受试者时所测量的在14天与18天之间,所述过程完成。

[0513] 在某些实施方案中,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间之间发生的过程期间的持续时间和/或时间量为5天或约5天、在5天与25天之间、在7天与18天之间、在8天与15天之间、在14天与18天之间、在8天与14天之间、在8天与15天之间,例如在8天与13天之间或在9天与13天之间。在特定实施方案中,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在7天与10天之间、在6天与9天之间或在5天与8天之间。

[0514] 在某些实施方案中,从孵育的起始或开始到实现阈值的时间所发生的过程的中值时间量和/或持续时间为约或少于约5天、在5天与25天之间、在7天与18天之间、在9天与13天之间、在14天至18天之间,或者为、为少于、或为约5天、5.5天、6天、6.5天、7天、7.5天、8天、9天、10天、11天、12天、或13天。在特定实施方案中,从孵育的起始或开始到实现阈值的时间所发生的过程的平均时间量和/或持续时间为约或少于约5天、在5天与25天之间、在7天与18天之间、在14天与18天之间、在8天与13天之间、或在9天与13天之间,或者为、为少于、或为约5天、5.5天、6天、6.5天、7天、7.5天、8天、9天、10天、11天、12天、或13天。在特定实施方案中,从在刺激条件下起始或开始孵育到实现阈值的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量为5天或约5天、在5天与7天之间、在7天与10天之间、在6天与9天之间或在5天与8天之间。

[0515] 在一些实施方案中,通过所提供的过程可以成功地制造工程化细胞(例如CAR T细胞)的成功率是至少或至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些方面,成功率被确定为其样品已被收集(例如通过单采术)用于通过所提供的过程进行工程化的受试者的百分比,其中在开始用刺激试剂刺激之后约或少于约5天、在5天与10天之间,例如在7天与10天之间、在6天与9天之间或在5天与8天之间,例如5天、5.5天、6天、6.5天、7天或7.5天的时间,此类细胞满足收获输出细胞的过程标准,包括收集、配制和/或低温保存输出细胞。在一些方面,成功率被确定为其样品已被收集(例如通过单采术)用于通过所提供的过程进行工程化的受试者的百分比,其中在开始用刺激试剂刺激后的21天内,此类细胞满足用于将工程化细胞重新输注至受试者的过程标准,包括配制后测试、释放用于输注、和/或准备好给予至受试者。

[0516] 在一些实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的为、约、或至少或至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的受试者,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在9天与15天之间。在某些实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的为、约、或至少或至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的受试者,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻

输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在14天与18天之间。在特定实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的为、约、或至少或至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的受试者,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在7天与10天之间。在特定实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的为、约、或至少或至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的受试者,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在6天与9天之间。在特定实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的为、约、或至少或至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的受试者,从在刺激条件下起始或开始孵育到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在5天与8天之间。在一些实施方案中,此类受试者是患有疾病或病症(如癌症,如多发性骨髓瘤)的患者。

[0517] 在一些实施方案中,从生物样品(例如单采术和/或白细胞单采术)中分离、富集和/或选择富集CD4⁺和CD8⁺细胞的组合物到收集、配制和/或低温冷冻输出细胞的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在5天与25天之间、在7天与18天之间、在14天与18天之间、在8天与19天之间、在8天与14天之间、或在10天与16天之间。在某些实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的受试者,在分离、富集和/或选择后的在10天与16天之间收集、配制和/或收获输出细胞。在特定实施方案中,对于经历了用于制造细胞的所提供过程的多名受试者中的至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的受试者,在分离、富集和/或选择后的在14天与18天之间收集、配制和/或收获输出细胞。

[0518] 在一些实施方案中,如从生物样品(例如单采术或白细胞单采术样品)的起始或收集到当输出组合物被给予或准备好被给予至受试者,输出细胞被收获和/或被配制;输出细胞准备好被收获和/或被配制;输出细胞已经达到收获的目标阈值;和/或输出组合物被释放用于测试(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的,在为或约35天、34天、33天、32天、31天、30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天或少于9天的持续时间和/或时间量内,所述过程完成。在一些实施方案中,在如从生物样品的起始或收集到当输出细胞准备好被释放和/或被释放用于输注至例如受试者中所测量的21天内,所述过程完成。

[0519] 在一些实施方案中,如从生物样品的起始或收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集输入细胞到当输出细胞被释放用于输注(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的,在为或约35天、34天、33天、32天、31天、30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天或少于9天的持续时间和/或时间量内,在至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.9%的置信区间内,所述过程完成。在某些实施方案中,在如从生物样品的起始或收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集输入细胞到当输出细胞被释放用于输注(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的14天至18天内,在至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.9%的置信区间内,所述过程完成。

[0520] 在某些实施方案中,如从生物样品的收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集T细胞(例如输入T细胞)到当输出细胞被给予至受试者和/或准备好被给予至受试者(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的,在为或约35天、34天、33天、32天、31天、30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天或少于9天的持续时间和/或时间量内,在至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.9%的置信区间内,所述过程完成。在某些实施方案中,如从生物样品的收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集T细胞(例如输入T细胞)到当输出细胞被给予至受试者和/或准备好被给予至受试者(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的,在14天与18天之间的持续时间和/或时间量内,在至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.9%的置信区间内,所述过程完成。

[0521] 在某些实施方案中,如从生物样品的收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集T细胞(例如输入T细胞)到当输出细胞准备好用于配制后测试(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的,在为或约35天、34天、33天、32天、31天、30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天或少于9天的持续时间和/或时间量内,在至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.9%的置信区间内,所述过程完成。在某些实施方案中,如从生物样品的收集和/或从生物样品中分离、选择、刺激和/或富集T细胞(例如输入T细胞)到当输出细胞准备好用于配制后测试(包括低温冷冻组合物的储存时间)时所测量的,在14天与18天之间的持续时间和/或时间量内,在至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或99.9%的置信区间内,所述过程完成。

[0522] 在某些实施方案中,对于来自多名受试者的样品和/或对于至少一定百分比的受试者,例如具有特定适应症或疾病的受试者,例如对于至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%或大于95%的此类受试者,例如当包括存储时间时,完成所述过程的持续时间和/或时间量在10天与35天之间、在12天与33天之间、在17天与25天之间、在14天与18天之间、或在19天与23天之间。在某些实施方案中,例如当包括存储时间时,在来自不同生物样品的多种起始组合物上完成所述过程(例如,当从受试者获取样品到当产品准备好或被释放用于输注至受试者时所测量时)的中值时间量和/或持续时间在15天与27天之间、在17天与25天之间、在14天与18天之间、或在19天与23天之间,或者为、为约或为少于14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、或23天。在特定实施方案中,例如当包括运输和/或存储时间时,在来自不同生物样品的多种组合物上完成所述过程的平均时间量和/或持续时间在15天与27天之间、在17天与25天之间、在14天与18天之间、或在19天与23天之间,或者为、为少于、或为约14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、或23天。在特定实施方案中,例如当包括存储时间时,在来自不同生物样品的多种组合物上完成所述过程的持续时间在15天与27天之间、在17天与25天之间、在14天至18天之间、或在19天与23天之间,或者为、为少于、或为约14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、或23天。

[0523] 在某些实施方案中,在例如来自不同生物样品和/或患有不同疾病的受试者的例如一系列起始组合物中,所述过程的持续时间为少于或不超过21天;在一些方面,在此类样

品或患者中,在制造产品中,以大于或大于约85%、90%、91%、92%、93%、94%、或95%的成功率实现这样的结果。在特定实施方案中,在例如来自不同生物样品和/或患有不同疾病的受试者的例如一系列起始组合中,所述过程的持续时间在14天与18天之间;在一些方面,在此类样品或患者中,在制造产品中,以大于85%、90%、91%、92%、93%、94%、或95%的成功率实现这样的结果。

[0524] 在一些实施方案中,当不包括或不考虑低温冷冻细胞的存储时间时,完成所述过程的持续时间和/或时间量在7天与27天之间、在9天与25天之间、在11天与18天之间、在14天与18天之间、或在11天与15天之间。在某些实施方案中,当不包括或不考虑低温冷冻细胞的存储时间时,在来自不同生物样品的多种组合上完成所述过程所需的中值时间量和/或持续时间在7天与27天之间、在9天与25天之间、在11天与18天之间、在14天与18天之间、或在11天与15天之间,或者为、为少于、或为约11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天或18天。在特定实施方案中,当不包括或不考虑低温冷冻细胞的存储时间时,在来自不同生物样品的多种组合上完成所述过程所需的平均时间量和/或持续时间在7天与27天之间、在9天与25天之间、在11天与18天之间、在14天与18天之间、或在11天与15天之间,或者为、为少于或为约11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天或18天。在一些实施方案中,当不包括低温冷冻细胞的存储时间时,在来自不同生物样品的多种组合上完成所述过程所需的平均时间量和/或持续时间为少于21天。

[0525] 在特定实施方案中,当不包括或不考虑低温冷冻细胞的存储时间时,在从不同来源(例如不同生物样品和/或从不同的生物样品中分离、富集和/或选择的富集T细胞的不同输入组合)获得的多种组合中的至少10%上完成所述过程的时间量在7天与18天之间、在14天与18天之间、在10天与17天之间、或在11天与15天之间,或者为或为约11天、12天或13天。在特定实施方案中,当不包括或不考虑低温冷冻细胞的存储时间时,在来自不同生物来源的多种组合中的至少50%上完成所述过程所需的时间量在7天与27天之间、在9天与25天之间、在11天与18天之间、在14天与18天之间、或在11天与15天之间,或者为、为少于或为约11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天或18天。在某些实施方案中,当不包括或不考虑低温冷冻细胞的存储时间时,在来自不同来源的多种组合中的至少90%上完成所述过程所需的时间量为少于21天。

[0526] 在一些实施方案中,从在刺激条件下孵育起始或开始到在培育期间实现阈值量、密度和/或扩增程度(如特定的倍数扩增如四倍或特定的剂量)的时间所发生的过程期间的持续时间和/或时间量在5天与25天之间、在7天与18天之间、在14天与18天之间、或在8天与15天之间(例如在8天与13天之间或在9天与13天之间)。在某些实施方案中,从孵育的起始或开始到实现阈值的时间所发生的过程的中值时间量和/或持续时间在5天与25天之间、在7天与18天之间、在14天与18天之间、或在9天至13天之间,或者为、为少于、或为约8天、9天、10天、11天、12天、或13天。在特定实施方案中,从孵育的起始或开始到实现阈值的时间所发生的过程的平均时间量和/或持续时间在5天与25天之间、在7天与18天之间、在14天与18天之间、或在9天与13天之间,或者为或为约9天、10天、11天、12天、或13天。

[0527] 在一些实施方案中,与替代性过程的持续时间和/或时间量相比,从在刺激条件下孵育起始或开始到在培育期间实现阈值量、密度和/或扩增的时间的过程的持续时间和/或时间量少了至少或至少约5%、至少或至少约10%、至少或至少约15%、至少或至少约20%、至少或至少约25%、至少或至少约30%、至少或至少约35%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、或至少或至少约90%。在特定实施方案中,与替代性过程的持续时间和/或时间量相比,从在刺激条件下孵育起始或开始到在培育期间实现阈值量、密度和/或扩增的时间的过程期间的持续时间和/或时间量短了、短了约、或短了至少0.5天、1天、1.5天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或超过14天。

[0528] 在某些实施方案中,从在刺激条件下孵育起始或开始到在培育期间实现阈值量、密度和/或扩增的时间,来自不同生物样品的多种组合物中的至少10%实现阈值量、密度和/或扩增所需的时间量在5天与20天之间、在7天与15天之间或在9天与11天之间,或者为、为小于或为约7天、8天、9天或10天。在特定实施方案中,从在刺激条件下孵育起始或开始起,来自不同生物样品的多种组合物中的至少50%达到阈值量、密度和/或扩增所需的时间量在5天与25天之间、在7天与18天之间、或在9天与13天之间,或者为、为少于或为约7天、8天、9天、10天、11天、12天或13天。在一些实施方案中,从在刺激条件下孵育起始或开始起,来自不同生物样品的多种组合物中的至少90%达到阈值量、密度和/或扩增所需的时间量在5天与25天之间、在7天与18天之间或在9天与13天之间,或者为或为约7天、8天、9天、10天、11天、12天或13天。

[0529] 在一些实施方案中,所提供的方法与成功地产生或生产适合于在细胞疗法中使用的工程化T细胞的输出组合物结合使用。在一些实施方案中,如果在培育期间组合物的细胞实现阈值细胞计数、密度和/或扩增,则成功地产生输出组合物。在特定实施方案中,如果至少或至少约40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、或95%的细胞表达重组受体,则成功地产生输出组合物。在特定实施方案中,如果输出组合物适合于治疗用途,例如作为自体细胞疗法,则成功地生产或产生输出组合物。在特定实施方案中,如果输出组合物的细胞满足一个或多个标准,则所述输出组合物适合于治疗用途。在一些实施方案中,适合于在细胞疗法中使用的细胞和/或细胞组合物是无菌的(例如,缺乏可检测的微生物污染)、无内毒素、无可复制型病毒、是活的、是有活性的(例如,拥有细胞溶解活性和/或响应于靶抗原而释放细胞因子),和/或含有很高份额的表达重组受体的细胞。

[0530] 在一些实施方案中,例如在低温冷冻之前收集输出细胞的一部分、样品和/或级分,并用一种或多种测定进行测试。在一些实施方案中,所述一种或多种测定包括用于评价输出细胞(例如,评估、评价和/或定量输出细胞的特征、表型和/或特性,例如以确定或验证输出细胞的安全性和/或生物学特性)的测定。在一些实施方案中,所述一种或多种测定可以包括用于验证输出细胞的部分、样品和/或级分是无菌的测定。在特定实施方案中,测定包括微生物污染、细菌内毒素、残留试剂和/或可复制型病毒的存在测试。在一些实施方案中,所述一种或多种测定测量、检测和/或定量一种或多种生物学特性。在某些实施方案中,所述一种或多种测定测量、检测和/或定量细胞计数、细胞密度、细胞表型(例如CD3、CD4和/或CD8的表面表达)、活力和/或活性(例如细胞因子释放和/或细胞溶解活性)。

[0531] 在特定实施方案中,在输出细胞被释放用于输注、准备好给予至受试者和/或给予至受试者之前进行所述一种或多种测定。在特定实施方案中,在例如已经对输出细胞的一部分、级分和/或样品进行一种或多种测定之后,输出细胞被释放用于输注,准备好被给予至受试者,和/或被给予至受试者。在特定实施方案中,在完成所述一种或多种测定后,在输出细胞确定是安全的(例如无菌的和/或游离的)和/或具有所需的生物学特性之后,输出细胞被释放用于输注,准备好被给予至受试者,和/或被给予至受试者。

[0532] 在特定实施方案中,所提供的方法具有至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、或至少或至少约99%的从输入细胞的组合物和/或生物样品中成功地产生或生产富集T细胞的输出组合物的概率或可能性。在某些实施方案中,所述概率或可能性在85%与100%之间、在90%与95%之间或在92%与94%之间。在某些实施方案中,所提供的方法从至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约81%、至少或至少约82%、至少或至少约83%、至少或至少约84%、至少或至少约85%、至少或至少约86%、至少或至少约87%、至少或至少约88%、至少或至少约89%、至少或至少约90%、至少或至少约91%、至少或至少约92%、至少或至少约93%、至少或至少约94%、至少或至少约95%、至少或至少约96%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、或至少或至少约99%的来自多种输入细胞组合物的组合物和/或样品和/或的多个生物样品中成功地产生或生产富集T细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所提供的方法从在为或约85%与为或约100%之间、在为或约90%与为或约95%之间、或在为或约92%与为或约94%之间的来自多种输入细胞组合物的组合物和/或样品和/或的多个生物样品中成功地产生或生产富集T细胞的输出组合物。

[0533] 在一些实施方案中,对于从至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或至少99.9%的来自不同受试者的样品获得、选择或富集的细胞,在21天内完成所述过程,并且所述过程具有至少80%、85%、90%、95%、99%或更高的成功率。在一些实施方案中,对于从为或至少或至少约90%、为或至少或至少约91%、为或至少或至少约92%、为或至少或至少约93%、为或至少或至少约94%、为或至少或至少约95%、为或至少或至少约96%、为或至少或至少约97%、为或至少或至少约98%或为或至少或至少约99%、或100%的来自不同受试者的样品获得、选择或富集的细胞,在21天内完成所述过程。在一些实施方案中,所述过程具有为或至少或至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%的成功率来在从受试者中获得、选择或富集细胞的21天内生产准备好用于输注至受试者的工程化细胞。在某些实施方案中,对于从至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或至少99.9%的来自不同受试者的样品获得、选择或富集的细胞,在21天内完成所述过程,并且所述过程具有至少80%、85%、90%、95%、99%或更高的成功率。

[0534] 在特定实施方案中,对于从至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或至少99.9%的来自不同受试者的样品获得、选择或富集的细胞,在14天与18天之间完成所述过程,并且所述过程具有至少80%、85%、90%、95%、99%或更高的成功率。

在某些实施方案中,对于从至少或至少约75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或至少99.9%的来自不同受试者的样品获得、选择或富集的细胞,在14天与18天之间完成所述过程,并且所述过程具有至少80%、85%、90%、95%、99%或更高的成功率。

[0535] 在特定实施方案中,与所提供方法相关的过程成功地产生或生产输出组合物的概率或可能性比替代性和/或示例性过程成功地产生或生产输出组合物的概率或可能性高了至少或至少约0.5%、至少或至少约1%、至少或至少约1.5%、至少或至少约2%、至少或至少约2.5%、至少或至少约3%、至少或至少约3.5%、至少或至少约4.0%、至少或至少约4.5%、至少或至少约5%、至少或至少约5.5%、至少或至少约6%、至少或至少约6.5%、至少或至少约7%、至少或至少约7.5%、至少或至少约8%、至少或至少约8.5%、至少或至少约9%、至少或至少约9.5%、或至少或至少约10%、或高了超过10%。

[0536] G. 输出组合物的示例性特征

[0537] 在某些实施方案中,所提供的方法与用于产生或生产输出细胞和/或富集T细胞的输出组合物的过程结合使用。在特定实施方案中,输出细胞和/或富集T细胞的输出组合物是或包括如下细胞,所述细胞是从生物样品(如血液样品或白细胞单采术样品)中收集、获得、分离、选择和/或富集的;在刺激条件下孵育;被工程化(例如转导)以表达或含有重组多核苷酸,例如编码重组受体(如CAR)的多核苷酸;被培育至阈值量、密度或扩增;和/或被配制。在一些实施方案中,例如在所述过程的一个或多个步骤期间、之前和/或之后,先前已经低温冷冻和解冻了输出组合物。在一些实施方案中,输出组合物含有表达重组受体(例如CAR)的T细胞,例如CD4+T细胞和CD8+T细胞。

[0538] 在特定实施方案中,输出组合物是针对富集的CD3+T细胞而富集的细胞的组合物。在一些实施方案中,输出组合物是或包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的CD3+T细胞。在一些实施方案中,输出组合物本质上由CD3+T细胞组成。在某些实施方案中,输出组合物是针对富集CD4+T细胞和CD8+T细胞而富集的细胞的组合物。在特定实施方案中,输出组合物是或包含至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约98%、至少或至少约99%、至少或至少约99.5%、至少或至少约99.9%、或为或为约100%的为CD4+或CD8+T细胞的细胞。在一些实施方案中,输出组合物本质上由CD4+和CD8+T细胞组成。

[0539] 在特定实施方案中,输出组合物含有在为或约10%与为或约90%之间、在为或约20%与为或约80%之间、在为或约25%与为或约75%之间、在为或约30%与为或约70%之间、在为或约35%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约55%与为或约45%、或约50%或50%的CD4+T细胞,以及为或约在为或约10%与为或约90%之间、在为或约20%与为或约80%之间、在为或约25%与为或约75%之间、在为或约30%与为或约70%之间、在为或约35%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约55%与为或约45%、或约50%或50%的CD8+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物含有在为或约35%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约60%之间、在为或约55%与为或约45%之间、或约50%或50%的CD4+T细胞,以及为或约在为或约35%与为或约65%之间、在

为或约40%与为或约60%之间、在为或约55%与为或约45%之间、或约50%或50%的CD8+T细胞。在特定实施方案中,输出含有在为或约35%与为或约65%之间的CD4+T细胞,以及为或约在为或约35%与为或约65%之间的CD8+T细胞。在特定实施方案中,输出组合物含有在3:1与1:3之间、在2.5:1与1:2.5之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.4:1与1:1.4之间、在1.3:1与1:1.3之间、在1.2:1与1:1.2之间、或在1.1:1与1:1.1之间的比率的CD4+T细胞与CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物具有为或约3:1、2.8:1、2.5:1、2.25:1、2:1、1.8:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1, 1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.8、1:2、1:2.25、1:2.5、1:2.8、1:3的比率。

[0540] 在一些实施方案中,至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约97%、至少或至少约98%、或至少或至少约99%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在10:90与90:10之间、在20:80与80:20之间、在75:25与25:75之间、在70:30与30:70之间、在35:65与65:35之间、在40:60与60:40之间、在45:55与55:45之间、或约50:50或50:50的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。在特定实施方案中,至少80%、至少85%或至少90%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在3:1与1:3之间、在2.5:1与1:2.5之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.4:1与1:1.4之间、在1.3:1与1:1.3之间、在1.2:1与1:1.2之间、或在1.1:1与1:1.1之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。在某些实施方案中,至少90%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在1:2与2:1之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。在特定实施方案中,至少90%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在1.5:1与1:1.5之间、在1.25:1与1:1.25之间、在1.1:1与1:1.1之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。

[0541] 在一些实施方案中,输出组合物含有在3:1与1:3之间、在2.5:1与1:2.5之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.4:1与1:1.4之间、在1.3:1与1:1.3之间、在1.2:1与1:1.2之间、或在1.1:1与1:1.1之间的比率的表达重组受体(例如CAR)的CD4+T细胞与表达重组受体(例如CAR)的CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物具有为或约3:1、2.8:1、2.5:1、2.25:1、2:1、1.8:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1, 1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.8、1:2、1:2.25、1:2.5、1:2.8、1:3的比率。

[0542] 在特定实施方案中,至少80%、至少85%或至少90%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在3:1与1:3之间、在2.5:1与1:2.5之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.4:1与1:1.4之间、在1.3:1与1:1.3之间、在1.2:1与1:1.2之间、或在1.1:1与1:1.1之间的表达重组受体(例如CAR)的CD4+T细胞与表达重组受体(例如CAR)的CD8+T细胞的比率。在某些实施方案中,至少90%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在1:2与2:1之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。在特定实施方案中,至少90%的通过本文提供的方法生产的输出组合物具有在1.5:1与1:1.5之间、在1.25:1与1:1.25之间、在1.1:1与1:1.1之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率。

[0543] 在一些实施方案中,与所提供的方法结合产生或生产的输出组合物含有表达重组受体(例如TCR或CAR)的细胞。在一些实施方案中,表达重组受体可以包括但不限于使一种或多种重组受体蛋白定位于细胞膜和/或细胞表面,具有可检测量的重组受体蛋白,具有可检测量的编码重组受体的mRNA,具有或含有编码重组受体的重组多核苷酸,和/或具有或含有作为重组受体表达的替代标记的mRNA或蛋白质。

[0544] 在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约97%、至少或至少约99%、或超过99%表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或至少约50%表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约97%、至少或至少约99%、或超过99%的CD3+T细胞表达重组受体。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约50%的CD3+T细胞表达重组受体。在特定实施方案中,输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约97%、至少或至少约99%、或超过99%的CD4+T细胞表达重组受体。在特定实施方案中,输出组合物中的至少或至少约50%的CD4+T细胞表达重组受体。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约65%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约97%、至少或至少约99%、或超过99%的CD8+T细胞表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约50%的CD8+T细胞表达重组受体。

[0545] 在特定实施方案中,输出组合物含有至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的活细胞。在一些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约75%的活细胞。在某些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的活细胞。在一些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的活CD3+T细胞。在特定实施方案中,输出组合物含有至少或至少约75%的活CD3+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的活CD3+T细胞。在一些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的活CD4+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约75%的活CD4+T细胞。在特定实施方案中,输出组合物含有至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的活CD4+T细胞。在特定实施方案中,输出组合物含有至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的活CD8+T细胞。在一些实施方案中,输出组合物含有至

少或至少约75%的活CD8+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物含有至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的活CD8+T细胞。

[0546] 在特定实施方案中,输出细胞具有低份额和/或频率的细胞正在经历和/或被准备、引发和/或进入凋亡。在特定实施方案中,输出细胞具有低份额和/或频率的细胞呈凋亡标记阳性。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、或小于或小于约1%表达、含有凋亡标记和/或呈凋亡标记阳性。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约25%表达、含有凋亡标记和/或呈凋亡标记阳性。在某些实施方案中,输出组合物的细胞的小于或小于约10%表达、含有凋亡标记、和/或呈凋亡标记阳性。

[0547] 在特定实施方案中,输出组合物中的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的表达重组受体(例如CAR+)的细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的表达重组受体(例如CAR+)的细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约90%的表达重组受体(例如CAR+)的细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在特定实施方案中,输出组合物中的至少或至少约90%的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的表达重组受体(例如CAR+)的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在特定实施方案中,输出组合物中的至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的表达重组受体(例如CAR+)的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或至少约90%的表达重组受体(例如CAR+)的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。

[0548] 在特定实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的表达重组受体(例如CAR+)的细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如

半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的表达重组受体(例如CAR+)的细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约90%的表达重组受体(例如CAR+)的细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在特定实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约90%的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、至少或至少约99%、或至少或至少约99.9%的表达重组受体(例如CAR+)的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在特定实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少85%、至少90%或至少95%的表达重组受体(例如CAR+)的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少90%的表达重组受体(例如CAR+)的CD3+T细胞是活细胞,例如,呈凋亡标记(如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶3))阴性的细胞。在任何进行的实施方案中,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物可以源自相同或不同的供体。在一些方面,所述多种输出组合物中的至少两种源自不同的供体。在一些方面,所述多种输出组合物中的每一种都源自许多不同供体之一,所述供体例如来自约2、约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、或超过约60名不同的供体,例如需要细胞疗法(如CAR-T细胞疗法)的患者。

[0549] 在特定实施方案中,输出组合物中的大多数细胞是幼稚、中枢记忆和/或效应记忆细胞。在特定实施方案中,输出组合物中的大多数细胞是幼稚或中枢记忆细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的大多数细胞是中枢记忆细胞。在一些方面,分化较低的细胞(例如中枢记忆细胞)寿命更长,并且耗竭速度较慢,从而增加了持久性和耐久性。在一些方面,对细胞疗法(如CAR-T细胞疗法)的反应者具有增加的中枢记忆基因的表达。参见例如, Fraietta等人(2018)Nat Med.24(5):563-571。

[0550] 在某些实施方案中,输出组合物中的细胞具有高份额和/或频率的中枢记忆细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约

80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%是中枢记忆T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%、在为或约45%与为或约50%、在为或约50%与为或约55%、在为或约55%与为或约60%、或在为或约60%与为或约65%之间具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%的T细胞具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的T细胞具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%、在为或约45%与为或约50%、在为或约50%与为或约55%、在为或约55%与为或约60%、或在为或约60%与为或约65%之间的T细胞具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%的CD4+T细胞是中枢记忆CD4+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的CD4+T细胞是中枢记忆CD4+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%、在为或约45%与为或约50%、在为或约50%与为或约55%、在为或约55%与为或约60%、或在为或约60%与为或约65%之间的CD4+T细胞是中枢记忆CD4+T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%的CD4+CAR+T细胞是中枢记忆CD4+CAR+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的CD4+CAR+T细胞是中枢记忆CD4+CAR+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%、在为或约45%与为或约50%、在为或约50%与为或约55%、在为或约55%与为或约60%、或在为或约60%与为或约65%之间的CD4+CAR+T细胞是中枢记忆CD4+CAR+T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%的CD8+T细胞是中枢记忆CD8+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的CD8+T细胞是中枢记忆CD8+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%、在为或约45%与为或约50%、在为或约50%与为或约55%、在为或约55%与为或约60%、或在为或约60%与为或约65%之间的CD8+T细胞是中枢记忆CD8+T细胞。在一些实施方案中,输

出组合物中的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%的CD8+CAR+T细胞是中枢记忆CD8+CAR+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的CD8+CAR+T细胞是中枢记忆CD8+CAR+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%、在为或约45%与为或约50%、在为或约50%与为或约55%、在为或约55%与为或约60%、或在为或约60%与为或约65%之间的CD8+CAR+T细胞是中枢记忆CD8+CAR+T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%的CAR+T细胞(例如,CD4+T细胞和CD8+T细胞)是中枢记忆CD4+或CD8+T细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的CAR+T细胞(例如,CD4+T细胞和CD8+T细胞)是中枢记忆CD4+或CD8+T细胞。在一些实施方案中,组合物中的细胞的至少或为或约30%、至少或为或约40%、至少或为或约50%、至少或为或约60%、至少或为或约70%、至少或为或约75%、至少或为或约80%、至少或为或约85%、至少或为或约90%、至少或为或约95%、或大于95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-和/或CD127+。在一些实施方案中,组合物中的至少或为或约50%、至少或为或约55%、至少或为或约60%、或至少或为或约65%的CAR+T细胞呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-和/或CD127+。

[0551] 在一些实施方案中,所述方法的迭代产生多种输出组合物,任选地从人生物样品中产生,其中所述方法在多名不同的个体受试者中进行。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的具有记忆表型的细胞的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的具有中枢记忆表型的细胞的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的为CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-和/或CD127+的细胞的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的为CCR7+/CD45RA-或CCR7+/CD45RO+的细胞的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的工程化CD4+T细胞(例如,CAR+CD4+T细胞)中的中枢记忆CD4+T细胞的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约

45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的工程化CD8+T细胞(例如,CAR+CD8+T细胞)中的中枢记忆CD8+T细胞的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。在一些实施方案中,在所述多种输出组合物中的工程化T细胞(例如,CAR+T细胞)中的中枢记忆T细胞(例如,CD4+中枢记忆T细胞和CD8+中枢记忆T细胞)的均值(即,平均)或中值百分比在为或约40%与为或约65%之间、在为或约40%与为或约45%之间、在为或约45%与为或约50%之间、在为或约50%与为或约55%之间、在为或约55%与为或约60%之间、或在为或约60%与为或约65%之间。

[0552] 在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的细胞的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的细胞的至少或为或约至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、或至少或至少约65%具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的细胞的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-和/或CD127+。在一些实施方案中,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的细胞的至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、或至少或至少约65%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-和/或CD127+。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%的T细胞具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或为或约至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、或至少或至少约65%的T细胞具有记忆表型、具有中枢记忆表型或者是中枢记忆T细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%的CD4+T细胞是中枢记忆CD4+T细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或为或约至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、或至少或至少约65%的CD4+T细胞是中枢记忆CD4+T细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约

75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%的CD8+T细胞是中枢记忆CD8+T细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或为或约至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、或至少或至少约65%的CD8+T细胞是中枢记忆CD8+T细胞。在一些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或至少约30%、至少或至少约40%、至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%的CD4+T细胞和CD8+T细胞是中枢记忆CD4+或CD8+T细胞。在某些实施方案中,平均而言,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物中的至少或为或约至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、或至少或至少约65%的CD4+T细胞和CD8+T细胞是中枢记忆CD4+或CD8+T细胞。在任何进行的实施方案中,通过本文公开的方法生产的多种输出组合物可以源自相同或不同的供体。在一些方面,所述多种输出组合物中的至少两种源自不同的供体。在一些方面,所述多种输出组合物中的每一种都源自许多不同供体之一,所述供体例如来自约2、约5、约10、约15、约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、或超过约60名不同的供体,例如需要细胞疗法(如CAR-T细胞疗法)的患者。

[0553] 在某些实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的被耗竭和/或是衰老的细胞。在特定实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的被耗竭和/或是衰老的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、或小于或小于约1%被耗竭和/或是衰老的。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约25%被耗竭和/或是衰老的。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约10%被耗竭和/或是衰老的。

[0554] 在一些实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的对于CD27和CD28表达(例如表面表达)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的CD27-CD28-细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、或小于或小于约1%是CD27-CD28-细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约25%是CD27-CD28-细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约10%是CD27-CD28-细胞。在实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约5%是CD27-CD28-细胞。

[0555] 在某些实施方案中,输出组合物的细胞具有高份额和/或频率的对于CD27和CD28表达(例如表面表达)呈阳性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞具有高份额和/或频率的CD27+CD28+细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或至少约50%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约75%、至少或至少约80%、至少或至少约85%、至少或至少约90%、至少或至少约95%、或大于或大于约95%是CD27+CD28+细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约25%是CD27-CD28-细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或至少约50%是CD27+CD28+细胞。在实施方案中,输出组合物中的细胞的至少或至少约75%是CD27+CD28+细胞。

[0556] 在特定实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的为 T_{EMRA} 细胞的细胞。在特定实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的 T_{EMRA} 细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、或小于或小于约1%是 T_{EMRA} 细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约25%是 T_{EMRA} 细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或约10%是 T_{EMRA} 细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约5%是 T_{EMRA} 细胞。

[0557] 在某些实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的对于CCR7呈阴性和对于CD45RA表达(例如表面表达)呈阳性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物的细胞具有低份额和/或频率的CCR7-CD45RA+细胞。在特定实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约40%、小于或小于约35%、小于或小于约30%、小于或小于约25%、小于或小于约20%、小于或小于约15%、小于或小于约10%、小于或小于约5%、或小于或小于约1%是CCR7-CD45RA+细胞。在一些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约25%是CCR7-CD45RA+细胞。在特定实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约10%是CCR7-CD45RA+细胞。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的小于或小于约5%是CCR7-CD45RA+细胞。

[0558] 在某些实施方案中,输出组合物的细胞与通过替代性过程生产的输出细胞具有相似的响应于抗原刺激的细胞因子产生。在一些实施方案中,输出组合物的细胞与通过示例性、替代性过程生产的输出细胞具有相似的响应于抗原刺激的细胞因子(例如,TNF- α 、IFN- γ 和/或IL-2)产生。在一些实施方案中,与替代性过程相比,输出组合物的细胞具有、具有约或具有至少50%、60%、70%、75%、80%、90%、100%、125%、150%、1倍、2倍、3倍、4倍或5倍增加的响应于抗原的刺激的一种或多种细胞因子产生。在一些实施方案中,可以通过标准已知技术来测量或评估细胞因子产生,所述标准已知技术包括但不限于ELISA和/或基于抗体的检测方法。

[0559] 在特定实施方案中,输出组合物的细胞具有与通过替代性过程生产的输出细胞的部分、百分比和/或量相似的响应于抗原刺激产生一种或多种细胞因子的细胞的部分、百分比和/或量。在某些实施方案中,输出组合物中的细胞的约或至少10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、或100%响应于抗原刺激产生一种或多种细胞因子(例如TNF- α 、IFN- γ 和/或IL-2)。在特定实施方案中,产生所述一种或多种细胞因子的输出组合物的细胞的部分、百分比和/或量比通过替代性过程生产的、产生所述一种或多种细胞因子的输出细胞的部分、百分比和/或量高了约或至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%、100%、125%、150%、或1倍、2倍、3倍。在某些实施方案中,可以通过任何已知或标准技术(包括细胞内细胞因子染色(ICS)测定)来测量或评估产生细胞因子的细胞的部分、百分比和/或量。

[0560] 在特定实施方案中,输出组合物含有表达重组受体(例如CAR)的功能细胞。在一些实施方案中,至少一部分表达重组受体的细胞响应于抗原刺激而产生一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子包括但不限于IL-2、TNF- α 和/或IFN- γ 。在一些实施方案中,测试、评估和/或测量输出组合物的细胞(例如输出细胞的样品和/或一部分)的抗原刺激的功能和/或活性。在某些实施方案中,通过能够测量细胞因子产生、表达

和/或分泌的任何已知测定来测试细胞在抗原刺激后或期间的细胞因子产生。在一些实施方案中,用内部细胞因子染色(ICS)测定来测试细胞。在特定实施方案中,如通过ICS所测量的,在抗原刺激后,表达重组受体的至少25%的CD4+细胞和至少15%的CD8+细胞呈IL-2阳性。在一些实施方案中,如通过ICS所测量的,在抗原刺激后,表达重组受体的至少5%的CD4+细胞和至少5%的CD8+细胞呈IFN- γ 阳性。在某些实施方案中,如通过ICS所测量的,在抗原刺激后,表达重组受体的至少40%的CD4+细胞和至少20%的CD8+细胞呈TNF- α 阳性。在某些实施方案中,如通过ICS所测量的,在抗原刺激后,表达重组受体的至少2.5%的CD4+细胞和至少2%的CD8+细胞对于IL-2、IFN- γ 和TNF- α 中的全部呈阳性。

[0561] 在某些实施方案中,至少一部分表达重组受体的细胞响应于激活或刺激(例如,一般激活或刺激、T细胞激活或刺激、和/或通过PMA和离子霉素的激活或刺激)产生一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子包括但不限于IL-2、TNF- α 和/或IFN- γ 。在某些实施方案中,测试、评估和/或测量输出组合物的细胞(例如输出细胞的样品和/或一部分)的通过例如用PMA和离子霉素进行激活或刺激的功能和/或活性。在某些实施方案中,通过能够测量细胞因子产生、表达和/或分泌的任何已知测定(例如用ICS测定)来测试细胞在激活或刺激后或期间的细胞因子产生。在一些实施方案中,将细胞用PMA和离子霉素刺激,并用ICS测定评估。在一些实施方案中,如通过ICS所测量的,在用PMA和离子霉素刺激或激活后,表达重组受体的至少50%的CD4+细胞和至少25%的CD8+细胞呈IL-2阳性。在一些实施方案中,如通过ICS所测量的,在用PMA和离子霉素刺激或激活后,表达重组受体的至少30%的CD4+细胞和至少10%的CD8+细胞呈IFN- γ 阳性。在某些实施方案中,如通过ICS所测量的,在用PMA和离子霉素刺激或激活后,表达重组受体的至少50%的CD4+细胞和至少15%的CD8+细胞呈TNF- α 阳性。在某些实施方案中,如通过ICS所测量的,在用PMA和离子霉素刺激或激活后,表达重组受体的至少10%的CD4+细胞和至少5%的CD8+细胞对于IL-2、IFN- γ 和TNF- α 中的全部呈阳性。

[0562] 在一些实施方案中,将输出组合物的细胞给予至受试者,例如患有疾病或病症(如癌症)的受试者提高了存活的可能性和/或可能性。例如,在一些实施方案中,将输出组合物的细胞给予至患有疾病或病症的受试者,存活为、约或至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月以上、或者为1、2、3、4、5、10年或超过10年以上的可能性和/或可能性是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。在某些实施方案中,与使用替代性过程的输出细胞给予相比,用输出组合物的细胞给予提供至少10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、或者至少1倍、2倍、3倍、4倍或5倍更大的可能性和/或可能性。

[0563] 在某些实施方案中,将输出组合物的细胞给予至受试者。在一些实施方案中,给予输出组合物的细胞以治疗疾病或病症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症。在一些实施方案中,将输出组合物的细胞给予至受试者,并且受试者经历癌细胞和/或肿瘤体积的减少。在一些实施方案中,例如,与在给予之前受试者中癌细胞的量和/或肿瘤体积相比,受试者在给予输出组合物的细胞后具有、具有约或具有至少25%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、100%的癌细胞的量和/或肿瘤体积的减少。在一些实施方案中,与在给予通过示例性替代性过程生产的输出细胞后受试者的肿瘤体积和/或癌细胞的量的减少相比,给予输出组合物的细胞导致受试者的肿瘤体积和/或癌细胞的

量的增加。在特定实施方案中,与在给予通过示例性替代性过程生产的输出细胞后受试者的肿瘤体积和/或癌细胞的量的减少相比,给予输出组合物的细胞导致受试者的肿瘤体积和/或癌细胞的量的减少增加了为、约或至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、1倍、2倍、3倍、4倍、或5倍。

[0564] 在特定实施方案中,将输出组合物的细胞(例如输出组合物的细胞的一部分和/或剂量)给予至受试者。在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有达到和/或经历完全反应(CR)的概率和/或可能性。在某些实施方案中,达到和/或经历CR的可能性和/或概率是至少或至少约10%、至少或至少约15%、至少或至少约20%、至少或至少约25%、至少或至少约30%、至少或至少约35%、至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约90%、或至少或至少约95%。在某些实施方案中,达到和/或经历CR的概率和/或可能性是至少或至少约25%。在特定实施方案中,达到CR的概率和/或可能性是至少或至少约50%。

[0565] 在某些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有达到和/或经历ORR的概率和/或可能性。在某些实施方案中,达到和/或经历ORR的可能性和/或概率是至少或至少约40%、至少或至少约45%、至少或至少约50%、至少或至少约55%、至少或至少约60%、至少或至少约70%、至少或至少约80%、至少或至少约90%、或至少或至少约95%。在某些实施方案中,达到和/或经历ORR的概率和/或可能性是至少或至少约80%。在特定实施方案中,达到ORR的概率和/或可能性是至少或至少约90%。在某些实施方案中,达到ORR的概率和/或可能性是或约100%。

[0566] 在一些实施方案中,输出细胞的功效(例如在给予输出组合物的细胞后受试者将实现和/或经历CR或ORR的概率)大于含有通过替代性过程生产的表达重组受体的细胞的治疗性细胞组合物的功效。在某些实施方案中,与给予通过替代性过程生产的治疗性细胞组合物的细胞相比,在给予输出细胞后存在至少或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、1倍、2倍、5倍、10倍、50倍、或100倍更高的达到CR或ORR的概率。

[0567] 在特定实施方案中,输出组合物的细胞与通过示例性替代性过程生产的输出细胞具有相似的针对表达由重组受体结合和/或识别的抗原的细胞(例如靶细胞)的细胞溶解活性。在一些实施方案中,当输出组合物的细胞暴露于表达抗原的细胞(例如靶细胞)时,输出组合物的细胞杀死、杀死约、或杀死至少或至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%的表达抗原的细胞。在某些实施方案中,与在相似或相同条件下通过示例性替代性过程生产的输出细胞相比,输出组合物的细胞杀死至少或至少约25%、50%、75%、100%、150%、或1倍、2倍、3倍、4倍、或5倍更多的表达抗原的细胞(例如靶细胞)。

[0568] 在一些实施方案中,通过本文提供的方法生产的输出细胞具有高和/或相对高的安全程度。在一些实施方案中,将输出组合物的细胞(例如输出组合物的细胞的一部分和/或剂量)给予至受试者。在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于或小于约80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、或5%的经历毒性(例如CRS或神经毒性)的风险、概率和/或可能性。在一些实施方案中,毒性是任何级别的神

经毒性或CRS。在某些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于80%的经历任何级别的CRS或神经毒性的风险、概率和/或可能性。在特定实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于80%的经历任何级别的CRS或神经毒性的风险、概率和/或可能性。

[0569] 在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于或小于约50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、或5%的经历3级或更高级别的CRS的风险、概率和/或可能性。在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于10%的经历3级或更高级别的CRS的风险、概率和/或可能性。在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于5%的经历3级或更高级别的CRS的风险、概率和/或可能性。

[0570] 在某些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于或小于约50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、或5%或者为或为约0%、和/或可忽略不计的经历3级或更高级别的神经毒性的风险、概率和/或可能性。在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有小于5%的经历3级或更高级别的神经毒性的风险、概率和/或可能性。在一些实施方案中,被给予输出组合物的细胞的受试者具有约0%和/或可忽略不计的经历3级或更高级别的神经毒性的风险、概率和/或可能性。

[0571] II. 无血清培养基配方和相关组分

[0572] 本申请提供了无血清培养基,其含有合成氨基酸(例如,二肽形式的L-谷氨酰胺,例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)、游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)、和至少一种蛋白质。本申请还提供了包含至少一种合成氨基酸(例如,二肽形式的L-谷氨酰胺,例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的液体基础培养基,其中所述基础培养基不含游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)和蛋白质。本申请还提供了一种冷冻补充剂,其包含游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺),以及在一些情况下,至少一种蛋白质,如血清替代蛋白质。可以添加一种或多种另外的补充剂,包括含有至少一种蛋白质(例如血清替代蛋白质)或支持细胞生长和扩增的一种或多种其他组分的一种或多种补充剂。在一些实施方案中,合成氨基酸(例如,二肽形式的L-谷氨酰胺,例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约0.5mM至为或约5mM(如2mM)。在一些实施方案中,L-谷氨酰胺的浓度是为或约0.5mM至为或约5mM(如2mM)。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是人蛋白质或重组蛋白质,如血清替代蛋白质,例如白蛋白。在一些实施方案中,无血清培养基还包含一种或多种细胞因子(如IL-2、IL-7或IL-15)。在一些实施方案中,无血清培养基不包含酚红。

[0573] 在一些实施方案中,所提供的无血清培养基由液体基础培养基和一种或多种补充剂生产或制备。

[0574] 在一些实施方案中,提供了液体基础培养基,其含有能够在细胞培养物中转化为L-谷氨酰胺的合成氨基酸,例如为二肽形式的L-谷氨酰胺(例如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的合成氨基酸。在一些情况下,基础培养基不含有L-谷氨酰胺和蛋白质。在一些实施方案中,合成氨基酸(例如,二肽形式的L-谷氨酰胺,例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约0.5mM至为或约5mM(如2mM)。在一些实施方案中,至少一种蛋白质是人源蛋白、重组蛋白或两者。在一些实施方案中,基础培养基不包含酚红。

[0575] 在一些实施方案中,提供了包含至少一种蛋白质和游离形式的谷氨酰胺(例如L-谷氨酰胺)的补充剂,其中所述补充剂被冷冻或已经在L-谷氨酰胺变成所述补充剂的组分

之后被冷冻。在一些实施方案中,补充剂中的L-谷氨酰胺的浓度小于200mM,例如小于150mM、100mM或更小,例如20mM至120mM、或40mM至100mM,例如或约80mM。在一些实施方案中,在补充剂已经与基础培养基组合之后,L-谷氨酰胺的浓度为约0.5mM至约5mM(如2mM)。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质不是非哺乳动物来源的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是人蛋白质或人源蛋白或是重组的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质包括白蛋白,例如人或重组人白蛋白。

[0576] A. 基础培养基

[0577] 在一些实施方案中,基础培养基包含氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸包含天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、正缬氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸和/或脯氨酸。

[0578] 在一些实施方案中,基础培养基包含至少一种合成氨基酸。在一些实施方案中,合成氨基酸能够在包含细胞的细胞培养物中转化成游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,细胞包含人细胞。在一些实施方案中,细胞包含免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化T细胞。在一些实施方案中,将细胞基因工程化以表达重组受体(例如,嵌合抗原受体)。在一些实施方案中,细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0579] 在一些实施方案中,合成氨基酸是谷氨酰胺的稳定形式(即L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在水性溶液(例如基础培养基)中比谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)更稳定。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中不产生显著量的谷氨酰胺。在一些实施方案中,合成氨基酸不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少约1、3、5、7、9、11、13或14天不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少约1、2、3、4、5、6、7或8周不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少1、2、3、4或5年不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少约1、3、5、7、9、11、13或14天不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少约1、2、3、4、5、6、7或8周不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在基础培养基中至少1、2、3、4或5年不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。

[0580] 在一些实施方案中,合成氨基酸可溶于水性溶液(例如基础培养基)中。在一些实施方案中,与游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)相比,合成氨基酸在水性溶液中的溶解度更高。

[0581] 在一些实施方案中,合成氨基酸能够被转运到细胞中,其中它可以被转化成游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,细胞包含免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化T细胞。在一些实施方案中,将细胞基因工程化以表达重组受体(例如,嵌合抗

原受体)。在一些实施方案中,细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0582] 在一些实施方案中,合成氨基酸是二肽。在一些实施方案中,合成氨基酸是三肽。在一些实施方案中,合成氨基酸是二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)。

[0583] 在一些实施方案中,基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为约0.5mM-5mM。在一些实施方案中,基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为为或约2mM。在一些实施方案中,二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为为或约0.5mM-1mM、0.5mM-1.5mM、0.5mM-2mM、0.5mM-2.5mM、0.5mM-3mM、0.5mM-3.5mM、0.5mM-4mM、0.5mM-4.5mM、0.5mM-5mM、1mM-1.5mM、1mM-2mM、1mM-2.5mM、1mM-3mM、1mM-3.5mM、1mM-4mM、1mM-4.5mM、1mM-5mM、1.5mM-2mM、1.5mM-2.5mM、1.5mM-3mM、1.5mM-3.5mM、1.5mM-4mM、1.5mM-4.5mM、1.5mM-5mM、2mM-2.5mM、2mM-3mM、2mM-3.5mM、2mM-4mM、2mM-4.5mM、2mM-5mM、2.5mM-3mM、2.5mM-3.5mM、2.5mM-4mM、2.5mM-4.5mM、2.5mM-5mM、3mM-3.5mM、3mM-4mM、3mM-4.5mM、3mM-5mM、3.5mM-4mM、3.5mM-4.5mM、3.5mM-5mM、4mM-4.5mM、4mM-5mM、或4.5mM-5mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为为或约5mM-7.5mM、5mM-10mM、5mM-12.5mM、5mM-15mM、5mM-17.5mM、5mM-20mM、7.5mM-10mM、7.5mM-12.5mM、7.5mM-15mM、7.5mM-17.5mM、7.5mM-20mM、10mM-12.5mM、10mM-15mM、10mM-17.5mM、10mM-20mM、12.5mM-15mM、12.5mM-17.5mM、12.5mM-20mM、15mM-17.5mM、15mM-20mM、或17.5mM-20mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是至少约为或0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、或5mM。在一些实施方案中,基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度为为或约2mM。在一些实施方案中,基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是至多或至多约2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、5.5mM、6mM、6.5mM、7mM、7.5mM、8mM、8.5mM、9mM、9.5mM、10mM、12.5mM、15mM、17.5mM、或20mM。

[0584] 在一些实施方案中,基础培养基不包含L-谷氨酰胺或不包含显著量的L-谷氨酰胺。在一些实施方案中,基础培养基包含L-谷氨酰胺。在一些实施方案中,基础培养基中的L-谷氨酰胺的浓度为为或约或小于或小于约0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、或0.5mM。在一些实施方案中,基础培养基中的L-谷氨酰胺的浓度为为或约或小于或小于约1mM、2mM、3mM、4mM、或5mM。

[0585] 在一些实施方案中,在基础培养基中提供了一种或多种氨基酸,包括能够被转化成游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)的至少一种合成氨基酸,例如二肽形式的L-谷氨酰胺,如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。在一些实施方案中,基础培养基是人工或合成培养基。在一些实施方案中,基础培养基是平衡盐溶液(例如,PBS、DPBS、HBSS、EBSS)。在一些实施方案中,基础培养基选自达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)、最低必需培养基(MEM)、基础培养基Eagle(BME)、F-10、F-12、RPMI 1640、格拉斯哥最低必需培养基(GMEM)、阿尔法基本必需培养基(α MEM)、伊斯科夫改良的达尔伯克培养基和M199。在一些实施方案中,基础培养基是复杂培养基(例如,RPMI-1640、IMDM)。在一些实施方案中,基础培养基是OpTmizerTMCTSTMT细胞扩增基础培养基(ThermoFisher)。

[0586] 在一些实施方案中,基础培养基包含无机盐、糖、氨基酸的营养混合物,所述营养

混合物任选地还含有维生素、有机酸、抗氧化剂和/或缓冲液。

[0587] 在一些实施方案中,基础培养基包含 CO_3 和 HCO_3 。在一些实施方案中,基础培养基的 CO_3/HCO_3 的含量与气态 CO_2 (例如5%-10%)平衡,从而维持培养基中的最佳pH。在一些实施方案中,基础培养基包含两性离子HEPES。在一些实施方案中,基础培养基包含酚红。在一些实施方案中,基础培养基不包含酚红。

[0588] 在一些实施方案中,基础培养基包含无机盐。在一些实施方案中,无机盐促进渗透平衡。在一些实施方案中,无机盐通过提供钠、钾和钙离子来调节膜电位。

[0589] 在一些实施方案中,基础培养基包含一种或多种碳水化合物。在一些实施方案中,碳水化合物包含葡萄糖。在一些实施方案中,碳水化合物包含半乳糖。在一些实施方案中,碳水化合物包含麦芽糖。在一些实施方案中,碳水化合物包含果糖。

[0590] 在一些实施方案中,基础培养基包含脂肪酸。在一些实施方案中,基础培养基包含脂质。在一些实施方案中,基础培养基包含维生素(例如,维生素A、维生素B7、维生素B9、维生素B12、维生素C、维生素E)。在一些实施方案中,基础培养基包含微量元素。在一些实施方案中,微量元素包含铜。在一些实施方案中,微量元素包含锌。在一些实施方案中,微量元素包含硒。在一些实施方案中,微量元素包含三羧酸中间体。

[0591] 在一些实施方案中,基础培养基含有无机盐、糖、氨基酸和任选地维生素、有机酸和/或缓冲液或其他熟知的细胞培养营养素的混合物。除了营养素外,所述培养基还有助于维持pH和重量摩尔渗透压浓度。在一些方面,基础培养基的试剂支持细胞生长、增殖和/或扩增。多种可商购获得的基础培养基对本领域技术人员而言是熟知的,并且包括达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)、罗斯威尔公园纪念学院培养基(Roswell Park Memorial Institute Medium, RPMI)、伊斯科夫改良的达尔伯克培养基和哈氏(Hams)培养基。在一些实施方案中,基础培养基是伊斯科夫改良的达尔伯克培养基、RPMI-1640或 α -MEM。

[0592] 在一些实施方案中,基础培养基不含蛋白质。在一些实施方案中,基础培养基不含人蛋白质(例如人血清蛋白)。在一些实施方案中,基础培养基是无血清的。在一些实施方案中,基础培养基不含源自人的血清。在一些实施方案中,基础培养基不含重组蛋白。在一些实施方案中,基础培养基不含人蛋白质和重组蛋白。

[0593] 在一些实施方案中,基础培养基包含蛋白质或肽。在一些实施方案中,所述蛋白质是白蛋白或白蛋白替代物。在一些实施方案中,白蛋白是人源白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是重组白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是天然人血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是重组人血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是来自非人来源的重组白蛋白。白蛋白替代物可以是任何蛋白质或多肽来源。此类蛋白质或多肽样品的例子包括但不限于牛垂体提取物、植物水解物(例如稻水解物)、胎牛白蛋白(胎球蛋白)、卵白蛋白、人血清白蛋白(HSA)或其他动物来源的白蛋白、小鸡提取物、牛胚提取物、AlbuMAX®I和AlbuMAX®II。在一些实施方案中,蛋白质或肽包含转铁蛋白。在一些实施方案中,蛋白质或肽包含纤连蛋白。在一些实施方案中,蛋白质或肽包含抑肽酶。在一些实施方案中,蛋白质包含胎球蛋白。

[0594] 在一些实施方案中,基础培养基(例如基础培养基)是液体配制品。在一些实施方案中,在预期用途之前,基础培养基(例如基础培养基)尚未被冷冻或被指示不被冷冻(例如,根据其方案)。在一些实施方案中,将基础培养基储存在为或约2°C至8°C下。在一些实施

方案中,将基础培养基储存在室温下。在一些实施方案中,当储存在2℃至8℃下时,基础培养基稳定至少或至少约1、2、3、4、5或6周。在一些实施方案中,当储存在2℃至8℃下时,基础培养基稳定至少或至少约1、2、3、4、5或6个月。

[0595] B. 补充剂

[0596] 在一些实施方案中,本文提供了包含游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)的补充剂,如第一补充剂。在一些实施方案中,在使用和/或掺入基础培养基中之前将这样的补充剂冷冻。在一些实施方案中,补充剂(如本文所述的这些)旨在用作培养基补充剂(例如,用于基础培养基的培养基补充剂)。在一些实施方案中,第一补充剂旨在用作细胞的维持、扩增和/或激活的补充剂。在一些实施方案中,第一补充剂旨在用作细胞扩增的补充剂。在一些实施方案中,第一补充剂包含含有至少一种蛋白质和游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)的冷冻补充剂,其中补充有所述第一补充剂的基础细胞培养基能够支持细胞的扩增。在一些实施方案中,细胞是原代细胞。在一些实施方案中,细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是CD4 T细胞或CD8 T细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人的细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人的免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人的T细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人的原代免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化细胞。在一些实施方案中,细胞是源自人的基因工程化细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人的基因工程化T细胞(例如,表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞)。

[0597] 在一些实施方案中,第一补充剂在其预期用途之前被储存或被建议储存在为或约-20℃至为或约0℃下。在一些实施方案中,补充剂被储存或被建议储存在小于约0℃下。在一些实施方案中,在游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)变成补充剂的组分之后立即或快速冷冻补充剂,直到将补充剂用于其预期用途时为止。在一些实施方案中,在游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)变成补充剂的组分之后的大部分时间将补充剂冷冻,直到将补充剂用于其预期用途时为止。在一些实施方案中,在游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)变成补充剂的组分之后超过1、2、3、4、5、6或7天将补充剂不作为液体保持,直到将补充剂用于其预期用途时为止。在一些实施方案中,在游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)变成补充剂的组分之后超过或超过约4、8、12、16、20或24小时将补充剂不作为液体保持,直到将补充剂用于其预期用途时为止。在一些实施方案中,在游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)变成补充剂的组分之前和之后的大部分时间将补充剂冷冻,直到将补充剂用于其预期用途时为止。在一些实施方案中,当游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)变成补充剂的组分时,补充剂处于或低于室温(例如,补充剂的温度低于或低于约20℃、15℃、10℃、5℃或0℃)。

[0598] 在一些实施方案中,当将补充剂解冻时,补充剂中的L-谷氨酰胺不沉淀。在一些实施方案中,当补充剂是液体时,补充剂中的L-谷氨酰胺不沉淀。在一些实施方案中,当将补充剂在室温下解冻时,补充剂中的L-谷氨酰胺不沉淀。在一些实施方案中,补充剂中的L-谷氨酰胺的浓度为为或约或小于或小于约200mM、180mM、160mM、140mM、120mM、100mM或80mM。在一些实施方案中,补充剂中的L-谷氨酰胺的浓度是为或约10mM至为或约30mM、为或约10mM至为或约50mM、为或约10mM至为或约70mM、为或约10mM至为或约90mM、为或约10mM至为或约110mM、为或约10mM至为或约130mM、为或约10mM至为或约150mM、为或约10mM至为或约170mM、为或约30mM至为或约50mM、为或约30mM至为或约70mM、为或约30mM至为或约90mM、为

或约30mM至为或约110mM、为或约30mM至为或约130mM、为或约30mM至为或约150mM、为或约30mM至为或约170mM、为或约50mM至为或约70mM、为或约50mM至为或约90mM、为或约50mM至为或约110mM、为或约50mM至为或约130mM、为或约50mM至为或约150mM、为或约50mM至为或约170mM、为或约70mM至为或约90mM、为或约70mM至为或约110mM、为或约70mM至为或约130mM、为或约70mM至为或约150mM、为或约70mM至为或约170mM、为或约90mM至为或约110mM、为或约90mM至为或约130mM、为或约90mM至为或约150mM、为或约90mM至为或约170mM、为或约110mM至为或约130mM、为或约110mM至为或约150mM、为或约110mM至为或约170mM、为或约130mM至为或约150mM、为或约130mM至为或约170mM、或为或约150mM至为或约170mM。在一些实施方案中,补充剂中的L-谷氨酰胺的浓度为约80mM。

[0599] 在一些实施方案中,补充剂中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为或为约0.5mM-5mM。在一些实施方案中,基础培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为或为约2mM。在一些实施方案中,游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为或为约0.5mM-1mM、0.5mM-1.5mM、0.5mM-2mM、0.5mM-2.5mM、0.5mM-3mM、0.5mM-3.5mM、0.5mM-4mM、0.5mM-4.5mM、0.5mM-5mM、1mM-1.5mM、1mM-2mM、1mM-2.5mM、1mM-3mM、1mM-3.5mM、1mM-4mM、1mM-4.5mM、1mM-5mM、1.5mM-2mM、1.5mM-2.5mM、1.5mM-3mM、1.5mM-3.5mM、1.5mM-4mM、1.5mM-4.5mM、1.5mM-5mM、2mM-2.5mM、2mM-3mM、2mM-3.5mM、2mM-4mM、2mM-4.5mM、2mM-5mM、2.5mM-3mM、2.5mM-3.5mM、2.5mM-4mM、2.5mM-4.5mM、2.5mM-5mM、3mM-3.5mM、3mM-4mM、3mM-4.5mM、3mM-5mM、3.5mM-4mM、3.5mM-4.5mM、3.5mM-5mM、4mM-4.5mM、4mM-5mM、或4.5mM-5mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,基础培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为或为约5mM-7.5mM、5mM-10mM、5mM-12.5mM、5mM-15mM、5mM-17.5mM、5mM-20mM、7.5mM-10mM、7.5mM-12.5mM、7.5mM-15mM、7.5mM-17.5mM、7.5mM-20mM、10mM-12.5mM、10mM-15mM、10mM-17.5mM、10mM-20mM、12.5mM-15mM、12.5mM-17.5mM、12.5mM-20mM、15mM-17.5mM、15mM-20mM、或17.5mM-20mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,基础培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为至少或至少约0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、或5mM。在一些实施方案中,基础培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为至多或至多约2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、5.5mM、6mM、6.5mM、7mM、7.5mM、8mM、8.5mM、9mM、9.5mM、10mM、12.5mM、15mM、17.5mM、或20mM。

[0600] 在一些实施方案中,第一补充剂含有一种或多种另外的组分。在一些实施方案中,提供另外的补充剂,如第二补充剂,以提供一种或多种另外的组分。在一些实施方案中,所述补充剂(第一补充剂)和任选地一种或多种另外的补充剂(例如第二补充剂)与基础培养基组合,以向所述基础培养基提供一种或多种另外的组分。

[0601] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括至少一种蛋白质。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质不是非哺乳动物来源的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是人的或源自人。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是重组的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、纤连蛋白、抑肽酶或胎球蛋白。在一些实施方案中,蛋白质包含一种或多种白蛋白、胰岛素或转铁蛋白,任选地一种或多种人或重组白蛋白、胰岛素或转铁蛋白。

[0602] 在一些实施方案中,所述蛋白质是白蛋白或白蛋白替代物。在一些实施方案中,白蛋白是人源白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是重组白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是天然人血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是重组人血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是来自非人来源的重组白蛋白。白蛋白替代物可以是任何蛋白质或多肽来源。此类蛋白质或多肽样品的例子包括但不限于牛垂体提取物、植物水解物(例如稻水解物)、胎牛白蛋白(胎球蛋白)、卵白蛋白、人血清白蛋白(HSA)或其他动物来源的白蛋白、小鸡提取物、牛胚提取物、AlbuMAX®I和AlbuMAX®II。

[0603] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是人白蛋白或源自人白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白源自人血清或人血浆。在一些实施方案中,白蛋白是重组白蛋白。在一些实施方案中,重组白蛋白源自人。在一些实施方案中,重组白蛋白不源自人。在一些实施方案中,补充剂包含天然白蛋白。在一些实施方案中,天然白蛋白源自人。在一些实施方案中,天然白蛋白不源自人。在一些实施方案中,补充剂中的白蛋白的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,培养基中的白蛋白的浓度是为或约0mg/mL至为或约2mg/mL、为或约0mg/mL至为或约4mg/mL、为或约0mg/mL至为或约6mg/mL、为或约0mg/mL至为或约8mg/mL、为或约0mg/mL至为或约10mg/mL、为或约0mg/mL至为或约12mg/mL、为或约2mg/mL至为或约4mg/mL、为或约2mg/mL至为或约6mg/mL、为或约2mg/mL至为或约8mg/mL、为或约2mg/mL至为或约10mg/mL、为或约2mg/mL至为或约12mg/mL、为或约4mg/mL至为或约6mg/mL、为或约4mg/mL至为或约8mg/mL、为或约4mg/mL至为或约10mg/mL、为或约4mg/mL至为或约12mg/mL、为或约6mg/mL至为或约8mg/mL、为或约6mg/mL至为或约10mg/mL、为或约6mg/mL至为或约12mg/mL、为或约8mg/mL至为或约10mg/mL、为或约8mg/mL至为或约12mg/mL、为或约10mg/mL至为或约12mg/mL、为或约10mg/mL至为或约15mg/mL,每个都包含端值。在一些实施方案中,培养基中的白蛋白为或为约5mg/mL。

[0604] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括转铁蛋白或转铁蛋白替代物。在一些实施方案中,转铁蛋白替代物是可以替代补充剂中的转铁蛋白以产生与转铁蛋白基本上相似的结果的化合物。转铁蛋白替代物的例子包括但不限于任何铁螯合化合物。可以使用的铁螯合化合物包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-双(β-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、去铁胺甲磺酸盐、二巯基丙醇、二亚乙基三胺五乙酸(DPTA)和反式-1,2-二氨基环己烷-N,N,N',N'-四乙酸(CDTA)的铁螯合物,以及柠檬酸铁螯合物和硫酸亚铁螯合物。在一些实施方案中,转铁蛋白是铁饱和的转铁蛋白。在一些实施方案中,转铁蛋白是铁饱和的人转铁蛋白。

[0605] 在一些实施方案中,转铁蛋白或转铁蛋白替代物是人转铁蛋白或源自人转铁蛋白。在一些实施方案中,转铁蛋白或转铁蛋白替代物源自人血清或血浆。在一些实施方案中,转铁蛋白或转铁蛋白替代物是重组转铁蛋白。在一些实施方案中,转铁蛋白的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,在培养基中的转铁蛋白的浓度是为或约10mg/L至为或约50mg/L、为或约10mg/L至为或约100mg/L、为或约10mg/L至为或约150mg/L、为或约10mg/L至为或约200mg/L、为或约10mg/L至为或约250mg/L、为或约10mg/L至为或约300mg/L、为或约10mg/L至为或约350mg/L、为或约10mg/L至为或约400mg/L、为或约10mg/L至为或约450mg/L、为或约10mg/L至为或约500mg/L、为或约10mg/L至为或约

550mg/L、为或约10mg/L至为或约600mg/L、为或约10mg/L至为或约650mg/L、为或约10mg/L至为或约750mg/L、为或约50mg/L至为或约100mg/L、为或约50mg/L至为或约150mg/L、为或约50mg/L至为或约200mg/L、为或约50mg/L至为或约250mg/L、为或约50mg/L至为或约300mg/L、为或约50mg/L至为或约350mg/L、为或约50mg/L至为或约400mg/L、为或约50mg/L至为或约450mg/L、为或约50mg/L至为或约500mg/L、为或约50mg/L至为或约550mg/L、为或约50mg/L至为或约600mg/L、为或约50mg/L至为或约650mg/L、为或约50mg/L至为或约750mg/L、为或约100mg/L至为或约150mg/L、为或约100mg/L至为或约200mg/L、为或约100mg/L至为或约250mg/L、为或约100mg/L至为或约300mg/L、为或约100mg/L至为或约350mg/L、为或约100mg/L至为或约400mg/L、为或约100mg/L至为或约450mg/L、为或约100mg/L至为或约500mg/L、为或约100mg/L至为或约550mg/L、为或约100mg/L至为或约600mg/L、为或约100mg/L至为或约650mg/L、为或约100mg/L至为或约750mg/L、为或约150mg/L至为或约200mg/L、为或约150mg/L至为或约250mg/L、为或约150mg/L至为或约300mg/L、为或约150mg/L至为或约350mg/L、为或约150mg/L至为或约400mg/L、为或约150mg/L至为或约450mg/L、为或约150mg/L至为或约500mg/L、为或约150mg/L至为或约550mg/L、为或约150mg/L至为或约600mg/L、为或约150mg/L至为或约650mg/L、为或约150mg/L至为或约750mg/L、为或约200mg/L至为或约250mg/L、为或约200mg/L至为或约300mg/L、为或约200mg/L至为或约350mg/L、为或约200mg/L至为或约400mg/L、为或约200mg/L至为或约450mg/L、为或约200mg/L至为或约500mg/L、为或约200mg/L至为或约550mg/L、为或约200mg/L至为或约600mg/L、为或约200mg/L至为或约650mg/L、为或约200mg/L至为或约750mg/L、为或约250mg/L至为或约300mg/L、为或约250mg/L至为或约350mg/L、为或约250mg/L至为或约400mg/L、为或约250mg/L至为或约450mg/L、为或约250mg/L至为或约500mg/L、为或约250mg/L至为或约550mg/L、为或约250mg/L至为或约600mg/L、为或约250mg/L至为或约650mg/L、为或约250mg/L至为或约750mg/L、为或约300mg/L至为或约350mg/L、为或约300mg/L至为或约400mg/L、为或约300mg/L至为或约450mg/L、为或约300mg/L至为或约500mg/L、为或约300mg/L至为或约550mg/L、为或约300mg/L至为或约600mg/L、为或约300mg/L至为或约650mg/L、为或约300mg/L至为或约750mg/L、为或约350mg/L至为或约400mg/L、为或约350mg/L至为或约450mg/L、为或约350mg/L至为或约500mg/L、为或约350mg/L至为或约550mg/L、为或约350mg/L至为或约600mg/L、为或约350mg/L至为或约650mg/L、为或约350mg/L至为或约750mg/L、为或约400mg/L至为或约450mg/L、为或约400mg/L至为或约500mg/L、为或约400mg/L至为或约550mg/L、为或约400mg/L至为或约600mg/L、为或约400mg/L至为或约650mg/L、为或约400mg/L至为或约750mg/L、为或约450mg/L至为或约500mg/L、为或约450mg/L至为或约550mg/L、为或约450mg/L至为或约600mg/L、为或约450mg/L至为或约650mg/L、为或约450mg/L至为或约750mg/L、为或约500mg/L至为或约550mg/L、为或约500mg/L至为或约600mg/L、为或约500mg/L至为或约650mg/L、为或约500mg/L至为或约750mg/L、为或约550mg/L至为或约600mg/L、为或约550mg/L至为或约650mg/L、为或约550mg/L至为或约750mg/L、为或约600mg/L至为或约650mg/L、为或约600mg/L至为或约750mg/L、或为或约650mg/L至为或约750mg/L。在一些实施方案中,转铁蛋白的浓度为使得

在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,在培养基中的转铁蛋白的浓度为或为约100mg/L。在一些实施方案中,转铁蛋白的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,在培养基中的转铁蛋白的浓度是为或约50mg/L至为或约150mg/L。

[0606] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括胰岛素或胰岛素替代物。在一些实施方案中,胰岛素替代物是含锌化合物,其可以用于代替胰岛素以产生与胰岛素基本上相似的结果。胰岛素替代物的例子包括但不限于氯化锌、硝酸锌、溴化锌和硫酸锌。许多胰岛素对于本领域普通技术人员而言是已知的。参见Gilman, A.G.等人编辑, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, 1990, 第1463-1495页。在一些实施方案中,在补充剂和培养基中使用胰岛素而不是胰岛素替代物。在一些实施方案中,胰岛素是锌胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是人锌胰岛素。

[0607] 在一些实施方案中,胰岛素是人胰岛素或源自人胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是重组胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是重组人胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素(或胰岛素替代物)的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,在培养基中的胰岛素(或胰岛素替代物)的浓度是约1mg/L至为或约2.5mg/L、为或约1mg/L至为或约5mg/L、为或约1mg/L至为或约7.5mg/L、为或约1mg/L至为或约10mg/L、为或约1mg/L至为或约12.5mg/L、为或约1mg/L至为或约15mg/L、为或约1mg/L至为或约17.5mg/L、为或约1mg/L至为或约20mg/L、为或约1mg/L至为或约22.5mg/L、为或约1mg/L至为或约25mg/L、为或约1mg/L至为或约27.5mg/L、为或约1mg/L至为或约30mg/L、为或约2.5mg/L至为或约5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约7.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约10mg/L、为或约2.5mg/L至为或约12.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约15mg/L、为或约2.5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约20mg/L、为或约2.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约25mg/L、为或约2.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约30mg/L、为或约5mg/L至为或约7.5mg/L、为或约5mg/L至为或约10mg/L、为或约5mg/L至为或约12.5mg/L、为或约5mg/L至为或约15mg/L、为或约5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约5mg/L至为或约20mg/L、为或约5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约5mg/L至为或约25mg/L、为或约5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约5mg/L至为或约30mg/L、为或约7.5mg/L至为或约10mg/L、为或约7.5mg/L至为或约12.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约15mg/L、为或约7.5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约20mg/L、为或约7.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约25mg/L、为或约7.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约30mg/L、为或约10mg/L至为或约12.5mg/L、为或约10mg/L至为或约15mg/L、为或约10mg/L至为或约17.5mg/L、为或约10mg/L至为或约20mg/L、为或约10mg/L至为或约22.5mg/L、为或约10mg/L至为或约25mg/L、为或约10mg/L至为或约27.5mg/L、为或约10mg/L至为或约30mg/L、为或约12.5mg/L至为或约15mg/L、为或约12.5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约12.5mg/L至为或约20mg/L、为或约12.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约12.5mg/L至为或约25mg/L、为或约12.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约12.5mg/L至为或约30mg/L、为或约15mg/L至为或约17.5mg/L、为或约15mg/L至为或约20mg/L、为或约15mg/L至为或约22.5mg/L、为或约15mg/L至为或约25mg/L、为或约15mg/L至为或约27.5mg/L、为或约15mg/L至为或约30mg/L、为或约17.5mg/L至为或约20mg/L、为或约17.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约17.5mg/L至为或约

25mg/L、为或约17.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约17.5mg/L至为或约30mg/L、为或约20mg/L至为或约22.5mg/L、为或约20mg/L至为或约25mg/L、为或约20mg/L至为或约27.5mg/L、为或约20mg/L至为或约30mg/L、为或约22.5mg/L至为或约25mg/L、为或约22.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约22.5mg/L至为或约30mg/L、为或约25mg/L至为或约27.5mg/L、为或约27.5mg/L至为或约30mg/L。在一些实施方案中,培养基中的胰岛素或胰岛素替代物的浓度为为或约10mg/L。在一些实施方案中,培养基中的胰岛素或胰岛素替代物的浓度是为或约7.5mg/L至为或约12.5mg/L。

[0608] 在一些实施方案中,通过添加或混合L-谷氨酰胺与含有一种或多种所需组分的现有补充剂来制备补充剂(例如第一补充剂)。在一些实施方案中,添加或混合L-谷氨酰胺与血清替代补充剂,例如免疫细胞血清替代物(ThermoFisher, #A2598101)。在一些实施方案中,将L-谷氨酰胺添加至补充剂或与补充剂混合,所述补充剂包括在Smith等人Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4 (1) :e31中所述的免疫细胞血清替代物。在一些实施方案中,补充剂中的L-谷氨酰胺的浓度是为或约10mM至为或约30mM、为或约10mM至为或约50mM、为或约10mM至为或约70mM、为或约10mM至为或约90mM、为或约10mM至为或约110mM、为或约10mM至为或约130mM、为或约10mM至为或约150mM、为或约10mM至为或约170mM、为或约30mM至为或约50mM、为或约30mM至为或约70mM、为或约30mM至为或约90mM、为或约30mM至为或约110mM、为或约30mM至为或约130mM、为或约30mM至为或约150mM、为或约30mM至为或约170mM、为或约50mM至为或约70mM、为或约50mM至为或约90mM、为或约50mM至为或约110mM、为或约50mM至为或约130mM、为或约50mM至为或约150mM、为或约50mM至为或约170mM、为或约70mM至为或约90mM、为或约70mM至为或约110mM、为或约70mM至为或约130mM、为或约70mM至为或约150mM、为或约70mM至为或约170mM、为或约90mM至为或约110mM、为或约90mM至为或约130mM、为或约90mM至为或约150mM、为或约90mM至为或约170mM、为或约110mM至为或约130mM、为或约110mM至为或约150mM、为或约110mM至为或约170mM、为或约130mM至为或约150mM、为或约130mM至为或约170mM、为或约150mM至为或约170mM。在一些实施方案中,补充剂中的L-谷氨酰胺的浓度为为或约80mM。

[0609] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括生长因子。在一些实施方案中,生长因子包含表皮生长因子(EGF)。在一些实施方案中,生长因子包含成纤维细胞生长因子(FGF)。在一些实施方案中,生长因子包含胰岛素样生长因子(IGF)。在一些实施方案中,生长因子包含神经生长因子(NGF)。在一些实施方案中,生长因子包含血小板来源的生长因子(PDGF)。在一些实施方案中,生长因子包含转化生长因子(TGF)。

[0610] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括激素(例如,生长激素、胰岛素、氢化可的松、三碘甲腺原氨酸、雌激素、雄激素、孕酮、催乳激素、促卵泡激素、释放胃泌素的肽)。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括 α -球蛋白或 β -球蛋白。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括肽或肽级分(例如,源自动物、微生物或植物的蛋白质水解物)。

[0611] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括脂质。在一些实施方案中,脂质包含胆固醇。在一些实施方案中,脂质包含类固醇。在一些实施方案中,脂质包含脂肪酸(例如,棕榈酸酯、硬脂酸酯、油酸酯、亚油酸酯)。在一些实施方案中,脂质包含乙醇胺。在一些实施方案中,脂质包含胆碱。在一些实施方案中,脂质包含肌醇。

[0612] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包含过渡金属。在一些实施方案中,过渡金属包含铁。在一些实施方案中,过渡金属包含锌。在一些实施方案中,过渡金属包含铜。在一些实施方案中,过渡金属包含铬。在一些实施方案中,过渡金属包含碘。在一些实施方案中,过渡金属包含钴。在一些实施方案中,过渡金属包含硒。在一些实施方案中,过渡金属包含镁。在一些实施方案中,过渡金属包含钼。

[0613] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括维生素。在一些实施方案中,维生素包含脂溶性维生素(例如,维生素A、维生素D、维生素E、维生素K)。在一些实施方案中,维生素包含水溶性维生素(例如,B1、B2、B6、B₁₂、C、叶酸)。

[0614] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括多胺。在一些实施方案中,多胺包含腐胺。在一些实施方案中,多胺包含亚精胺。在一些实施方案中,多胺包含精胺。

[0615] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括还原剂。在一些实施方案中,还原剂包含2-巯基乙醇。在一些实施方案中,还原剂包括 α -硫代甘油。在一些实施方案中,还原剂包含还原型谷胱甘肽。

[0616] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括保护性添加剂。在一些实施方案中,保护性添加剂包含羧甲基纤维素。在一些实施方案中,保护性添加剂包含聚乙烯吡咯烷酮。在一些实施方案中,保护性添加剂包含普朗尼克(pluronic)F-68。在一些实施方案中,保护性添加剂包含Tween 80。

[0617] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括粘附因子。在一些实施方案中,粘附因子包含纤连蛋白。在一些实施方案中,粘附因子包含层粘连蛋白。

[0618] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分是以下中的一种或多种:一种或多种抗氧化剂、一种或多种白蛋白或白蛋白替代物、一种或多种脂质剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代物、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代物、一种或多种微量元素、和一种或多种糖皮质激素。在一些实施方案中,抗氧化剂包括N-乙酰基-L-半胱氨酸、2-巯基乙醇、或D,L-生育酚乙酸酯、或其衍生物或混合物。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中,脂质剂包括Human **Ex-Cite®**或乙醇胺或其衍生物和混合物。在一些实施方案中,胰岛素是人锌胰岛素。在一些实施方案中,转铁蛋白是人铁饱和的转铁蛋白。在一些实施方案中,微量元素是Se⁴⁺。在一些实施方案中,糖皮质激素是氢化可的松。在一些实施方案中,将补充剂浓缩。

[0619] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包含一种或多种抗氧化剂、以及一种或多种选自以下的成分:一种或多种白蛋白或白蛋白替代物、一种或多种脂质剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代物、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代物、一种或多种微量元素、和一种或多种糖皮质激素。

[0620] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包含以下中的一种或多种:N-乙酰基-L-半胱氨酸、人血清白蛋白、Human **Ex-Cyte®**、乙醇胺、人锌胰岛素、人铁饱和的转铁蛋白、Se⁴⁺、氢化可的松、D,L-生育酚乙酸酯、和/或2-巯基乙醇。

[0621] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)。在一些实施方案中,NAC的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,在基础培养基中的NAC的浓度是为或约10mg/L至为或约50mg/L、为或约10mg/L至为或约100mg/L、为或约10mg/L至为或约150mg/L、为或约10mg/L至为或约200mg/L、为或

[illegible]

L至为或约700mg/L、或为或约650mg/L至为或约700mg/L。

[0622] 在一些实施方案中,基础培养基中的NAC的浓度是为或约0mM至为或约1mM、为或约0mM至为或约2mM、为或约0mM至为或约3mM、为或约0mM至为或约4mM、为或约0mM至为或约5mM、为或约0mM至为或约6mM、为或约0mM至为或约7mM、为或约0mM至为或约8mM、为或约0mM至为或约9mM、为或约0mM至为或约10mM、为或约0mM至为或约12mM、为或约0mM至为或约14mM、为或约0mM至为或约16mM、为或约0mM至为或约18mM、为或约0mM至为或约20mM、为或约1mM至为或约2mM、为或约1mM至为或约3mM、为或约1mM至为或约4mM、为或约1mM至为或约5mM、为或约1mM至为或约6mM、为或约1mM至为或约7mM、为或约1mM至为或约8mM、为或约1mM至为或约9mM、为或约1mM至为或约10mM、为或约1mM至为或约12mM、为或约1mM至为或约14mM、为或约1mM至为或约16mM、为或约1mM至为或约18mM、为或约1mM至为或约20mM、为或约2mM至为或约3mM、为或约2mM至为或约4mM、为或约2mM至为或约5mM、为或约2mM至为或约6mM、为或约2mM至为或约7mM、为或约2mM至为或约8mM、为或约2mM至为或约9mM、为或约2mM至为或约10mM、为或约2mM至为或约12mM、为或约2mM至为或约14mM、为或约2mM至为或约16mM、为或约2mM至为或约18mM、为或约2mM至为或约20mM、为或约3mM、为或约至为或约4mM、为或约3mM至为或约5mM、为或约3mM至为或约6mM、为或约3mM至为或约7mM、为或约3mM至为或约8mM、为或约3mM至为或约9mM、为或约3mM至为或约10mM、为或约3mM至为或约12mM、为或约3mM至为或约14mM、为或约3mM至为或约16mM、为或约3mM至为或约18mM、为或约3mM至为或约20mM、为或约4mM至为或约5mM、为或约4mM至为或约6mM、为或约4mM至为或约7mM、为或约4mM至为或约8mM、为或约4mM至为或约9mM、为或约4mM至为或约10mM、为或约4mM至为或约12mM、为或约4mM至为或约14mM、为或约4mM至为或约16mM、为或约4mM至为或约18mM、为或约4mM至为或约20mM、为或约5mM至为或约6mM、为或约5mM至为或约7mM、为或约5mM至为或约8mM、为或约5mM至为或约9mM、为或约5mM至为或约10mM、为或约5mM至为或约12mM、为或约5mM至为或约14mM、为或约5mM至为或约16mM、为或约5mM至为或约18mM、为或约5mM至为或约20mM、为或约6mM至为或约7mM、为或约6mM至为或约8mM、为或约6mM至为或约9mM、为或约6mM至为或约10mM、为或约6mM至为或约12mM、为或约6mM至为或约14mM、为或约6mM至为或约16mM、为或约6mM至为或约18mM、为或约6mM至为或约20mM、为或约7mM至为或约8mM、为或约7mM至为或约9mM、为或约7mM至为或约10mM、为或约7mM至为或约12mM、为或约7mM至为或约14mM、为或约7mM至为或约16mM、为或约7mM至为或约18mM、为或约7mM至为或约20mM、为或约8mM至为或约9mM、为或约8mM至为或约10mM、为或约8mM至为或约12mM、为或约8mM至为或约14mM、为或约8mM至为或约16mM、为或约8mM至为或约18mM、为或约8mM至为或约20mM、为或约9mM至为或约10mM、为或约9mM至为或约12mM、为或约9mM至为或约14mM、为或约9mM至为或约16mM、为或约9mM至为或约18mM、为或约9mM至为或约20mM、为或约10mM至为或约12mM、为或约10mM至为或约14mM、为或约10mM至为或约16mM、为或约10mM至为或约18mM、为或约10mM至为或约20mM、为或约12mM至为或约14mM、为或约12mM至为或约16mM、为或约12mM至为或约18mM、为或约12mM至为或约20mM、为或约14mM至为或约16mM、为或约14mM至为或约18mM、为或约14mM至为或约20mM、为或约16mM至为或约18mM、为或约16mM至为或约20mM、为或约或18mM至为或约20mM。

[0623] 在一些实施方案中,所述一种或多种另外组分包括乙醇胺。在一些实施方案中,乙醇胺的浓度为使得在将补充剂与基础培养基(例如本文所述的那些)组合之后,基础培养基

[illegible]

18mg/L至为或约26mg/L、为或约18mg/L至为或约28mg/L、为或约18mg/L至为或约30mg/L、为或约20mg/L至为或约22mg/L、为或约20mg/L至为或约24mg/L、为或约20mg/L至为或约26mg/L、为或约20mg/L至为或约28mg/L、为或约20mg/L至为或约30mg/L、为或约22mg/L至为或约24mg/L、为或约22mg/L至为或约26mg/L、为或约22mg/L至为或约28mg/L、为或约22mg/L至为或约30mg/L、为或约24mg/L至为或约26mg/L、为或约24mg/L至为或约28mg/L、为或约24mg/L至为或约30mg/L、为或约26mg/L至为或约28mg/L、为或约26mg/L至为或约30mg/L、为或约28mg/L至为或约30mg/L。

[0624] 在一些实施方案中,补充剂是液体。在一些实施方案中,补充剂不被冷冻,或不建议被冷冻用于存储。在一些实施方案中,补充剂包含白蛋白、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)和乙醇胺。在一些实施方案中,补充剂包含白蛋白、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)和乙醇胺,其中白蛋白、NAC和/或乙醇胺的浓度使得在将补充剂与基础培养基(如本文所述的这些)组合之后,白蛋白、NAC和/或乙醇胺的浓度与本文所述的基本上相同。在一些实施方案中,白蛋白是人源白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是来自人血浆或血清的人源白蛋白。在一些实施方案中,补充剂是液体,并且不包含游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)或不包含显著量的游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。

[0625] 在一些实施方案中,将另外的补充剂(例如第二补充剂)与基础培养基组合以提供一种或多种另外的组分。在一些实施方案中,另外的补充剂(例如第二补充剂)是细胞扩增补充剂。在一些实施方案中,另外的补充剂(例如第二补充剂)是或包含OpTmizer®补充剂(Thermofisher,A1048503的一部分)。

[0626] 在一些实施方案中,将补充剂浓缩为或约2倍至为或约100倍。在一些实施方案中,补充剂是为或约40X配制品。在一些实施方案中,向一升基础培养基补充为或约20至30毫升、如 25 ± 2 毫升的至少一种补充剂(包括第一补充剂,并且在一些情况下,一种或多种另外的补充剂)。

[0627] C. 无血清培养基

[0628] 在一些实施方案中,无血清培养基包含合成氨基酸(例如,二肽形式的L-谷氨酰胺,例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)、游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸(例如,二肽形式的L-谷氨酰胺,例如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)能够在包含细胞的细胞培养物中转化成游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺),其中所述培养基是无血清的。在一些实施方案中,细胞包含人细胞。在一些实施方案中,细胞包含免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化T细胞。在一些实施方案中,将细胞基因工程化以表达重组受体(例如,嵌合抗原受体)。在一些实施方案中,细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0629] 在一些实施方案中,无血清培养基还包含至少一种蛋白质。在一些实施方案中,无血清培养基包含合成氨基酸、游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)和至少一种蛋白质,其中所述合成氨基酸(例如二肽形式的L-谷氨酰胺,例如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)能够在包含细胞的细胞培养物中被转化成游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺),其中所述培养基是无血清的。

[0630] 在一些实施方案中,合成氨基酸是谷氨酰胺的稳定形式(即L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在水性溶液(例如无血清培养基)中比谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)更

稳定。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中不产生显著量的谷氨酰胺。在一些实施方案中,合成氨基酸不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少约1、3、5、7、9、11、13或14天不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、2、3、4、5、6、7或8周不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、2、3、4或5年不产生显著量的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、3、5、7、9、11、13或14天不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、2、3、4、5、6、7或8周不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。在一些实施方案中,合成氨基酸在无血清培养基中至少或至少约1、2、3、4、或5年不产生显著量的吡咯烷酮羧酸或氨。

[0631] 在一些实施方案中,合成氨基酸可溶于水性溶液(例如无血清培养基)中。在一些实施方案中,与游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)相比,合成氨基酸在水性溶液中的溶解度更高。

[0632] 在一些实施方案中,合成氨基酸能够被转运到细胞中,其中它可以被转化成游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,细胞包含免疫细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化细胞。在一些实施方案中,细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是基因工程化T细胞。在一些实施方案中,将细胞基因工程化以表达重组受体(例如,嵌合抗原受体)。在一些实施方案中,细胞是表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0633] 在一些实施方案中,合成氨基酸是二肽。在一些实施方案中,合成氨基酸是三肽。在一些实施方案中,合成氨基酸是二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)。

[0634] 在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约0.5mM-5mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约2mM。在一些实施方案中,二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约0.5mM-1mM、0.5mM-1.5mM、0.5mM-2mM、0.5mM-2.5mM、0.5mM-3mM、0.5mM-3.5mM、0.5mM-4mM、0.5mM-4.5mM、0.5mM-5mM、1mM-1.5mM、1mM-2mM、1mM-2.5mM、1mM-3mM、1mM-3.5mM、1mM-4mM、1mM-4.5mM、1mM-5mM、1.5mM-2mM、1.5mM-2.5mM、1.5mM-3mM、1.5mM-3.5mM、1.5mM-4mM、1.5mM-4.5mM、1.5mM-5mM、2mM-2.5mM、2mM-3mM、2mM-3.5mM、2mM-4mM、2mM-4.5mM、2mM-5mM、2.5mM-3mM、2.5mM-3.5mM、2.5mM-4mM、2.5mM-4.5mM、2.5mM-5mM、3mM-3.5mM、3mM-4mM、3mM-4.5mM、3mM-5mM、3.5mM-4mM、3.5mM-4.5mM、3.5mM-5mM、4mM-4.5mM、4mM-5mM、或4.5mM-5mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约5mM-7.5mM、5mM-10mM、5mM-12.5mM、5mM-15mM、5mM-17.5mM、5mM-20mM、7.5mM-10mM、7.5mM-12.5mM、7.5mM-15mM、7.5mM-17.5mM、7.5mM-20mM、10mM-12.5mM、10mM-15mM、10mM-17.5mM、10mM-20mM、12.5mM-15mM、12.5mM-17.5mM、12.5mM-20mM、15mM-17.5mM、15mM-20mM、或17.5mM-20mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,无血清培养基中

的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是至少或至少约0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、或5mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是或是为或约2mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是至多或至多约2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、5.5mM、6mM、6.5mM、7mM、7.5mM、8mM、8.5mM、9mM、9.5mM、10mM、12.5mM、15mM、17.5mM、或20mM。

[0635] 在一些实施方案中,无血清培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为约0.5mM-5mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度是为或约2mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为或为约0.5mM-1mM、0.5mM-1.5mM、0.5mM-2mM、0.5mM-2.5mM、0.5mM-3mM、0.5mM-3.5mM、0.5mM-4mM、0.5mM-4.5mM、0.5mM-5mM、1mM-1.5mM、1mM-2mM、1mM-2.5mM、1mM-3mM、1mM-3.5mM、1mM-4mM、1mM-4.5mM、1mM-5mM、1.5mM-2mM、1.5mM-2.5mM、1.5mM-3mM、1.5mM-3.5mM、1.5mM-4mM、1.5mM-4.5mM、1.5mM-5mM、2mM-2.5mM、2mM-3mM、2mM-3.5mM、2mM-4mM、2mM-4.5mM、2mM-5mM、2.5mM-3mM、2.5mM-3.5mM、2.5mM-4mM、2.5mM-4.5mM、2.5mM-5mM、3mM-3.5mM、3mM-4mM、3mM-4.5mM、3mM-5mM、3.5mM-4mM、3.5mM-4.5mM、3.5mM-5mM、4mM-4.5mM、4mM-5mM、或4.5mM-5mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,无血清培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为或为约5mM-7.5mM、5mM-10mM、5mM-12.5mM、5mM-15mM、5mM-17.5mM、5mM-20mM、7.5mM-10mM、7.5mM-12.5mM、7.5mM-15mM、7.5mM-17.5mM、7.5mM-20mM、10mM-12.5mM、10mM-15mM、10mM-17.5mM、10mM-20mM、12.5mM-15mM、12.5mM-17.5mM、12.5mM-20mM、15mM-17.5mM、15mM-20mM、或17.5mM-20mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为至少或至少约0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、或5mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)的浓度为至多或至多约2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、5.5mM、6mM、6.5mM、7mM、7.5mM、8mM、8.5mM、9mM、9.5mM、10mM、12.5mM、15mM、17.5mM、或20mM。

[0636] 在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约0.5mM至为或约5mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺(如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是为或约2mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的L-谷氨酰胺的浓度是为或约0.5mM至为或约5mM。在一些实施方案中,无血清培养基中的L-谷氨酰胺的浓度是为或约2mM。

[0637] 在一些实施方案中,无血清培养基包含至少一种蛋白质。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质不是非哺乳动物来源的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是人的或源自人。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是重组的。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的组分包括至少一种蛋白质。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质不是非哺乳动物来源的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是人的或源自人。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质是重组的。在一些实施方案中,所述至少一种蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、纤连蛋白、抑肽酶或胎球蛋白。在一些实施方案中,蛋白质包含一种或多种白蛋白、胰岛素或转铁蛋白,任选地一种或多种人或重组白蛋白、胰岛素或转铁蛋白。

[0638] 在一些实施方案中,无血清培养基包含白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白源自人。在一些实施方案中,白蛋白源自人血清或人血浆。在一些实施方案中,白蛋白是重组白蛋白。在一些实施方案中,重组白蛋白源自人。在一些实施方案中,重组白蛋白不源自人。在一些实施方案中,补充剂包含天然白蛋白。在一些实施方案中,天然白蛋白源自人。在一些实施方案中,天然白蛋白不源自人。在一些实施方案中,无血清培养基中白蛋白的浓度是为或约0mg/mL至为或约2mg/mL、为或约0mg/mL至为或约4mg/mL、为或约0mg/mL至为或约6mg/mL、为或约0mg/mL至为或约8mg/mL、为或约0mg/mL至为或约10mg/mL、为或约0mg/mL至为或约12mg/mL、为或约2mg/mL至为或约4mg/mL、为或约2mg/mL至为或约6mg/mL、为或约2mg/mL至为或约8mg/mL、为或约2mg/mL至为或约10mg/mL、为或约2mg/mL至为或约12mg/mL、为或约4mg/mL至为或约6mg/mL、为或约4mg/mL至为或约8mg/mL、为或约4mg/mL至为或约10mg/mL、为或约4mg/mL至为或约12mg/mL、为或约6mg/mL至为或约8mg/mL、为或约6mg/mL至为或约10mg/mL、为或约6mg/mL至为或约12mg/mL、为或约8mg/mL至为或约10mg/mL、为或约8mg/mL至为或约12mg/mL、为或约10mg/mL至为或约12mg/mL、或为或约10mg/mL至为或约15mg/mL,每个都包含端值。在一些实施方案中,培养基中的白蛋白是为或约5mg/mL。

[0639] 在一些实施方案中,无血清培养基包含转铁蛋白或转铁蛋白替代物(如本文所述的这些)。在一些实施方案中,转铁蛋白或转铁蛋白替代物源自人。在一些实施方案中,转铁蛋白或转铁蛋白替代物源自人血清或血浆。在一些实施方案中,无血清培养基中的转铁蛋白的浓度是为或约10mg/L至为或约50mg/L、为或约10mg/L至为或约100mg/L、为或约10mg/L至为或约150mg/L、为或约10mg/L至为或约200mg/L、为或约10mg/L至为或约250mg/L、为或约10mg/L至为或约300mg/L、为或约10mg/L至为或约350mg/L、为或约10mg/L至为或约400mg/L、为或约10mg/L至为或约450mg/L、为或约10mg/L至为或约500mg/L、为或约10mg/L至为或约550mg/L、为或约10mg/L至为或约600mg/L、为或约10mg/L至为或约650mg/L、为或约10mg/L至为或约750mg/L、为或约50mg/L至为或约100mg/L、为或约50mg/L至为或约150mg/L、为或约50mg/L至为或约200mg/L、为或约50mg/L至为或约250mg/L、为或约50mg/L至为或约300mg/L、为或约50mg/L至为或约350mg/L、为或约50mg/L至为或约400mg/L、为或约50mg/L至为或约450mg/L、为或约50mg/L至为或约500mg/L、为或约50mg/L至为或约550mg/L、为或约50mg/L至为或约600mg/L、为或约50mg/L至为或约650mg/L、为或约50mg/L至为或约750mg/L、为或约100mg/L至为或约150mg/L、为或约100mg/L至为或约200mg/L、为或约100mg/L至为或约250mg/L、为或约100mg/L至为或约300mg/L、为或约100mg/L至为或约350mg/L、为或约100mg/L至为或约400mg/L、为或约100mg/L至为或约450mg/L、为或约100mg/L至为或约500mg/L、为或约100mg/L至为或约550mg/L、为或约100mg/L至为或约600mg/L、为或约100mg/L至为或约650mg/L、为或约100mg/L至为或约750mg/L、为或约150mg/L至为或约200mg/L、为或约150mg/L至为或约250mg/L、为或约150mg/L至为或约300mg/L、为或约150mg/L至为或约350mg/L、为或约150mg/L至为或约400mg/L、为或约150mg/L至为或约450mg/L、为或约150mg/L至为或约500mg/L、为或约150mg/L至为或约550mg/L、为或约150mg/L至为或约600mg/L、为或约150mg/L至为或约650mg/L、为或约150mg/L至为或约750mg/L、为或约200mg/L至为或约250mg/L、为或约200mg/L至为或约300mg/L、为或约200mg/L至为或约350mg/L、为或约200mg/L至为或约400mg/L、为或约200mg/L至为或约450mg/L、为或约200mg/L至为或约500mg/L、为或约200mg/L至为或约

550mg/L、为或约200mg/L至为或约600mg/L、为或约200mg/L至为或约650mg/L、为或约200mg/L至为或约750mg/L、为或约250mg/L至为或约300mg/L、为或约250mg/L至为或约350mg/L、为或约250mg/L至为或约400mg/L、为或约250mg/L至为或约450mg/L、为或约250mg/L至为或约500mg/L、为或约250mg/L至为或约550mg/L、为或约250mg/L至为或约600mg/L、为或约250mg/L至为或约650mg/L、为或约250mg/L至为或约750mg/L、为或约300mg/L至为或约350mg/L、为或约300mg/L至为或约400mg/L、为或约300mg/L至为或约450mg/L、为或约300mg/L至为或约500mg/L、为或约300mg/L至为或约550mg/L、为或约300mg/L至为或约600mg/L、为或约300mg/L至为或约650mg/L、为或约300mg/L至为或约750mg/L、为或约350mg/L至为或约400mg/L、为或约350mg/L至为或约450mg/L、为或约350mg/L至为或约500mg/L、为或约350mg/L至为或约550mg/L、为或约350mg/L至为或约600mg/L、为或约350mg/L至为或约650mg/L、为或约350mg/L至为或约750mg/L、为或约400mg/L至为或约450mg/L、为或约400mg/L至为或约500mg/L、为或约400mg/L至为或约550mg/L、为或约400mg/L至为或约600mg/L、为或约400mg/L至为或约650mg/L、为或约400mg/L至为或约750mg/L、为或约450mg/L至为或约500mg/L、为或约450mg/L至为或约550mg/L、为或约450mg/L至为或约600mg/L、为或约450mg/L至为或约650mg/L、为或约450mg/L至为或约750mg/L、为或约500mg/L至为或约550mg/L、为或约500mg/L至为或约600mg/L、为或约500mg/L至为或约650mg/L、为或约500mg/L至为或约750mg/L、为或约550mg/L至为或约600mg/L、为或约550mg/L至为或约650mg/L、为或约550mg/L至为或约750mg/L、为或约600mg/L至为或约650mg/L、为或约600mg/L至为或约750mg/L、为或约650mg/L至为或约750mg/L。在一些实施方案中,无血清培养基中的转铁蛋白的浓度是为或约100mg/L。在一些实施方案中,无血清培养基中的转铁蛋白的浓度是为或约50mg/L至150mg/L。

[0640] 在一些实施方案中,补充剂包含胰岛素或胰岛素替代物(如本文所述的这些)。在一些实施方案中,胰岛素源自人。在一些实施方案中,胰岛素是重组胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素是重组人胰岛素。在一些实施方案中,无血清培养基中的胰岛素(或胰岛素替代物)的浓度是为或约1mg/L至为或约2.5mg/L、为或约1mg/L至为或约5mg/L、为或约1mg/L至为或约7.5mg/L、为或约1mg/L至为或约10mg/L、为或约1mg/L至为或约12.5mg/L、为或约1mg/L至为或约15mg/L、为或约1mg/L至为或约17.5mg/L、为或约1mg/L至为或约20mg/L、为或约1mg/L至为或约22.5mg/L、为或约1mg/L至为或约25mg/L、为或约1mg/L至为或约27.5mg/L、为或约1mg/L至为或约30mg/L、为或约2.5mg/L至为或约5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约7.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约10mg/L、为或约2.5mg/L至为或约12.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约15mg/L、为或约2.5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约20mg/L、为或约2.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约25mg/L、为或约2.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约2.5mg/L至为或约30mg/L、为或约5mg/L至为或约7.5mg/L、为或约5mg/L至为或约10mg/L、为或约5mg/L至为或约12.5mg/L、为或约5mg/L至为或约15mg/L、为或约5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约5mg/L至为或约20mg/L、为或约5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约5mg/L至为或约25mg/L、为或约5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约5mg/L至为或约30mg/L、为或约7.5mg/L至为或约10mg/L、为或约7.5mg/L至为或约12.5mg/L、为或约

7.5mg/L至为或约15mg/L、为或约7.5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约20mg/L、为或约7.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约25mg/L、为或约7.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约7.5mg/L至为或约30mg/L、为或约10mg/L至为或约12.5mg/L、为或约10mg/L至为或约15mg/L、为或约10mg/L至为或约17.5mg/L、为或约10mg/L至为或约20mg/L、为或约10mg/L至为或约22.5mg/L、为或约10mg/L至为或约25mg/L、为或约10mg/L至为或约27.5mg/L、为或约10mg/L至为或约30mg/L、为或约12.5mg/L至为或约15mg/L、为或约12.5mg/L至为或约17.5mg/L、为或约12.5mg/L至为或约20mg/L、为或约12.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约12.5mg/L至为或约25mg/L、为或约12.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约12.5mg/L至为或约30mg/L、为或约15mg/L至为或约17.5mg/L、为或约15mg/L至为或约20mg/L、为或约15mg/L至为或约22.5mg/L、为或约15mg/L至为或约25mg/L、为或约15mg/L至为或约27.5mg/L、为或约15mg/L至为或约30mg/L、为或约17.5mg/L至为或约20mg/L、为或约17.5mg/L至为或约22.5mg/L、为或约17.5mg/L至为或约25mg/L、为或约17.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约17.5mg/L至为或约30mg/L、为或约20mg/L至为或约22.5mg/L、为或约20mg/L至为或约25mg/L、为或约20mg/L至为或约27.5mg/L、为或约20mg/L至为或约30mg/L、为或约22.5mg/L至为或约25mg/L、为或约22.5mg/L至为或约27.5mg/L、为或约22.5mg/L至为或约30mg/L、为或约25mg/L至为或约27.5mg/L、或为或约27.5mg/L至为或约30mg/L。在一些实施方案中,无血清培养基中的胰岛素或胰岛素替代物的浓度是为或约10mg/L。在一些实施方案中,无血清培养基中的胰岛素或胰岛素替代物的浓度是为或约7.5mg/L至为或约12.5mg/L。

[0641] 在一些实施方案中,无血清培养基不包含酚红。在一些实施方案中,无血清培养基包含酚红。

[0642] 在一些实施方案中,无血清培养基包含无机盐、糖、氨基酸的营养混合物,所述营养混合物任选地还含有维生素、有机酸、抗氧化剂、脂质、生长因子、N-乙酰半胱氨酸、乙醇胺和/或缓冲液。例子包括本文(例如在以上章节中)所述的那些,包括无机盐、糖、氨基酸、维生素、有机酸、抗氧化剂、脂质、生长因子、N-乙酰半胱氨酸、乙醇胺和/或缓冲液。

[0643] 在一些实施方案中,无血清培养基包含选自以下的一种或多种成分:一种或多种抗氧化剂、一种或多种白蛋白或白蛋白替代物、一种或多种脂质剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代物、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代物、一种或多种微量元素、一种或多种糖皮质激素、一种或多种无机盐、一种或多种能源、一种或多种缓冲剂、一种或多种丙酮酸盐、一种或多种pH指示剂、一种或多种氨基酸、和一种或多种维生素中的一种或多种。在一些实施方案中,抗氧化剂选自N-乙酰基-L-半胱氨酸、2-巯基乙醇、和D,L-生育酚乙酸酯、或其衍生物或混合物。在一些实施方案中,白蛋白是人血清白蛋白。在一些实施方案中,脂质剂是Human Ex-Cyte®和乙醇胺。在一些实施方案中,胰岛素是人锌胰岛素。在一些实施方案中,转铁蛋白是人铁饱和的转铁蛋白。在一些实施方案中,糖皮质激素是氢化可的松。在一些实施方案中,无机盐成分包含选自以下的一种或多种无机盐:一种或多种钙盐、一种或多种钾盐、一种或多种镁盐、一种或多种钠盐、一种或多种碳酸盐、和一种或多种磷酸盐。在一些实施方案中,能源是D-葡萄糖。在一些实施方案中,缓冲剂是HEPES。在一些实施方案中,丙酮酸盐是丙酮酸钠。在一些实施方案中,pH指示剂是酚红。在一些实施方案中,氨基酸成分包含选自以下的一种或多种氨基酸:甘氨酸、L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-半胱氨酸、L-天冬

氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-亮氨酸、L-谷氨酰胺、盐酸L-精氨酸、L-甲硫氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、和L-缬氨酸、及其盐和衍生物。在一些实施方案中,维生素成分包含选自以下的一种或多种维生素:生物素、D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、异肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醛、核黄素、盐酸硫胺素、和维生素B12及其衍生物。在一些实施方案中,成分包含N-乙酰基-L-半胱氨酸、2-巯基乙醇、人血清白蛋白、D,L-生育酚乙酸酯、Human Ex-Cyte®、乙醇胺、人锌胰岛素、铁饱和的转铁蛋白、 Se^{4+} 、氢化可的松、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 、D-葡萄糖、HEPES、丙酮酸钠、酚红、甘氨酸、L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-半胱氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-赖氨酸、L-亮氨酸、L-谷氨酰胺、盐酸L-精氨酸、L-甲硫氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、和L-缬氨酸、生物素、D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、异肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醛、核黄素、盐酸硫胺素、和维生素B12。

[0644] 在一些实施方案中,提供了包含基础培养基和至少一种补充剂的无血清培养基。在本文中(例如在以上章节中)描述了基础培养基和补充剂的各种例子。

[0645] 在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含为或约90%至为或约97.5% (v/v) 的基础培养基、为或约2.5%至为或约10% (v/v) 的补充剂,例如第一补充剂和/或第二补充剂。在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含为或约90%至为或约97.5% (v/v) 的基础培养基、为或约1.25%至为或约5% (v/v) 的第一补充剂、以及为或约1.25%至为或约5% (v/v) 的第二补充剂。

[0646] 在一些实施方案中,提供了无血清培养基,其包含基础培养基、第一补充剂和第二补充剂。在一些实施方案中,基础培养基包含液体,所述液体包含合成氨基酸(例如二肽形式的L-谷氨酰胺,例如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺),并且其中所述基础培养基不含或基本上不含游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺)和/或蛋白质。在一些实施方案中,第一补充剂包含游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺),其中对于在谷氨酰胺变成第一补充剂的组分之后且在预期用途(例如,用作基础培养基的补充剂)之前的大多数时间,所述第一补充剂被冷冻或储存在室温下的温度下(例如,在20℃、10℃、15℃、5℃、0℃、-5℃、-10℃、-15℃、或-20℃下)。在一些实施方案中,第一补充剂包含游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺),其中就在与培养基(例如基础培养基)组合之前,所述第一补充剂被冷冻或储存在室温下的温度下(例如,在20℃、10℃、15℃、5℃、0℃、-5℃、-10℃、-15℃、或-20℃下)。在一些实施方案中,第二补充剂包含白蛋白、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)和/或乙醇胺。在一些实施方案中,第二补充剂包含选自以下的一种或多种成分:一种或多种抗氧化剂、一种或多种白蛋白或白蛋白替代物、一种或多种脂质剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代物、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代物、一种或多种微量元素、和一种或多种糖皮质激素。

[0647] 在一些实施方案中,无血清培养基包含一种或多种细胞因子。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,所述一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白细胞介素2(IL-2)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素7(IL-7)、白细胞介素9(IL-9)、白细胞介素12(IL-12)、白细胞介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子

(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括重组IL-2。在一些实施方案中,所述细胞因子包含IL-2。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-7或IL-15。

[0648] 在一些实施方案中,细胞因子的浓度是约在为或约1IU/ml与为或约2,000IU/ml之间、在为或约10IU/ml与为或约100IU/ml之间、在为或约50IU/ml与为或约500IU/ml之间、在为或约100IU/ml与为或约200IU/ml之间、在为或约500IU/ml与为或约1400IU/ml之间、在为或约250IU/ml与为或约500IU/ml之间、或在为或约500IU/ml与为或约2,500IU/ml之间。

[0649] 在一些实施方案中,无血清培养基包含IL-2。在一些实施方案中,IL-2(例如人重组IL-2)的浓度在为或约2IU/ml与为或约500IU/ml之间、在为或约10IU/ml与为或约250IU/ml之间、在为或约100IU/ml与为或约500IU/ml之间、或在为或约100IU/ml与为或约400IU/ml之间。在特定实施方案中,IL-2的浓度是为或为约50IU/ml、75IU/ml、100IU/ml、125IU/ml、150IU/ml、175IU/ml、200IU/ml、225IU/ml、250IU/ml、300IU/ml、或400IU/ml。在一些实施方案中,IL-2的浓度是为或约100IU/ml。在一些实施方案中,IL-2的浓度是为或约200IU/ml。

[0650] 在一些实施方案中,无血清培养基包含IL-7。在一些实施方案中,IL-7(例如人重组IL-7)的浓度是约在为或约10IU/ml与为或约5,000IU/ml之间、在为或约500IU/ml与为或约2,000IU/ml之间、在为或约600IU/ml与为或约1,500IU/ml之间、在为或约500IU/ml与为或约2,500IU/ml之间、在为或约750IU/ml与为或约1,500IU/ml之间、或在为或约1,000IU/ml与为或约2,000IU/ml之间。在特定实施方案中,IL-7的浓度为或为约100IU/ml、200IU/ml、300IU/ml、400IU/ml、500IU/ml、600IU/ml、700IU/ml、800IU/ml、900IU/ml、1,000IU/ml、1,200IU/ml、1,400IU/ml、或1,600IU/ml。在一些实施方案中,IL-7的浓度约为600IU/ml。在一些实施方案中,IL-7的浓度约为1,200IU/ml。

[0651] 在一些实施方案中,无血清培养基包含IL-15。在一些实施方案中,IL-15(例如人重组IL-15)的浓度在为或约2IU/ml与为或约500IU/ml之间、在为或约0.1IU/ml与为或约200IU/ml之间、在为或约1IU/ml与为或约50IU/ml之间、在为或约5IU/ml与为或约25IU/ml之间、在为或约25IU/ml与为或约50IU/ml之间、在为或约5IU/ml与为或约15IU/ml之间、或在为或约10IU/ml与为或约50IU/ml之间。在特定实施方案中,IL-15的浓度是为或为约1IU/ml、2IU/ml、3IU/ml、4IU/ml、5IU/ml、6IU/ml、7IU/ml、8IU/ml、9IU/ml、10IU/ml、11IU/ml、12IU/ml、13IU/ml、14IU/ml、15IU/ml、20IU/ml、25IU/ml、30IU/ml、40IU/ml、50IU/ml、100IU/ml、或200IU/ml。在特定实施方案中,IL-15的浓度是约20IU/ml。在一些实施方案中,IL-15的浓度是为或约100IU/ml。在一些实施方案中,IL-15的浓度是为或约200IU/ml。

[0652] 在一些实施方案中,无血清培养基包含补充有重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15(例如人重组IL-2、人重组IL-7、和/或人重组IL-15)的基础培养基。在一些实施方案中,无血清培养基包含在为或约2IU/ml与为或约500IU/ml之间的重组IL-2、在为或约10IU/ml与为或约5,000IU/ml之间的重组IL-7、以及在为或约2IU/ml与为或约500IU/ml之间的重组IL-15。在一些实施方案中,无血清培养基包含在为或约50IU/ml与为或约500IU/ml之间的重组IL-2、在为或约100IU/ml与为或约2,000IU/ml之间的重组IL-7、以及在为或约50IU/ml与为或约500IU/ml之间的重组IL-15。在一些实施方案中,无血清培养基包含在为或约

50IU/ml与为或约150IU/ml之间的重组IL-2、在为或约500IU/ml与为或约1,000IU/ml之间的重组IL-7、以及在为或约50IU/ml与为或约150IU/ml之间的重组IL-15,例如,用于在刺激/激活细胞组合物和/或将细胞组合物工程化中使用。在一些实施方案中,无血清培养基包含在为或约150IU/ml与为或约250IU/ml之间的重组IL-2、在为或约1000IU/ml与为或约1,500IU/ml之间的重组IL-7、以及在为或约150IU/ml与为或约250IU/ml之间的重组IL-15,例如用于在细胞组合物的培育或扩增中使用。在一些实施方案中,用于细胞组合物的培育或扩增中的无血清培养基比用于刺激/激活细胞组合物和/或将细胞组合物工程化的无血清培养基含有更高浓度的一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,与用于刺激/激活细胞组合物和/或将细胞组合物工程化中的无血清培养基相比,用于细胞组合物的培育或扩增中的无血清培养基含有约或至少约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、或3.0倍浓度的一种或多种细胞因子。

[0653] 在一些实施方案中,无血清培养基是浓缩的培养基配制品。在一些实施方案中,无血清培养基不是浓缩的培养基配制品。在一些实施方案中,无血清培养基是从为或约2X至为或约100X浓缩的。在一些实施方案中,无血清培养基是为或约10X配制品。在一些实施方案中,可以将无血清培养基储存在为或约2℃至8℃下。

[0654] 在一些实施方案中,培养基能够培育细胞至少2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或更长时间,而无需另外补充L-谷氨酰胺、二肽形式的谷氨酰胺、或其他形式的谷氨酰胺。

[0655] 在一些实施方案中,无血清培养基能够促进细胞扩增至少2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或更长时间,而无需另外补充L-谷氨酰胺、谷氨酰胺的二肽形式、或其他形式的谷氨酰胺。

[0656] 在一些实施方案中,无血清培养基支持或促进细胞的扩增。在一些实施方案中,培养基支持或促进细胞的活力。在一些实施方案中,培养基支持或促进细胞的激活。

[0657] 在一些实施方案中,细胞包含免疫细胞。在一些实施方案中,细胞包含原代免疫细胞。在一些实施方案中,原代免疫细胞包含基因工程化细胞。在一些实施方案中,原代免疫细胞包含T细胞。在一些实施方案中,原代免疫细胞包含CD4和/或CD8 T细胞。在一些实施方案中,CD4和/或CD8 T细胞是基因工程化T细胞。在一些实施方案中,将T细胞基因工程化以表达重组受体(例如,嵌合抗原受体)。在一些实施方案中,T细胞包含表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0658] 在一些实施方案中,无血清培养基支持或促进细胞的活力、扩增和/或激活,其中用无血清培养基培养的细胞实现与用含有血清的培养基(例如含有约5%-10%(v/v)人血清的培养基)培养的细胞可比的功能特性(例如,活力、扩增和一种或多种细胞因子的产生)。

[0659] D. 无血清培养基的制备方法

[0660] 在一些实施方案中,提供了用于制备无血清培养基配制品的方法,所述方法包括组合:(a)基础培养基,所述基础培养基包含在细胞培养物中能够被转化成游离形式的谷氨酰胺(例如L-谷氨酰胺)的合成氨基酸;(b)第一补充剂,所述第一补充剂包含游离形式的谷氨酰胺(即L-谷氨酰胺),其中在L-谷氨酰胺变成所述第一补充剂的组分之后和在组合之前的至少一部分时间,将所述第一补充剂冷冻。在一些实施方案中,合成氨基酸是二肽形式的

L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,基础培养基是无血清的。在一些实施方案中,基础培养基是液体配制品和/或在组合之前尚未被冷冻和/或在商业方案中不建议在保持储存时被冷冻。在一些实施方案中,在L-谷氨酰胺变成第一补充剂的组分之后且在与基础培养基组合之前的大部分时间,将第一补充剂冷冻。在一些实施方案中,在组合之前将第一补充剂冷冻并解冻。

[0661] 在一些实施方案中,在与基础培养基组合之前,第一补充剂被解冻为液体配制品不超过或不超过约一周,例如不超过或不超过约6、5、4、3、2或1天,通常不超过或不超过约12小时、6小时、2小时、1小时或30分钟。在一些实施方案中,将含有L-谷氨酰胺的第一补充剂短期(例如在6、12、16、24、36、48小时内)或就在组合之前保持冷冻。在一些实施方案中,在与基础培养基组合之前,含有L-谷氨酰胺的第一补充剂是液体配制品,持续小于或小于约48、24、16、12、8、4或2小时。在一些实施方案中,合成氨基酸是L-谷氨酰胺的二肽。在一些实施方案中,合成氨基酸是L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[0662] 在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含为或约90%至98.75% (v/v) 的基础培养基和为或约1.25%至10% (v/v) 的第一补充剂。在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含为或约90%至97.5% (v/v) 的基础培养基和为或约1.25%至5% (v/v) 的第一补充剂。在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含为或约95% (v/v) 的基础培养基和为或约2.5%±0.2% (v/v) (例如为或约2.5% (v/v)) 的第一补充剂。在一些实施方案中,一升的基础培养基补充有为或约25毫升的第一补充剂。

[0663] 在一些实施方案中,所述方法还包括组合第二补充剂。在一些实施方案中,第二补充剂包含一种或多种另外的组分,例如上述的任何一种,包括一种或多种抗氧化剂、一种或多种白蛋白或白蛋白替代物、一种或多种脂质剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代物、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代物、一种或多种微量元素、和一种或多种糖皮质激素。上文描述了第二补充剂的示例性组分。

[0664] 在一些实施方案中,第二补充剂包含白蛋白、N-乙酰半胱氨酸(NAC)和乙醇胺。在一些实施方案中,第二补充剂包含白蛋白、N-乙酰半胱氨酸(NAC)和乙醇胺,其中白蛋白、NAC和/或乙醇胺的浓度使得在将第二补充剂与基础培养基(如本文所述的这些)组合之后,白蛋白、NAC和/或乙醇胺的浓度与本文所述的基本上相同。在一些实施方案中,白蛋白是人源白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是来自人血浆或血清的人源白蛋白。在一些实施方案中,第二补充剂是液体,并且不包含游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)或不包含显著量的游离形式的谷氨酰胺(即,L-谷氨酰胺)。

[0665] 在一些实施方案中,第二补充剂包含OpTmizer®补充剂(Thermofisher, A1048503的一部分)。

[0666] 在一些实施方案中,第二补充剂是液体。在一些实施方案中,第二补充剂不被冷冻,或不建议被冷冻用于存储。在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含约1.25%至5% (v/v) 的第二补充剂,例如或约2.5%±0.2%,例如或约2.5%或2.6%。在一些实施方案中,一升基础培养基补充有约26毫升的第二补充剂。

[0667] 在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含约90%至97.5% (v/v) 的基础培养基、约1.25%至5% (v/v) 的第一补充剂、和约1.25%至5% (v/v) 的第二补充剂。在一些实施方案中,无血清培养基配制品包含约95% (v/v) 的基础培养基、约2.5%±0.2% (v/v) 的第

一补充剂、和约2.5%±0.2% (v/v)的第二补充剂。

[0668] III. 重组受体

[0669] 在一些实施方案中,通过本文提供的方法(例如章节I中所述的方法)处理、加工、工程化和/或生产的细胞含有或表达或被工程化以含有或表达重组蛋白,如重组受体,例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。在某些实施方案中,本文提供的方法生产和/或能够生产被工程化以表达或含有重组蛋白的细胞、或含有和/或富集细胞的群体或组合物。在一些实施方案中,处理、加工、工程化和/或生产T细胞、或T细胞群体或组合物。

[0670] 在一些实施方案中,细胞包括经由基因工程化引入的一种或多种核酸,从而表达此类核酸的重组或基因工程化产物。在一些实施方案中,通过以下方式完成基因转移:首先刺激细胞,如通过将所述细胞与诱导应答(如增殖、存活和/或激活,例如如通过细胞因子或激活标记的表达所测量的)的刺激物组合,然后转导被激活的细胞,并且在培养中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0671] 受体包括抗原受体以及含有其一种或多种组分的受体。重组受体可以包括嵌合受体(例如含有配体结合结构域或其结合片段和细胞内信号传导结构域或区域的那些)、功能性非TCR抗原受体、嵌合抗原受体(CAR)、和T细胞受体(TCR)(如重组或转基因TCR)、嵌合自身抗体受体(CAAR)、和任何前述的组分。重组受体(如CAR)通常包括(在一些方面经由接头和/或一个或多个跨膜结构域)与一种或多种细胞内信号传导组分连接的细胞外抗原(或配体)结合结构域。

[0672] 1. 嵌合抗原受体(CAR)

[0673] 在一些实施方案中,提供了工程化细胞(如T细胞),其表达对特定抗原(或标记或配体)具有特异性的CAR,所述特定抗原是例如在特定细胞类型的表面上表达的抗原。在一些实施方案中,抗原是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,抗原在疾病或病症的细胞(例如,肿瘤或致病细胞)上选择性地表达或过表达。在其他实施方案中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0674] 在特定实施方案中,重组受体(如嵌合受体)含有细胞内信号传导区,所述细胞内信号传导区包括胞质信号传导结构域或区域(也可互换地称为细胞内信号传导结构域或区域),例如能够在T细胞中诱导初级激活信号的胞质(细胞内)区域,例如,T细胞受体(TCR)组分的胞质信号传导结构域或区域(例如,CD3-zeta(CD3 ζ)链的 ζ 链或其功能变体或信号传导部分的胞质信号传导结构域或区域);和/或所述细胞内信号传导区包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。

[0675] 在一些实施方案中,嵌合受体还含有与配体(例如抗原)抗原特异性地结合的细胞外配体结合结构域。在一些实施方案中,嵌合受体是CAR,其含有与抗原特异性地结合的细胞外抗原识别结构域。在一些实施方案中,配体(如抗原)是在细胞表面上表达的蛋白质。在一些实施方案中,CAR是TCR样CAR,并且抗原是加工过的肽抗原,如细胞内蛋白的肽抗原,其与TCR一样在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下在细胞表面上被识别。

[0676] 示例性抗原受体(包括CAR)以及将此类受体工程化并引入细胞中的方法包括例如国际专利申请公开号WO 200014257、WO 2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061;美国专利申请公开号US2002131960、

US2013287748、US 20130149337；美国专利号：6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118；以及欧洲专利申请号EP 2537416中描述的那些，和/或Sadelain等人，Cancer Discov.2013年4月；3(4):388-398；Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338；Turtle等人，Curr.Opin.Immunol.，2012年10月；24(5):633-39；Wu等人，Cancer，2012年3月18(2):160-75描述的那些。在一些方面，抗原受体包括如美国专利号7,446,190中所述的CAR以及国际专利申请公开号WO/2014055668A1中所述的那些。CAR的例子包括如在任何上述出版物中披露的CAR，所述出版物例如WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282；Kochenderfer等人，2013，Nature Reviews Clinical Oncology，10,267-276(2013)；Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701；和Brentjens等人，Sci Transl Med.2013 5(177)。还参见WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。

[0677] 在一些实施方案中，CAR被构建为具有对特定抗原(或标记或配体)的特异性，所述特定抗原是例如在过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原(例如，癌症标记)和/或旨在诱导衰减反应的抗原(如在正常或未患病细胞类型上表达的抗原)。因此，CAR通常在其细胞外部分中包括一种或多种抗原结合分子，如一种或多种抗原结合片段、结构域或部分，或者一种或多种抗体可变结构域，和/或抗体分子。在一些实施方案中，CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分，如源自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0678] 在一些实施方案中，抗体或其抗原结合部分作为重组受体(如抗原受体)的一部分在细胞上表达。所述抗原受体包括功能性非TCR抗原受体，如嵌合抗原受体(CAR)。通常，含有针对肽-MHC复合物展现出TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。在一些实施方案中，在一些方面，对TCR样CAR的MHC-肽复合物具特异性的细胞外抗原结合结构域通过接头和/或一个或多个跨膜结构域与一种或多种细胞内信号传导组分连接。在一些实施方案中，此类分子通常可以模拟或接近通过天然抗原受体(如TCR)的信号，并且模拟或接近任选地通过这种受体与共刺激受体组合的信号。

[0679] 在一些实施方案中，重组受体(如嵌合受体(例如CAR))包括与抗原(或配体)结合(如特异性地结合)的配体结合结构域。嵌合受体靶向的抗原包括在经由过继细胞疗法靶向的疾病、病症或细胞类型的背景下表达的那些抗原。所述疾病和病症包括增殖性、肿瘤性和恶性疾病和障碍，包括癌症和肿瘤，包括血液癌症、免疫系统癌症，如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤，如B型白血病、T型白血病和骨髓性白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0680] 在一些实施方案中，抗原(或配体)是多肽。在一些实施方案中，它是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中，与正常或非靶向细胞或组织相比，抗原(或配体)在疾病或病症的细胞(例如，肿瘤或致病细胞)上选择性地表达或过表达。在其他实施方案中，抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0681] 在一些实施方案中，CAR含有抗体或抗原结合片段(例如scFv)，其特异性地识别在细胞表面上表达的抗原(如完整抗原)。

[0682] 在一些实施方案中，所述抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标记。在一些实施方案

中,抗原或配体抗原是或包括 $\alpha v\beta 6$ 整合素($\alpha v\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原_{1B}(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、表皮生长因子蛋白(EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体C型家族5D(GPRC5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG,也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1,也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2,也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、Wilms肿瘤1(WT-1)、病原体特异性或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0683] 在一些实施方案中,CAR是对BCMA(例如人BCMA)具有特异性的抗BCMA CAR。先前已经描述了含有抗BCMA抗体(包括小鼠抗人BCMA抗体和人抗人抗体)的嵌合抗原受体,以及表达此类嵌合受体的细胞。参见Carpenter等人,Clin Cancer Res.,2013,19(8):2048-2060,WO 2016/090320、WO 2016090327、WO 2010104949A2和WO 2017173256。在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是BCMA。在一些实施方案中,scFv含有源自对BCMA具有特异性的抗体或抗体片段的V_H和V_L。在一些实施方案中,结合BCMA的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090327和WO 2016/090320中阐述的抗体或抗体片段的V_H和V_L。

[0684] 在一些实施方案中,抗BCMA CAR包含抗原结合结构域(如scFv),所述抗原结合结构域含有源自WO 2016/090320或WO 2016090327中所述的抗体的可变重链(V_H)区和/或可变轻链(V_L)区。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:30所示的V_H和SEQ ID NO:31所示的V_L。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:32所示的V_H和SEQ ID NO:33所示的V_L。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:34所示的V_H和SEQ ID NO:35所示的V_L。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)

含有SEQ ID NO:27所示的 V_H 和SEQ ID NO:28所示的 V_L 。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:41所示的 V_H 和SEQ ID NO:42所示的 V_L 。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:43所示的 V_H 和SEQ ID NO:44所示的 V_L 。在一些实施方案中,抗原结合结构域(如scFv)含有SEQ ID NO:45所示的 V_H 和SEQ ID NO:46所示的 V_L 。在一些实施方案中, V_H 或 V_L 具有展现出与任何前述 V_H 或 V_L 序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性并且保留与BCMA结合的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 区位于 V_L 区的氨基末端。在一些实施方案中, V_H 区位于 V_L 区的羧基末端。

[0685] 在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是CD19。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD19具有特异性的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。在一些实施方案中,结合CD19的抗体或抗体片段是小鼠来源的抗体,如FMC63和SJ25C1。在一些实施方案中,抗体或抗体片段是人抗体,例如如美国专利公开号US2016/0152723中所述。

[0686] 在一些实施方案中,CAR是对CD19(例如人CD19)具有特异性的抗CD19CAR。在一些实施方案中,scFv和/或 V_H 结构域衍生自FMC63。FMC63通常是指针对表达人源CD19的Nalm-1和-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.,等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,FMC63抗体包含分别如SEQ ID NO:50和51所示的CDR-H1和CDR-H2、和如SEQ ID NO:52或66所示的CDR-H3、以及如SEQ ID NO:47所示的CDR-L1、和如SEQ ID NO:48或67所示的CDR-L2、和如SEQ ID NO:49或68所示的CDR-L3。在一些实施方案中,FMC63抗体包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0687] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:47的CDR-L1序列、SEQ ID NO:48的CDR-L2序列和SEQ ID NO:49的CDR-L3序列的可变轻链,和/或含有SEQ ID NO:50的CDR-H1序列、SEQ ID NO:51的CDR-H2序列和SEQ ID NO:52的CDR-H3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含如SEQ ID NO:53所示的可变重链区和如SEQ ID NO:54所示的可变轻链区。在一些实施方案中,所述可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:70所示。在一些实施方案中,scFv依次包含 V_H 、接头和 V_L 。在一些实施方案中,scFv依次包含 V_L 、接头和 V_H 。在一些实施方案中,scFv由SEQ ID NO:69所示的核苷酸序列或展现出与SEQ ID NO:69至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:55至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0688] 在一些实施方案中,scFv源自SJ25C1。SJ25C1是针对人来源的表达CD19的Nalm-1和Nalm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含分别如SEQ ID NO:59-61所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,以及分别如SEQ ID NO:56-58所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3序列。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0689] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:56的CDR-L1序列、SEQ ID NO:57的CDR-L2序列和SEQ ID NO:58的CDR-L3序列的可变轻链,和/或含有SEQ ID NO:59的CDR-H1

序列、SEQ ID NO:60的CDR-H2序列和SEQ ID NO:61的CDR-H3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含如SEQ ID NO:62所示的可变重链区和如SEQ ID NO:63所示的可变轻链区。在一些实施方案中,可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:64所示。在一些实施方案中,scFv依次包含V_H、接头和V_L。在一些实施方案中,scFv依次包含V_L、接头和V_H。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列或展现出与SEQ ID NO:65至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0690] 在一些实施方案中,抗原是CD20。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD20具有特异性的抗体或抗体片段的V_H和V_L。在一些实施方案中,结合CD20的抗体或抗体片段是抗体,所述抗体来自或源自利妥昔单抗,如利妥昔单抗scFv。

[0691] 在一些实施方案中,抗原是CD22。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD22具有特异性的抗体或抗体片段的V_H和V_L。在一些实施方案中,结合CD22的抗体或抗体片段是抗体,所述抗体来自或源自m971,例如是m971scFv。

[0692] 在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是GPCR5D。在一些实施方案中,scFv含有源自对GPCR5D具特异性的抗体或抗体片段的V_H和V_L。在一些实施方案中,结合GPCR5D的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090329和WO 2016/090312中阐述的抗体或抗体片段的V_H和V_L。

[0693] 在一些实施方案中,抗体是包括一个或多个接头的抗原结合片段(如scFv),所述一个或多个接头连接两个抗体结构域或区域(如重链可变(V_H)区和轻链可变(V_L)区)。接头通常是肽接头,例如柔性和/或可溶性肽接头。接头包括富含甘氨酸和丝氨酸和/或在一些情况下苏氨酸的那些接头。在一些实施方案中,接头进一步包括带电荷的残基(如赖氨酸和/或谷氨酸),其可以改善溶解性。在一些实施方案中,接头进一步包括一个或多个脯氨酸。在一些方面,富含甘氨酸和丝氨酸(和/或苏氨酸)的接头包括至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的此类氨基酸。在一些实施方案中,它们包括至少或至少约50%、55%、60%、70%或75%的甘氨酸、丝氨酸和/或苏氨酸。在一些实施方案中,接头基本上完全由甘氨酸、丝氨酸和/或苏氨酸组成。接头的长度通常在约5个与约50个氨基酸之间,通常在为或约10个与为或约30个之间,例如10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个或30个,并且在一些例子中长度在10个与25个氨基酸之间。示例性接头包括具有各种数量的序列GGGGS(4GS;SEQ ID NO:36)或GGGS(3GS;SEQ ID NO:37)的重复的接头,例如在这样的序列的2个、3个、4个和5个重复之间。示例性接头包括具有如SEQ ID NO:38(GGGGSGGGGSGGGGS)、SEQ ID NO:39(GSTSGSGKPGSGEGSTKG)或SEQ ID NO:40(SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA)所示的序列或由其组成的那些。

[0694] 在一些实施方案中,抗原是或包括病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中,抗原是病毒抗原(如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。在一些实施方案中,CAR含有TCR样抗体,如抗体或抗原结合片段(例如scFv),其特异性地识别作为MHC-肽复合物存在于细胞表面上的细胞内抗原(如肿瘤相关抗原)。在一些实施方案中,识别MHC-肽复合物的抗体或其抗原结合部分可以作为重组受体(如抗原受体)的一部分在细胞上表达。所述抗原受体包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。

通常,含有针对肽-MHC复合物展现出TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。

[0695] 提及“主要组织相容性复合物”(MHC)是指含有多态性肽结合位点或结合沟的蛋白质,通常是糖蛋白,在一些情况下,所述蛋白质可以与多肽的肽抗原(包括由细胞机器加工的肽抗原)复合。在一些情况下,MHC分子可以在细胞表面上展示或表达,包括作为与肽的复合物,即MHC-肽复合物,用于呈递具有T细胞上的抗原受体(如TCR或TCR样抗体)可识别的构象的抗原。通常,MHC I类分子是异二聚体,其具有跨越 α 链的膜,在一些情况下具有三个 α 结构域和非共价缔合的 β 2微球蛋白。通常,MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 构成,两者通常都跨越膜。MHC分子可以包括MHC的有效部分,其含有抗原结合位点或用于结合肽的位点以及由适当抗原受体识别所必需的序列。在一些实施方案中,MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中MHC-肽复合物由T细胞(如通常是CD8⁺T细胞,但是在一些情况下是CD4⁺T细胞)识别。在一些实施方案中,MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面,其中所述肽通常由CD4⁺T细胞识别。通常,MHC分子由一组连锁基因座编码,其在小鼠中统称为H-2并且在人中统称为人白细胞抗原(HLA)。因此,通常人MHC也可以称为人白细胞抗原(HLA)。

[0696] 术语“MHC-肽复合物”或“肽-MHC复合物”或其变体是指肽抗原与MHC分子的复合物或缔合物,例如通常通过所述肽在MHC分子的结合沟或裂缝中的非共价相互作用来形成。在一些实施方案中,MHC-肽复合物存在或展示于细胞表面上。在一些实施方案中,MHC-肽复合物可以由抗原受体(如TCR、TCR样CAR或其抗原结合部分)特异性地识别。

[0697] 在一些实施方案中,多肽的肽(如肽抗原或表位)可以与MHC分子缔合,例如用于由抗原受体识别。通常,肽源自或基于较长生物分子(如多肽或蛋白质)的片段。在一些实施方案中,肽的长度通常为约8至约24个氨基酸。在一些实施方案中,肽的长度为从或从约9至22个氨基酸,用于在MHC II类复合物中识别。在一些实施方案中,肽的长度为从或从约8至13个氨基酸,用于在MHC I类复合物中识别。在一些实施方案中,在识别MHC分子(如MHC-肽复合物)背景下的肽后,抗原受体(如TCR或TCR样CAR)产生或触发激活信号至T细胞,从而诱导T细胞反应,如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞反应或其他反应。

[0698] 在一些实施方案中,TCR样抗体或抗原结合部分是已知的或可通过已知方法产生(参见例如美国公开申请号US2002/0150914;US2003/0223994;US2004/0191260;US2006/0034850;US2007/00992530;US20090226474;US20090304679;和国际PCT公开号WO 03/068201)。

[0699] 在一些实施方案中,与MHC-肽复合物特异性地结合的抗体或其抗原结合部分可以通过用有效量的含有特定MHC-肽复合物的免疫原对宿主进行免疫来产生。在一些情况下,MHC-肽复合物的肽是能够与MHC结合的抗原的表位,所述抗原是例如肿瘤抗原,例如通用肿瘤抗原、骨髓瘤抗原或如下文所述的其他抗原。在一些实施方案中,然后向宿主给予有效量的免疫原以用于引发免疫应答,其中免疫原保持其三维形式持续足以引发针对所述肽在MHC分子的结合沟中的三维呈现的免疫应答的时间段。然后测定从宿主中收集的血清以确定是否产生了识别MHC分子结合沟中的肽的三维呈现的所需抗体。在一些实施方案中,可以评估所产生的抗体以确认所述抗体可以区分MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的目标肽以及MHC与无关肽的复合物。然后可以分离所需抗体。

[0700] 在一些实施方案中,与MHC-肽复合物特异性地结合的抗体或其抗原结合部分可以通过采用抗体文库展示方法(如噬菌体抗体文库)来产生。在一些实施方案中,可以产生突变型Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库,例如,其中所述文库的成员在一个或多个CDR的一个或多个残基处发生突变。参见例如美国公开申请号US20020150914、US2014/0294841;以及Cohen CJ.等人(2003)J Mol.Recogn.16:324-332。

[0701] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性地结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式,如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体、多特异性(例如,双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应当理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0702] 术语“互补决定区”和“CDR”与“高变区”或“HVR”同义,在本领域中是已知的,指代抗体可变区内的氨基酸的非连续序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,在每个重链可变区中有三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且在每个轻链可变区中有三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区”和“FR”在本领域中是已知的,指代重链和轻链的可变区的非CDR部分。通常,在每个全长重链可变区中有四个FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),并且在每个全长轻链可变区中有四个FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。

[0703] 给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用许多熟知的方案中的任何一种容易地确定,所述方案包括以下文献中所述的那些:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,贝塞斯达,马里兰州(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745”(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003年1月;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”JMol Biol,2001年6月8日;309(3):657-70(“Aho”编号方案);和Martin等人,“Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm,”PNAS,1989,86(23):9268-9272(“AbM”编号方案)。

[0704] 给定CDR或FR的边界可能取决于用于鉴定的方案而变化。例如,Kabat方案是基于结构比对,而Chothia方案是基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号都是基于最常见的抗体区域序列长度,其中通过插入字母提供插入(例如“30a”)并且在一些抗体中出现缺失。这两种方案将某些插入和缺失(“插入缺失(indel)”)放置在不同的位置,从而产生不同的编号。Contact方案是基于对复杂晶体结构的分析,并且在许多方面与Chothia编号方案相

似。AbM方案是介于Kabat与Chothia定义之间的折衷,其基于Oxford Molecular的AbM抗体建模软件所使用的方案。

[0705] 以下表1列出了分别通过Kabat、Chothia、AbM和Contact方案鉴定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3以及CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的示例性位置边界。对于CDR-H1,使用Kabat和Chothia两种编号方案列出了残基编号。FR位于CDR之间,例如,其中FR-L1位于CDR-L1之前,FR-L2位于CDR-L1与CDR-L2之间,FR-L3位于CDR-L2与CDR-L3之间,等等。应注意,因为所示的Kabat编号方案在H35A和H35B处放置插入,所以当使用所示的Kabat编号惯例进行编码时Chothia CDR-H1环的末端取决于环的长度而在H32与H34之间变化。

[0706] 表1. 根据各种编号方案的CDR的边界。

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat编号 ¹)	H31--H35B	H26--H32.34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia编号 ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0708] 1-Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,贝塞斯达,马里兰州2-A1-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948

[0709] 因此,除非另有规定,否则应当理解给定抗体或其区域(如其可变区)的“CDR”或“互补决定区”或单个指定的CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)涵盖如由任何上述方案或其他已知方案所定义的一个(或特定的)互补决定区。例如,在声明特定的CDR(例如,CDR-H3)含有给定V_H或V_L区氨基酸序列中的相应CDR的氨基酸序列的情况下,应理解,这样的CDR具有在可变区内的相应CDR(例如,CDR-H3)的序列,如由任何上述方案或其他已知方案所定义的。在一些实施方案中,指定了特定的CDR序列。使用各种编号方案描述抗体的示例性CDR序列,但应当理解,抗体可以包括如根据任何其他上述编号方案或熟练技术人员已知的其他编号方案所描述的CDR。

[0710] 同样,除非另有规定,否则应当理解给定抗体或其区域(如其可变区)的FR或单独指定的一个或多个FR(例如,FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)涵盖如由任何已知方案所定义的一个(或特定的)框架区。在一些情形中,规定了用于鉴定特定的CDR、FR或者FR或CDR的方案,如通过Kabat、Chothia、AbM或Contact方法或其他已知方案定义的CDR。在其他情况下,给出了CDR或FR的特定氨基酸序列。

[0711] 在一些实施方案中,抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性地识别全长抗体的抗原。在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别是IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,抗体轻链恒定区选自例如κ或λ,特别是κ。

[0712] 抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和单结构域V_H单一抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0713] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(例如参见Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007)。单个V_H或V_L结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0714] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方案中,CAR包含特异性地结合抗原的抗体重链结构域,所述抗原例如癌症标记或待靶向的细胞或疾病(例如肿瘤细胞或癌细胞)的细胞表面抗原,例如本文所述或已知的任何靶抗原。

[0715] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,抗体是重组产生的片段,如包含天然不存在的排列的片段(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的那些),和/或可以不通过酶消化天然存在的完整抗体产生的片段。在一些实施方案中,抗体片段是scFv。

[0716] “人源化”抗体是这样的抗体,其中全部或基本上全部CDR氨基酸残基源自非人CDR并且全部或基本上全部FR氨基酸残基源自人FR。人源化抗体任选地可以包括源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指所述非人抗体的变体,其已经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生出CDR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0717] 因此,在一些实施方案中,嵌合抗原受体(包括TCR样CAR)包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导区。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体(TCR)组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域。

[0718] 在一些实施方案中,重组受体(如CAR,如其抗体部分)还包括间隔子,所述间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分或其变体或经修饰形式,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或C_H1/C_L和/或Fc区。在一些实施方案中,重组受体还包含间隔子和/或铰链区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的。在一些方面,恒定区的所述部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在间隔子的

情况相比,间隔子的长度可以提供在抗原结合后增加的细胞反应性。

[0719] 在一些例子中,间隔子的长度为或为约12个氨基酸或者长度不超过12个氨基酸。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括单独的IgG4铰链、与C_H2和C_H3结构域连接的IgG4铰链或与C_H3结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于以下文献中所述的那些:Hudecek等人(2013) Clin.Cancer Res.,19:3153;Hudecek等人(2015) Cancer Immunol Res.3(2):125-135;或国际专利申请公开号W0 2014031687、美国专利号8,822,647或公开的申请号US2014/0271635。在一些实施方案中,间隔子包括免疫球蛋白铰链区、C_H2区和C_H3区的序列。在一些实施方案中,铰链、C_H2和C_H3中的一个或多个全部或部分源自IgG4或IgG2。在一些情况下,铰链、C_H2和C_H3源自IgG4。在一些方面,铰链、C_H2和C_H3中的一个或多个是嵌合的并且含有源自IgG4和IgG2的序列。在一些例子中,间隔子含有IgG4/2嵌合铰链、IgG2/4C_H2区、和IgG4 C_H3区。

[0720] 在一些实施方案中,间隔子可以全部或部分源自IgG4和/或IgG2,并且可以含有突变,例如在一个或多个结构域中的一个或多个单氨基酸突变。在一些例子中,氨基酸修饰是在IgG4的铰链区中脯氨酸(P)对丝氨酸(S)的取代。在一些实施方案中,氨基酸修饰是减少糖基化异质性的谷氨酰胺(Q)对天冬酰胺(N)的取代,例如全长IgG4 Fc序列CH2区中位置177处的N177Q突变、或在全长IgG4 Fc序列CH2区中位置176处的N176Q。

[0721] 在一些实施方案中,所述间隔子具有序列ESKYGPPCPPCP(示于SEQ ID NO:1中),并且由SEQ ID NO:2所示的序列编码。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:3中所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:4所示的序列。在一些实施方案中,编码的间隔子是或含有SEQ ID NO:29所示的序列。在一些实施方案中,恒定区或部分IgD的。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:5所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔子具有展现与SEQ ID NO:1、3、4、5或29中的任一者至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0722] 在一些实施方案中,恒定区或部分IgD的。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:5所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有展现与SEQ ID NO:1、3、4和5中的任一序列至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0723] 抗原识别结构域通常与一种或多种细胞内信号传导组分(如模拟通过抗原受体复合物(如TCR复合物)(在CAR的情况下)进行激活和/或经由另一种细胞表面受体传导信号的信号传导组分)连接。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)与一个或多个跨膜和细胞内信号传导区连接。在一些实施方案中,跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用天然与受体(例如,CAR)中的一个结构域缔合的跨膜结构域。在一些情形中,通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0724] 在一些实施方案中,跨膜结构域源自天然来源或源自合成来源。在来源是天然的情况下,结构域在一些方面源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自以下的那些(即包含以下的至少一个或多个跨膜区):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154。可替代地,在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成跨膜结构域主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,所述连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域来实现。

[0725] 细胞内信号传导区包括模拟或接近通过天然抗原受体的信号、模拟或接近通过这种受体与共刺激受体组合的信号和/或模拟或接近仅通过共刺激受体的信号的那些。在一些实施方案中,存在短的寡肽或多肽接头,例如长度在2与10个氨基酸之间的接头(如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体),并且在CAR的跨膜结构域与胞质信号传导结构域之间形成连接。

[0726] 受体(例如,CAR)通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面,ROR1结合抗体与一个或多个细胞信号传导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,受体(例如,CAR)还包括一种或多种另外的分子(如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,CAR包括CD3-zeta (CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0727] 在一些实施方案中,在连接CAR后,CAR的胞质结构域或细胞内信号传导区激活免疫细胞(例如,工程化以表达CAR的T细胞)的正常效应子功能或应答中的至少一种。例如,在一些情境下,CAR诱导T细胞的功能,如细胞溶解活性或T辅助活性,如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导区的截短部分(例如,如果其转导效应子功能信号的话)代替完整的免疫刺激链。在一些实施方案中,细胞内信号传导区(例如,包含一个或多个细胞内结构域)包括T细胞受体(TCR)的胞质序列,并且在一些方面还包括共受体(其在天然背景下与这种受体并行起作用以在抗原受体接合后启动信号转导)和/或此类分子的任何衍生物或变体的那些,和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0728] 在天然TCR的背景下,完全激活通常不仅需要通过TCR进行信号传导,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于产生次级或共刺激信号的组分也被包括在CAR中。在其他实施方案中,CAR不包括用于产生共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在同一细胞中表达,并且提供用于产生次级或共刺激信号的组分。

[0729] 在一些方面,将T细胞激活描述为由两个类别的胞质信号传导序列来介导:通过TCR启动抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列)以及以抗原非依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。在一些方面,CAR包括此类信号传导组分之一或两者。

[0730] 在一些方面,CAR包括调节TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其称为基于免疫受体酪氨

酸的激活基序或ITAM)。含有ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括源自TCR或CD3 ζ 、FcR γ 或FcR β 的那些。在一些实施方案中,CAR中的一种或多种胞质信号传导分子含有源自CD3 ζ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0731] 在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体(如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导区和/或跨膜部分。在一些方面,同一CAR包括信号传导区和共刺激组分两者。

[0732] 在一些实施方案中,信号传导区包括于一种CAR内,而共刺激组分是由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括在同一细胞上表达的激活或刺激CAR和共刺激CAR(参见WO 2014/055668)。

[0733] 在某些实施方案中,细胞内信号传导区包含连接至CD3(例如,CD3- ζ)细胞内结构域的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含与CD3 ζ 细胞内结构域连接的嵌合CD28和CD137(4-1BB,TNFRSF9)共刺激结构域。

[0734] 在一些实施方案中,CAR涵盖在胞质部分中的一个或多个(例如,两个或更多个)共刺激结构域和激活结构域(例如,初级激活结构域)。示例性CAR包括CD3 ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0735] 在一些情况下,CAR称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面,第三代CAR是在一些方面包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0736] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括含有本文所述的抗体或片段的细胞外部分。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有本文所述的抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv或单结构域V_H抗体,并且细胞内结构域含有ITAM。在一些方面,细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta(CD3 ζ)链的 ζ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括设置在细胞外结构域与细胞内信号传导区之间的跨膜结构域。

[0737] 在一些方面,跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。细胞外结构域和跨膜可以直接或间接连接。在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜通过间隔子(如本文所述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域,如在跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0738] 在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如,抗体片段)、跨膜结构域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR含有抗体(例如,抗体片段)、跨膜结构域(其是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体)以及含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在此类实施方案中,受体还包括含有Ig分子(如人Ig分子)的一部分(如Ig铰链,例如IgG4铰链)的间隔子,如仅铰链间隔子。

[0739] 在一些实施方案中,受体(例如CAR)的跨膜结构域是人CD28的跨膜结构域或其变体,例如人CD28(登录号:P10747.1)的27个氨基酸的跨膜结构域,或者是包含SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:8至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域；在一些实施方案中，含有重组受体的部分的跨膜结构域包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0740] 在一些实施方案中，嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些方面，T细胞共刺激分子是CD28或4-1BB。

[0741] 在一些实施方案中，细胞内信号传导区包含人CD28的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分，如其41个氨基酸的结构域，和/或在天然CD28蛋白的位置186-187处具有LL至GG取代的这种结构域。在一些实施方案中，细胞内信号传导区和/或结构域可以包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列，或展现与SEQ ID NO:10或11至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，细胞内区域包含4-1BB的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分，例如人4-1BB(登录号Q07011.1)的42个氨基酸的胞质结构域或其功能变体或部分，例如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:12至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0742] 在一些实施方案中，细胞内信号传导区包含人CD3链、任选地CD3 ζ 刺激信号传导结构域或其功能变体，如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)的亚型3的112个AA的胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中，细胞内信号传导区包含SEQ ID NO:13、14或15所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:13、14或15至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0743] 在一些方面，所述间隔子仅含有IgG的铰链区，如仅IgG4或IgG1的铰链，如SEQ ID NO:1所示的仅铰链间隔子。在其他实施方案中，间隔子是与C_H2和/或C_H3结构域连接的Ig铰链，例如IgG4铰链。在一些实施方案中，间隔子是与C_H2和C_H3结构域连接的Ig铰链，例如IgG4铰链，如SEQ ID NO:3中所示。在一些实施方案中，间隔子是仅与C_H3结构域连接的Ig铰链，例如IgG4铰链，如SEQ ID NO:4中所示。在一些实施方案中，间隔子是或包含富甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头，如已知的柔性接头。

[0744] 2.T细胞受体(TCR)

[0745] 在一些实施方案中，提供了工程化细胞(如T细胞)，其表达识别靶多肽(如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的T细胞受体(TCR)或其抗原结合部分。

[0746] 在一些实施方案中，“T细胞受体”或“TCR”是含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR α 和TCR β)的分子或其抗原结合部分，并且所述分子或其抗原结合部分能够与结合至MHC分子的肽特异性地结合。在一些实施方案中，TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常，以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR在结构上总体上相似，但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖学位置或功能。TCR可以在细胞表面上发现或以可溶形式发现。通常，在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现TCR，在此处它通常负责识别结合至主要组织相容性复合物(MHC)分子的抗原。

[0747] 除非另有说明，否则术语“TCR”应当理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或

抗原结合片段。在一些实施方案中,TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,TCR是这样的抗原结合部分,其少于全长TCR但与在MHC分子中结合的特定肽结合,如与MHC-肽复合物结合。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构性结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变 α 链和可变 β 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有参与对肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0748] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有超变环或互补决定区(CDR),其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各个CDR通常由框架区(FR)隔开,与CDR相比,所述框架区通常在TCR分子之间展示较低可变性(参见,例如, Jores等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. U.S.A.* 87:9138, 1990; Chothia等人, *EMBO J.* 7:3745, 1988; 还参见 Lefranc等人, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者在给定TCR可变区上在三个CDR中对于抗原识别和/或对于与肽-MHC复合物的经加工肽部分的相互作用最重要。在一些情境下, α 链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情境下, β 链的CDR1可以与肽的C末端部分相互作用。在一些情境下,CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中, β 链的可变区可以含有其他高变区(CDR4或HVR4),其通常参与超抗原结合而非抗原识别(Kotb(1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 411-426)。

[0749] 在一些实施方案中,TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见例如, Janeway等人, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 第3版, Current Biology Publications, 第4页:33, 1997)。在一些方面,TCR的每条链可以具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C末端的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0750] 在一些实施方案中,TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如,给定TCR链(例如, α 链或 β 链)的细胞外部分可以含有与细胞膜相邻的两个免疫球蛋白样结构域,如可变结构域(例如, $V\alpha$ 或 $V\beta$;通常为基于Kabat编号的氨基酸1至116, Kabat等人, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 第5版)和恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或 $C\alpha$,通常为基于Kabat编号的链的位置117至259;或 β 链恒定结构域或 $C\beta$,通常为基于Kabat的链的位置117至295)。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,所述可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可以含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可以在 α 链和 β 链中的每一个中具有另外的半胱氨酸残基,使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0751] 在一些实施方案中,TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,TCR链含有胞质尾。在一些情况下,所述结构允许TCR与其他分子(像CD3)及其亚基缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将蛋白质锚定在细胞膜中并

与CD3信号传导设备或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如,CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链)的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM。

[0752] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 α 和 β (或者任选地 γ 和 δ)的异二聚体,或者它可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有如通过一个或多个二硫键连接的两条单独链(α 和 β 链或 γ 和 δ 链)的异二聚体。

[0753] 在一些实施方案中,TCR可以从一个或多个已知的TCR序列(如V α 、V β 链的序列)产生,所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是容易获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码TCR的核酸可以从多种来源获得,如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞中分离的编码TCR的核酸的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可获得的TCR DNA序列的合成获得。

[0754] 在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,如来自细胞(如来自T细胞(例如细胞毒性T细胞))、T细胞杂交瘤或其他公众可获得的来源。在一些实施方案中,T细胞可以从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是经培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分或其抗原结合片段可以根据对所述TCR序列的知识以合成方式产生。

[0755] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR产生的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的V α 和V β 库来产生,所述T细胞是从受试者中分离的,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细胞可以从肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增。在一些实施方案中,TCR文库可以从CD4⁺或CD8⁺细胞产生。在一些实施方案中,TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源扩增,即正常TCR文库。在一些实施方案中,TCR可以从患病受试者的T细胞来源扩增,即患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增V α 和V β 的基因库,如在从人获得的样品(如T细胞)中通过RT-PCR扩增。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然V α 和V β 文库组装,其中经扩增的产物被克隆或组装以通过接头隔开。根据受试者和细胞的来源,所述文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。在一些方面,使TCR经历例如 α 或 β 链的定向进化,如通过诱变来进行。在一些方面,TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,可以通过亲和力成熟来修饰经选择的TCR。在一些实施方案中,可以如通过筛选以评估针对肽的CTL活性来选择抗原特异性T细胞。在一些方面,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,如通过结合活性,例如对抗原的特定亲和力或亲合力来选择。

[0756] 在一些实施方案中,基因工程化的抗原受体包括从天然存在的T细胞克隆的重组T细胞受体(TCR)和/或TCR。在一些实施方案中,从患者鉴定、分离靶抗原(例如,癌抗原)的高亲和力T细胞克隆,并将其引入细胞中。在一些实施方案中,已经在用人免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统或HLA)工程化的转基因小鼠中产生针对靶抗原的TCR克隆。参见,例如,肿瘤抗原(参见,例如,Parkhurst等人(2009) Clin Cancer Res.15:169-180和Cohen等人(2005) J Immunol.175:5799-5808。在一些实施方案中,使用噬菌体展示来分离针对靶抗

原的TCR (参见,例如,Varela-Rohena等人(2008) *Nat Med*.14:1390-1395和Li (2005) *Nat Biotechnol*.23:349-354。

[0757] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已修饰或工程化的TCR或其抗原结合部分。在一些实施方案中,使用定向进化方法来产生具有改变的特性(如对特定MHC-肽复合物具有较高亲和力)的TCR。在一些实施方案中,通过展示方法来实现定向进化,所述展示方法包括但不限于酵母展示(Holler等人,(2003) *Nat Immunol*,4,55-62;Holler等人(2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*,97,5387-92)、噬菌体展示(Li等人(2005) *Nat Biotechnol*,23,349-54)、或T细胞展示(Chervin等人(2008) *J Immunol Methods*,339,175-84)。在一些实施方案中,展示方法涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,在一些情况下,野生型TCR可以用作模板以用于产生经诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(如对所需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0758] 在一些实施方案中,用于产生或生成目标TCR的靶多肽的肽是已知的或可以由熟练技术人员容易地鉴定。在一些实施方案中,适用于产生TCR或抗原结合部分的肽可以基于目标靶多肽(如下文所述的靶多肽)中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中,使用可用的计算机预测模型来鉴定肽。在一些实施方案中,对于预测MHC I类结合位点,此类模型包括但不限于ProPred1(Singh和Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237)以及SYFPEITHI(参见Schuler等人(2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*,409(1):75-93 2007)。在一些实施方案中,MHC限制性表位是HLA-A0201,其在所有高加索人的大约39%-46%中表达,并且因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0759] 使用计算机预测模型的HLA-A0201结合基序以及蛋白酶体和免疫蛋白酶体的切割位点是已知的。用于预测MHC I类结合位点的此类模型包括但不限于ProPred1(更详细地描述于Singh和Raghava, *ProPred: prediction of HLA-DR binding sites*. *BIOINFORMATICS*17(12):1236-1237 2001)和SYFPEITHI(参见Schuler等人SYFPEITHI, *Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction*., *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*,第409(1)卷:75-93 2007)中。

[0760] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白或其突变形式,其中一种或多种特性(如结合特征)已发生改变。在一些实施方案中,TCR可以源自多个动物物种之一,如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,TCR呈在细胞表面上表达的细胞结合形式。

[0761] 在一些实施方案中,TCR是全长TCR。在一些实施方案中,TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,TCR是二聚体TCR(dTCR)。在一些实施方案中,TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685、WO 2011/044186中所述的结构。

[0762] 在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,TCR能够形成与CD3的TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与信号传导结构域连接,从而在T细胞表面上产生活性TCR。在一些实施方案中,TCR在细胞表面上表达。

[0763] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与

对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),所述第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,所述键可以对应于天然二聚体 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键两者。在一些实施方案中,TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0764] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链,所述TCR α 链含有可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接于恒定 α 结构域C末端的第一二聚化基序;以及TCR β 链,所述TCR β 链包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接于恒定 β 结构域C末端的第一二聚化基序,其中所述第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键,从而将TCR α 链与TCR β 链连接在一起。

[0765] 在一些实施方案中,TCR是scTCR。通常,可以使用已知的方法产生scTCR,参见例如Soo Hoo, W.F.等人PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C.和Plückthun, A., J.Mol.Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I.等人PNAS (USA) 903830 (1993); 国际公开PCT号W0 96/13593、W0 96/18105、W099/60120、W099/18129、W0 03/020763、W02011/044186;和Schlueter, C.J.等人J.Mol.Biol. 256, 859 (1996)。在一些实施方案中,scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见例如,国际公开PCT号W0 03/020763)。在一些实施方案中,scTCR是非二硫键连接的截短的TCR,其中与其C末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如国际公开PCT号W0 99/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有通过肽接头与TCR β 可变结构域共价连接的TCR α 可变结构域(参见例如,国际公开PCT号W0 99/18129)。

[0766] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成)、第二区段(其由与对应于TCR β 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端融合的对应该于TCR β 链可变区序列的氨基酸序列构成)和接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0767] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 α 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0768] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 β 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCR β 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 α 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0769] 在一些实施方案中,scTCR的连接第一和第二TCR区段的接头可以是能够在保留TCR结合特异性的同时形成单条多肽链的任何接头。在一些实施方案中,接头序列可以例如具有式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸并且AA代表氨基酸序列,其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,第一和第二区段配对,使得其可变区序列定向用于这种结合。因此,在一些情况下,接头具有足够的长度以跨越第一区段的C末端与第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长而阻断或减少scTCR与靶配体的结合。在一些实施方案中,接头可以含有从或从约10至45个氨基酸,如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、

30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中,所述接头具有式-PGGG-(SGGGG)₅-P-,其中P是脯氨酸,G是甘氨酸,并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,所述接头具有序列GSADD AKKDAAKKD GKS(SEQ ID NO:23)。

[0770] 在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,其将 α 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至 β 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基。在一些实施方案中,天然TCR中不存在链间二硫键。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键两者。

[0771] 在dTCR或scTCR含有引入的链间二硫键的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸被取代为另一种残基,如丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,引入的二硫键可以通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成。TCR的示例性非天然二硫键描述于已公开的国际PCT号WO 2006/000830中。

[0772] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段对靶抗原以平衡结合常数展现出亲和力,所述平衡结合常数在或在约 10^{-5} 与 10^{-12} M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中,靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0773] 在一些实施方案中,编码TCR(如 α 和 β 链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的手段扩增,并且克隆到一种或多种合适的表达载体中。表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于两者的那些,如质粒和病毒。

[0774] 在一些实施方案中,载体可以是以下系列的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如 λ G10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中,使用病毒载体,如逆转录病毒载体。

[0775] 在一些实施方案中,重组表达载体可以使用标准的重组DNA技术来制备。在一些实施方案中,载体可以含有调节序列(如转录和翻译起始和终止密码子),其对待引入载体的宿主的类型(例如,细菌、真菌、植物或动物)具有特异性,酌情并考虑载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,载体可以含有非天然启动子,其与编码TCR或抗原结合部分(或其他MHC-肽结合分子)的核苷酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还设想其他已知的启动子。

[0776] 在一些实施方案中,在获得T细胞克隆后,将TCR α 和 β 链分离并克隆到基因表达载体中。在一些实施方案中,TCR α 和 β 基因经由小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽连接,使得两条链共表达。在一些实施方案中,TCR的遗传转移是通过逆转录病毒或慢病毒载体或通过转座子完成(参见例如Baum等人(2006)Molecular Therapy:The Journal of the American

Society of Gene Therapy.13:1050-1063;Frecha等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;和Hackett等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-683。

[0777] 在一些实施方案中,为了产生编码TCR的载体,将 α 和 β 链从表达目标TCR的T细胞克隆中分离的总cDNA进行PCR扩增,并且将其克隆到表达载体中。在一些实施方案中,将 α 和 β 链克隆到同一载体中。在一些实施方案中,将 α 和 β 链克隆到不同的载体中。在一些实施方案中,将所产生的 α 和 β 链掺入逆转录病毒(例如,慢病毒)载体中。

[0778] 3. 嵌合自身抗体受体 (CAAR)

[0779] 在一些实施方案中,重组受体是嵌合自身抗体受体 (CAAR)。在一些实施方案中,CAAR对自身抗体具有特异性。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞(如工程化以表达CAAR的T细胞)可以用于特异性地结合并杀伤表达自身抗体的细胞,但不杀伤表达正常抗体的细胞。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于治疗与自身抗原的表达相关的自身免疫性疾病,如自身免疫性疾病。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以靶向最终产生自身抗体并在其细胞表面上展示自身抗体的B细胞,将这些B细胞标记为用于治疗干预的疾病特异性靶标。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于通过使用抗原特异性嵌合自身抗体受体靶向引起疾病的B细胞,有效靶向和杀伤自身免疫性疾病中的致病性B细胞。在一些实施方案中,重组受体是CAAR,如美国专利申请公开号US2017/0051035中所述的任一种。

[0780] 在一些实施方案中,CAAR包含自身抗体结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导区。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含次级或共刺激信号传导区(次级细胞内信号传导区)。

[0781] 在一些实施方案中,自身抗体结合结构域包含自身抗原或其片段。自身抗原的选择可以取决于所靶向的自身抗体的类型。例如,可以因为自身抗原识别与特定疾病状态(例如自身免疫性疾病,如自身抗体介导的自身免疫性疾病)相关的靶细胞(如B细胞)上的自身抗体而选择所述自身抗原。在一些实施方案中,自身免疫性疾病包括寻常型天疱疮(PV)。示例性自身抗原包括桥粒芯糖蛋白1(Dsg1)和Dsg3。

[0782] 4. 多靶向

[0783] 在一些实施方案中,所述细胞和方法包括多靶向策略,如在细胞上表达两种或更多种基因工程化受体,每种受体识别相同或不同的抗原,并且通常各自包括不同的细胞内信号传导组分。此类多靶向策略描述于例如以下文献中:国际专利申请公开号W02014055668 A1(描述激活和共刺激CAR的组合,例如,靶向单独存在于脱靶(例如正常细胞)上,但仅一起存在于待治疗疾病或病症的细胞上的两种不同抗原)和Fedorov等人, Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)(描述表达激活和抑制性CAR的细胞,例如其中激活CAR结合至同时在正常或非患病细胞和待治疗疾病或病症的细胞上表达的一种抗原,并且抑制性CAR结合至仅在正常细胞或不希望治疗的细胞上表达的另一种抗原的那些细胞)。

[0784] 例如,在一些实施方案中,细胞包括表达第一基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR)的受体,其通常在与由第一受体识别的抗原(例如,第一抗原)特异性地结合后能够诱导激活或刺激信号至所述细胞。在一些实施方案中,细胞还包括第二基因工程化抗原受体(例如,CAR或TCR),例如嵌合共刺激受体,所述受体通常在与由第二受体识别的第二抗原特异性地结合后能够诱导共刺激信号至免疫细胞。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是不同的。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原是不同的。

[0785] 在一些实施方案中,第一和/或第二基因工程化抗原受体(例如CAR或TCR)能够诱导激活或刺激信号至所述细胞。在一些实施方案中,受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,由第一受体诱导的激活涉及信号转导或细胞中蛋白质表达的变化,导致启动免疫应答(例如ITAM磷酸化)和/或启动ITAM介导的信号转导级联、形成免疫突触和/或所结合受体(例如CD4或CD8等)附近的分子的聚簇、激活一种或多种转录因子(例如NF- κ B和/或AP-1)、和/或诱导因子(例如细胞因子)的基因表达、增殖和/或存活。

[0786] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括共刺激受体的细胞内信号传导结构域,所述共刺激受体例如CD28、CD137(4-1BB)、OX40和/或ICOS。在一些实施方案中,第一和第二受体包括不同的共刺激受体的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,第一受体含有CD28共刺激信号传导区,并且第二受体含有4-1BB共刺激信号传导区,或反之亦然。

[0787] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域和共刺激受体的细胞内信号传导结构域两者。

[0788] 在一些实施方案中,第一受体含有包含ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导结构域,并且第二受体含有共刺激受体的细胞内信号传导结构域。与在相同细胞中诱导的激活或刺激信号组合的共刺激信号是导致免疫应答的共刺激信号,所述免疫应答例如为稳健且持续的免疫应答,例如增加的基因表达,细胞因子和其他因子的分泌,以及T细胞介导的效应子功能(如细胞杀伤)。

[0789] 在一些实施方案中,仅第一受体的连接和仅第二受体的连接都不会诱导稳健的免疫应答。在一些方面,如果仅连接一种受体,则细胞变得耐受抗原或对抗原无反应,或被抑制,和/或不被诱导增殖或分泌因子或实现效应子功能。然而,在一些此类实施方案中,在连接所述多种受体时,如在遇到表达第一和第二抗原的细胞时,实现所需反应,如完全免疫激活或刺激,例如通过一种或多种细胞因子的分泌、增殖、持久性和/或实施免疫效应子功能(如对靶细胞的细胞毒性杀伤)所指示。

[0790] 在一些实施方案中,两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞,使得一种受体与其抗原的结合激活细胞或诱导反应,但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导了抑制或减弱所述反应的信号。例子是激活CAR与抑制性CAR或iCAR的组合。例如,可以使用这种策略,其中激活CAR结合在疾病或病症中表达但也在正常细胞上表达的抗原,并且抑制性受体结合在正常细胞上表达但不在疾病或病症的细胞上表达的单独特异性抗原。

[0791] 在一些实施方案中,表达重组受体的细胞还包括抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013)),如识别除了与疾病或病症相关和/或对所述疾病或病症具特异性的抗原以外的抗原的CAR,由此通过靶向疾病的CAR递送的激活信号由于抑制性CAR与其配体的结合而有所减小或被抑制,例如以减小脱靶效应。

[0792] 在一些实施方案中,两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞,使得一种受体与其抗原的结合激活细胞或诱导应答,但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导了抑制或减弱所述应答的信号。例子是激活CAR与抑制性CAR (iCAR) 的组合。例如,可以使用这种策略,例如以减少在其中激活CAR结合在疾病或病症中表达但也在正常细胞上表达的抗原,并且抑制性受体结合在正常细胞上表达但不在疾病或病症的细胞上表达的单独抗原的情境下的脱靶效应的可能性。

[0793] 在一些方面,嵌合受体是或包括抑制性CAR (例如, iCAR), 并且包括减弱或抑制免疫应答 (例如细胞中ITAM和/或共同刺激促进的应答) 的细胞内组分。此类细胞内信号传导组分的示例是在免疫检查点分子 (包括PD-1、CTLA4、LAG3、BTLA、OX2R、TIM-3、TIGIT、LAIR-1、PGE2受体、EP2/4腺苷受体 (包括A2AR)) 上发现的那些组分。在一些方面,工程化细胞包括抑制性CAR,所述抑制性CAR包含这样的抑制性分子的信号传导结构域或源自这样的抑制性分子的信号传导结构域,使得其起到减弱细胞的应答 (例如,由激活和/或共刺激性CAR诱导) 的作用。

[0794] 在一些实施方案中,所述多靶向策略用于以下情况:其中与特定疾病或病症相关的抗原在未患病细胞上表达和/或在工程化细胞本身上表达,所述表达为瞬时表达 (例如,在与基因工程化相关的刺激后) 或永久表达。在此类情况下,通过需要连接两种分开且单独特异性的抗原受体,可以改善特异性、选择性和/或功效。

[0795] 在一些实施方案中,所述多种抗原 (例如,第一和第二抗原) 在所靶向的细胞、组织或者疾病或病症上 (如在癌细胞上) 表达。在一些方面,细胞、组织、疾病或病症是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,所述多种抗原中的一种或多种通常也在不需要用细胞疗法靶向的细胞 (如正常或未患病细胞或组织) 和/或工程化细胞本身上表达。在此类实施方案中,通过需要连接多种受体以实现细胞的反应,实现特异性和/或功效。

[0796] B. 用于基因工程化的核酸、载体和方法

[0797] 在一些实施方案中,将细胞 (例如T细胞) 基因工程化以表达重组受体。在一些实施方案中,通过引入编码重组受体的多核苷酸来进行工程化。还提供了编码重组受体的多核苷酸,以及含有此类核酸和/或多核苷酸的载体或构建体。

[0798] 在一些情况下,编码重组受体的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。在一些方面,信号序列可以编码源自天然多肽的信号肽。在其他方面,信号序列可以编码异源或非天然信号肽,例如SEQ ID NO:25所示并且由SEQ ID NO:24所示核苷酸序列编码的GMCSFR α 链的示例性信号肽。在一些情况下,编码重组受体 (例如,嵌合抗原受体 (CAR)) 的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。信号肽的非限制性示例性例子包括例如SEQ ID NO:25所示并且由SEQ ID NO:24所示核苷酸序列编码的GMCSFR α 链信号肽,或SEQ ID NO:26所示的CD8 α 信号肽。

[0799] 在一些实施方案中,编码重组受体的多核苷酸含有至少一个启动子,所述启动子可操作连接以控制重组受体的表达。在一些例子中,多核苷酸含有两个、三个或更多个启动子,所述启动子可操作地连接以控制重组受体的表达。

[0800] 在核酸分子编码两种或更多种不同多肽链 (例如重组受体和标记) 的某些情况下,每条多肽链可以由单独的核酸分子编码。例如,提供了两种单独的核酸,并且每一种可以单独转移到或引入细胞中以在细胞中表达。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸和编码

标记的核酸与相同的启动子可操作地连接,并且任选地通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(其任选地是T2A、P2A、E2A或F2A)的核酸分开。在一些实施方案中,编码标记的核酸和编码重组受体的核酸可操作地连接至两个不同的启动子。在一些实施方案中,编码标记的核酸和编码重组受体的核酸存在或插入于细胞基因组内的不同位置。在一些实施方案中,例如通过逆转录病毒转导、转染或转化将编码重组受体的多核苷酸引入含有培养细胞的组合物中。

[0801] 在一些实施方案中,例如在多核苷酸含有第一和第二核酸序列的那些实施方案中,编码每条不同多肽链的编码序列可以与启动子可操作地连接,所述启动子可以是相同的或不同的。在一些实施方案中,核酸分子可以含有驱动两条或更多条不同多肽链表达的启动子。在一些实施方案中,此类核酸分子可以是多顺反子的(双顺反子的或三顺反子的,参见例如,美国专利号6,060,273)。在一些实施方案中,可以将转录单位工程化为含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单元,其允许通过来自单一启动子的信息共表达基因产物(例如编码标记和编码重组受体)。可替代地,在一些情况下,单一启动子可引导RNA的表达,所述RNA在单一开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如编码标记和编码重组受体),所述基因通过编码自切割肽(例如,2A序列)的序列或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶(furin))彼此分开。因此,ORF编码单一多肽,其在翻译期间(在2A的情况下)或在翻译之后被加工成单一蛋白质。在一些情况下,肽(如T2A)可引起核糖体跳过2A元件C末端处肽键的合成(核糖体跳跃),导致2A序列末端与下游的下一个肽之间分开(参见,例如,de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) 和 de Felipe 等人 *Traffic* 5:616-626 (2004))。多种2A元件是已知的。可以用于本文公开的方法和系统中的2A序列的例子包括但不限于来自以下病毒的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:21)、马鼻A病毒(E2A,例如SEQ ID NO:20)、明脉扁刺蛾β四体病毒(T2A,例如SEQ ID NO:6或17)和猪捷申病毒-1(P2A,例如SEQ ID NO:18或19),如美国专利公开号20070116690中所述。

[0802] 本文所述的任何重组受体可以由呈任何组合或排列的含有编码重组受体的一种或多种核酸序列的多核苷酸编码。例如,一种、两种、三种或更多种多核苷酸可以编码一种、两种、三种或更多种不同的多肽,例如重组受体。在一些实施方案中,一种载体或构建体含有编码标记的核酸序列,并且单独的载体或构建体含有编码重组受体(例如CAR)的核酸序列。在一些实施方案中,编码标记的核酸和编码重组受体的核酸与两种不同的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸存在于编码标记的核酸的下游。

[0803] 在一些实施方案中,载体骨架含有编码一种或多种标记的核酸序列。在一些实施方案中,一种或多种标记是转导标记、替代标记和/或选择标记。

[0804] 在一些实施方案中,所述标记是转导标记或替代标记。可以将转导标记或替代标记用于检测已经引入多核苷酸(例如,编码重组受体的多核苷酸)的细胞。在一些实施方案中,转导标记可以指示或确认细胞的修饰。在一些实施方案中,替代标记是制备以在细胞表面上与重组受体(例如CAR)共表达的蛋白质。在特定实施方案中,这样的替代标记是已经被修饰以具有极少活性或无活性的表面蛋白。在某些实施方案中,替代标记由编码重组受体的同一多核苷酸编码。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸序列与编码标记的核酸序列可操作地连接,任选地通过内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(例如2A序列,例如T2A、P2A、E2A或F2A)的核酸隔开。在一些情况下,外在标记基因可

以结合工程化细胞以允许检测或选择细胞,并且在一些情况下还允许促进细胞自杀。

[0805] 示例性替代标记可以包括细胞表面多肽的截短形式,如是非功能性的并且不转导或不能转导信号或通常由细胞表面多肽的全长形式转导的信号、和/或不内化或不能内化的截短形式。示例性截短的细胞表面多肽包括生长因子或其他受体的截短形式,例如截短的人表皮生长因子受体2(tHER2)、截短的表皮生长因子受体(EGFRt,如SEQ ID NO:7或16所示的示例性EGFRt序列)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)或其修饰形式。EGFRt可以含有由抗体西妥昔单抗(**Erbitux®**)或其他治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,其可以用于鉴定或选择已经用EGFRt构建体和重组受体(例如嵌合抗原受体(CAR))工程化的细胞,和/或用于消除或分离表达受体的细胞。参见美国专利号8,802,374和Liu等人,Nature Biotech.2016年4月;34(4):430-434。在一些方面,标记(例如替代标记)包括全部或部分(例如,截短形式)的CD34、NGFR、CD19或截短的CD19(例如,截短的非人CD19)或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)。在一些实施方案中,编码标记的核酸与编码接头序列(如可切割接头序列,例如,T2A)的多核苷酸可操作地连接。例如,标记和任选地接头序列可以是如PCT公开号W0 2014031687所披露的任何一种。例如,标记可以是截短的EGFR(tEGFR),其任选地连接至接头序列,如T2A可切割接头序列。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:7或16所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7或16展现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0806] 在一些实施方案中,标记是或包含荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)(如超折叠GFP)、红色荧光蛋白(RFP)(如tdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRed或DsRed2)、青色荧光蛋白(CFP)、蓝绿色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)和黄色荧光蛋白(YFP)及其变体,包括荧光蛋白的物种变体、单体变体和密码子优化的和/或增强的变体。在一些实施方案中,标记是或包含酶(如萤光素酶)、来自大肠杆菌(*E.coli*)的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)。示例性发光报告基因包括萤光素酶(luc)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)或其变体。

[0807] 在一些实施方案中,标记是选择标记。在一些实施方案中,选择标记是或包含赋予对外源药剂或药物的抗性的多肽。在一些实施方案中,选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中,选择标记是向哺乳动物细胞赋予抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一些实施方案中,选择标记是或包含嘌呤霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、新霉素抗性基因、遗传霉素抗性基因或博来霉素抗性基因或其经修饰形式。

[0808] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒颗粒(例如像源自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移到细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Koste等人(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000)Exp He matol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29(11):550-557。

[0809] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如源自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞

病毒(MSCV)、或脾病灶形成病毒(SFFV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体源自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括源自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa等人(1991)Virology180:849-852;Burns等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109。

[0810] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等人(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;以及Cavalieri等人(2003)Blood.102(2):497-505中。

[0811] 在一些实施方案中,经由电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Chicaybam等人,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo等人(2000)Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,经由转座将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Manuri等人(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;以及Huang等人(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如在Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y.中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));以及磷酸锶DNA共沉淀(Brash等人,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0812] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是例如国际专利申请公开号WO 2014055668和美国专利号7,446,190中描述的那些。

[0813] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)可以在扩增期间或之后例如用T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)进行转染。例如,用于引入所需受体的基因的这种转染可以用任何合适的逆转录病毒载体来进行。然后可以使遗传修饰的细胞群摆脱初始刺激物(例如,抗CD3/抗CD28刺激物),随后用第二类型的刺激物例如通过从头引入的受体进行刺激。这第二种类型的刺激物可以包括呈肽/MHC分子形式的抗原刺激物、基因引入的受体的同源(交联)配体(例如,CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如,通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”Methods Mol Biol.2012;907:645-66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine第65卷:333-347(2014)。

[0814] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的载体。在一些此类情形中,可以在激活之前选择和/或转导细胞。因此,可以在培养细胞之前或之后将细胞工程化,并且在一些情况下在培养的至少一部分的同时或期间将细胞工程化。

[0815] 另外的核酸(例如,用于引入的基因)包括用于改善治疗功效的那些,如通过促进转移细胞的活力和/或功能;用于提供选择和/或评估细胞的遗传标记的基因,如以评估体

内存活或定位;改善安全性的基因,例如通过使细胞在体内对阴性选择易感,如Lupton S.D.等人,Mol. and Cell Biol.,11:6(1991)和Riddell等人,Human Gene Therapy 3:319-338(1992)所述;还参见Lupton等人的PCT/US91/08442和PCT/US94/05601的出版物,其描述了使用由将显性阳性选择性标记与阴性选择性标记融合而得到的双功能选择性融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0816] IV. 治疗方法

[0817] 在一些实施方案中,将通过本文提供的(例如章节I中所述的)方法生产的富集T细胞的输出组合物作为细胞疗法(例如过继细胞疗法)给予。工程化细胞可用于多种治疗、诊断和预防的适应症中。例如,工程化细胞或包含工程化细胞的组合物可用于治疗受试者的多种疾病和障碍。此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如,涉及将工程化细胞或含有工程化细胞的组合物给予至患有疾病、病症或障碍(如肿瘤或癌症)的受试者。在一些实施方案中,以实现疾病或障碍的治疗的有效量给予工程化细胞或包含工程化细胞的组合物。用途包括工程化细胞或组合物在此类方法和治疗中以及在制备药物以便进行此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,通过向患有或怀疑患有所述疾病或病症的受试者给予工程化细胞或包含工程化细胞的组合物来进行所述方法。在一些实施方案中,所述方法由此治疗所述受试者的所述疾病或病症或障碍。

[0818] 在特定实施方案中,将一种或多种细胞组合物(例如本文所述的输出细胞组合物)作为细胞疗法给予。在某些实施方案中,本文提供的方法从输入细胞产生富集T细胞的单一输出组合物,所述输入细胞从作为细胞疗法给予的单一生物样品中分离、选择和/或富集。在某些实施方案中,单一输出组合物是富集的CD4⁺和CD8⁺T细胞的组合物。用于过继细胞疗法的细胞的给予方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。例如,过继T细胞治疗方法描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85中。参见例如Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病、病症或障碍的病因相关和/或参与所述病因,例如引起、加重或以其他方式参与这种疾病、病症或障碍。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫性或炎性疾病、或例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。上文描述了示例性抗原,其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原。在特定实施方案中,嵌合抗原受体或转基因TCR特异性地结合至与所述疾病或病症相关的抗原。

[0819] 所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病、病症或障碍的病因相关和/或参与所述病因,例如引起、加重或以其他方式参与这种疾病、病症或障碍。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫性或炎性疾病、或例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。上文描述了示例性抗原,其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原。在特定实施方案中,嵌合抗原受体或转基因TCR特异性地结合至与所述疾病或病症相关的抗原。

[0820] 疾病、病症和障碍包括肿瘤,包括实体瘤、血液恶性肿瘤和黑色素瘤,并且包括局部和转移性肿瘤;感染性疾病,如病毒或其他病原体的感染,例如HIV、HCV、HBV、CMV、HPV和

寄生虫病;以及自身免疫性和炎性疾病。在一些实施方案中,疾病、障碍或病症是肿瘤、癌症、恶性肿瘤、肿瘤或其他增殖性疾病或障碍。此类疾病包括但不限于白血病、淋巴瘤,例如,急性髓样(或髓性)白血病(AML)、慢性髓样(或髓性)白血病(CML)、急性淋巴细胞(或成淋巴细胞)白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、滤泡性淋巴瘤、难治性滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,疾病或病症是选自以下的B细胞恶性肿瘤:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,疾病或病症是NHL,并且NHL选自侵袭性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL) NOS型(从头的和从惰性转化的)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和/或滤泡性淋巴瘤(FL),任选地,3B级滤泡性淋巴瘤(FL3B)。

[0821] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中,疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,如关节炎(例如,类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0822] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原或包括 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素($\alpha\text{v}\beta 6$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原_{1B}(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、表皮生长因子蛋白(EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体C型家族5D(GPRC5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白(TPBG,也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1,也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸

酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、Wilms肿瘤1 (WT-1)、病原体特异性或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0823] 在一些实施方案中,疾病或病症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是白血病或淋巴瘤。在一些方面,疾病或病症是急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞性白血病 (CLL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 或弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)。在一些情况下,疾病或病症是NHL (例如或包括作为侵袭性NHL的NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) NOS型 (从头的和从惰性转化的)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤 (PMBCL)、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤 (TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL) 和/或滤泡性淋巴瘤 (FL), 任选地3B级滤泡性淋巴瘤 (FL3B)。在一些方面,重组受体 (如CAR) 特异性地结合至与疾病或病症相关的或在与B细胞恶性肿瘤相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原,如许多已知B细胞标记中的任何一种。在一些实施方案中,受体靶向的抗原是CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30、或其组合。

[0824] 在一些实施方案中,疾病或病症是骨髓瘤,如多发性骨髓瘤。在一些方面,重组受体 (如CAR) 特异性地结合至与疾病或病症相关的或在与多发性骨髓瘤相关的病灶环境的细胞中表达的抗原。在一些实施方案中,受体靶向的抗原包括与多发性骨髓瘤相关的抗原。在一些方面,抗原 (例如第二或另外的抗原,如疾病特异性抗原和/或相关抗原,例如B细胞成熟抗原 (BCMA)、G蛋白偶联受体C型家族5D (GPC5D)、CD38 (环状ADP核糖水解酶)、CD138 (多配体聚糖-1、多配体聚糖、SYN-1)、CS-1 (CS1、CD2子集1、CR ACC、SLAMF7、CD319和19A24)、BAFF-R、TACI和/或FcRH5) 在多发性骨髓瘤上表达。其他示例性多发性骨髓瘤抗原包括CD56、TIM-3、CD33、CD123、CD44、CD20、CD40、CD74、CD200、EGFR、 β 2-微球蛋白、HM1.24、IGF-1R、IL-6R、TRAIL-R1和IIA型激活素受体 (ActRIIA)。参见Benso n和Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30 (16):2013-15; Tao和Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058; Chu等人, Leukemia (2013) 28 (4):917-27; Gar fall等人, Discov Med. (2014) 17 (91):37-46。在一些实施方案中,抗原包括存在于淋巴瘤、骨髓瘤、AIDS相关的淋巴瘤和/或移植后淋巴组织增生上的抗原,如CD38。针对此类抗原的抗体或抗原结合片段是已知的,并且包括例如在美国专利号8,153,765; 8,603,477、8,008,450; 美国公开号US20120189622或US20100260748; 和/或国际PCT公开号WO 2006099875、WO 2009080829或WO 2012092612或WO 2014210064中所述的那些。在一些实施方案中,在多特异性抗体、多特异性嵌合受体 (如多特异性CAR) 和/或多特异性细胞中包含此类抗体或其抗原结合片段 (例如IsCFv)。

[0825] 在一些实施方案中,所述疾病或障碍与G蛋白偶联受体C型家族5D (GPC5D) 的表达和/或B细胞成熟抗原 (BCMA) 的表达相关。

[0826] 在一些实施方案中,所述疾病或障碍是B细胞相关障碍。在所提供方法的一些任何所提供的实施方案中,与BCMA相关的疾病或障碍是自身免疫性疾病或障碍。在所提供方法的一些任何所提供的实施方案中,自身免疫性疾病或障碍是系统性红斑狼疮 (SLE)、狼疮性

肾炎、炎性肠病、类风湿性关节炎、ANCA相关性血管炎、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、自身免疫性血小板减少症、查加斯病、格雷夫斯病、韦格纳氏肉芽肿病、结节性多动脉炎、舍格伦综合征、寻常型天疱疮、硬皮病、多发性硬化症、牛皮癣、IgA肾病、IgM多发性神经病变、血管炎、糖尿病、雷诺综合征、抗磷脂综合征、古德帕斯丘病、川崎病、自身免疫性溶血性贫血、重症肌无力或进行性肾小球肾炎。

[0827] 在一些实施方案中,所述疾病或障碍是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是表达GPCR5D的癌症。在一些实施方案中,癌症是浆细胞恶性肿瘤,并且所述浆细胞恶性肿瘤是多发性骨髓瘤(MM)或浆细胞瘤。在一些实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,癌症是复发性/难治性多发性骨髓瘤。

[0828] 在一些实施方案中,抗原是或包括病原体特异性抗原或病原体表达的抗原。在一些实施方案中,抗原是病毒抗原(如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0829] 在一些实施方案中,所述细胞疗法(例如,过继T细胞疗法)是通过自体转移来进行,其中所述细胞是从要接受所述细胞疗法的受试者或者从衍生自这个受试者的样品分离和/或以其他方式制备。因此,在一些方面,所述细胞衍生自需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将所述细胞给予同一受试者。

[0830] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如过继T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受细胞疗法的受试者以外的受试者(例如第一受试者)分离和/或以其他方式制备细胞。在此类实施方案中,然后将所述细胞给予相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,第二受试者与第一受试者表达相同的HLA类别或超型。

[0831] 可以将所述细胞通过任何合适的方式给予,例如通过推注输注,通过注射(例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、结膜下(subconjunctival)注射、结膜下(subconjunctival)注射、眼球筋膜囊下(sub-Tenon)注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜(posterior juxtасcleral)递送。在一些实施方案中,将它们通过肠胃外、肺内和鼻内给予以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内给予。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给予。在一些实施方案中,通过细胞的单次推注给予来给予给定剂量。在一些实施方案中,例如在不超过3天的时间段内通过所述细胞的多次推注给予或通过所述细胞的连续输注给予来给予给定剂量。在一些实施方案中,所述细胞剂量或任何其他疗法(例如,淋巴细胞清除疗法、干预疗法和/或组合疗法)的给予是通过门诊递送进行的。

[0832] 为了预防或治疗疾病,适当的剂量可取决于待治疗的疾病类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、是针对预防目的还是治疗目的给予细胞、先前的治疗、受试者的临床病史和对细胞的应答以及主治医师的决断。在一些实施方案中,将组合物和细胞以合适的方式一次或经一系列治疗给予受试者。

[0833] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分给予,如与另一种治疗性干预如抗体或工程化细胞或受体或其他药剂(如细胞毒性剂或治疗剂)同时给予或以任何顺序依次给予。在一些实施方案中将所述细胞与一种或多种另外的治疗剂或结合另一种治疗性

干预同时或以任何顺序依序共给予。在一些情况下,将所述细胞与另一种疗法共给予,其时间足够接近,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的作用,或反之亦然。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之前给予所述细胞。在一些实施方案中,将细胞在所述一种或多种另外的治疗剂之后给予。在一些实施方案中,一种或多种另外的药剂包括细胞因子(如IL-2)以例如增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括给予化学治疗剂。

[0834] 在一些实施方案中,所述方法包括在所述给予之前给予化学治疗剂(例如,调理性化学治疗剂)例如以减小肿瘤负荷。

[0835] 用免疫清除(例如,淋巴细胞清除)疗法预调理受试者在一些方面可以改进过继细胞疗法(ACT)的效果。

[0836] 因此,在一些实施方案中,所述方法包括在开始细胞疗法之前将预调理剂给予受试者,所述预调理剂如淋巴细胞清除剂或化学治疗剂,如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合。例如,可以在开始细胞疗法之前至少2天(如之前至少3、4、5、6或7天),向受试者给予预调理剂。在一些实施方案中,在开始细胞疗法之前不超过7天(如之前不超过6、5、4、3或2天),向受试者给予预调理剂。

[0837] 在一些实施方案中,用环磷酰胺以在或在约20mg/kg与100mg/kg之间,如在或在约40mg/kg与80mg/kg之间的剂量对受试者进行预调理。在一些方面,用或用约60mg/kg的环磷酰胺对受试者进行预调理。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单剂量给予或者可以按多个剂量给予,如每天给药、每隔一天给药或每三天给药。在一些实施方案中,每天一次给予环磷酰胺,持续一天或两天。在一些实施方案中,在淋巴细胞清除剂包含环磷酰胺的情况下,以在或在约100mg/m²与500mg/m²之间,如在或在约200mg/m²与400mg/m²之间或250mg/m²与350mg/m²之间(包含端值)的剂量向受试者给予环磷酰胺。在一些情形中,向受试者给予约300mg/m²的环磷酰胺。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单剂量给予或者可以按多个剂量给予,如每天给药、每隔一天给药或每三天给药。在一些实施方案中,每天给予环磷酰胺,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始细胞疗法之前,每天向受试者给予约300mg/m²的环磷酰胺,持续3天。

[0838] 在一些实施方案中,在淋巴细胞清除剂包含氟达拉滨的情况下,以在或在约1mg/m²与100mg/m²之间,如在或在约10mg/m²与75mg/m²之间、15mg/m²与50mg/m²之间、20mg/m²与40mg/m²之间或24mg/m²与35mg/m²之间(包含端值)的剂量向受试者给予氟达拉滨。在一些情形中,向受试者给予约30mg/m²的氟达拉滨。在一些实施方案中,可以将氟达拉滨按单剂量给予或者可以按多个剂量给予,如每天给药、每隔一天给药或每三天给药。在一些实施方案中,每天给予氟达拉滨,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始细胞疗法之前,每天向受试者给予约30mg/m²的氟达拉滨,持续3天。

[0839] 在一些实施方案中,淋巴细胞清除剂包含药剂的组合,如环磷酰胺和氟达拉滨的组合。因此,药剂的组合可以包括任何剂量或给予时间表(如上述那些剂量或给予时间表)下的环磷酰胺以及任何剂量或给予时间表(如上述那些剂量或给予时间表)下的氟达拉滨。例如,在一些方面,在第一剂量或后续剂量之前,向受试者给予60mg/kg(约2g/m²)的环磷酰胺和3至5个剂量的25mg/m²氟达拉滨。

[0840] 在给予细胞后,工程化细胞群的生物学活性在一些实施方案中是例如通过许多已知方法中的任一种来测量。要评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原

的特异性结合,其是在体内例如通过成像评估,或离体例如通过ELISA或流式细胞术评估。在某些实施方案中,工程化细胞破坏靶细胞的能力可以使用任何合适的已知方法来测量,所述方法例如描述于例如以下文献中的细胞毒性测定:Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方案中,所述细胞的生物活性是通过测定一种或多种细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量。在一些方面,所述生物活性是通过评估临床结果(如肿瘤负荷或负担的减小)来测量。

[0841] 在某些实施方案中,将所述工程化细胞以许多方式进一步修饰,使得增加其治疗或预防功效。例如,可以将所述群体表达的工程化CAR或TCR直接或通过接头间接缀合至靶向部分。将化合物(例如,CAR或TCR)与靶向部分缀合的实践是已知的。参见例如,Wadwa等人,J.Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0842] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分给予,如与另一种治疗性干预如抗体或工程化细胞或受体或其他药剂(如细胞毒性剂或治疗剂)同时给予或以任何顺序依次给予。在一些实施方案中将所述细胞与一种或多种另外的治疗剂或结合另一种治疗性干预同时或以任何顺序依序共给予。在一些情况下,将所述细胞与另一种疗法共给予,其时间足够接近,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的作用,或反之亦然。在一些实施方案中,在所述一种或多种另外的治疗剂之前给予所述细胞。在一些实施方案中,将细胞在所述一种或多种另外的治疗剂之后给予。在一些实施方案中,所述一种或多种另外的药剂包括细胞因子(如IL-2)例如以增强持久性。

[0843] A. 给药

[0844] 在一些实施方案中,按照所提供的方法和/或按照所提供的制品或组合物,向受试者给予一定剂量的细胞,例如本文(如在章节I-G中)所述的输出细胞。在一些实施方案中,根据所述受试者的特定疾病或病症确定剂量的大小或时间安排。在一些情况下,可以根据所提供的描述凭经验确定用于特定疾病的剂量的大小或时间安排。

[0845] 在一些实施方案中,细胞剂量包含在 2×10^5 或约 2×10^5 个细胞/kg和 2×10^6 或约 2×10^6 个细胞/kg之间,如在 4×10^5 或约 4×10^5 个细胞/kg和 1×10^6 或约 1×10^6 个细胞/kg之间或在 6×10^5 或约 6×10^5 个细胞/kg和 8×10^5 或约 8×10^5 个细胞/kg之间。在一些实施方案中,细胞的所述剂量包含不超过 2×10^5 个细胞(例如,抗原表达细胞,如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如不超过或不超过约 3×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 4×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 5×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 6×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 7×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 8×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 9×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 1×10^6 个细胞/kg、或不超过约或不超过约 2×10^6 个细胞/kg。在一些实施方案中,细胞的所述剂量包含至少或至少约或为或为约 2×10^5 个细胞(例如,抗原表达细胞,如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如至少或至少约或为或为约 3×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 4×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 5×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 6×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 7×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 8×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 9×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或为约 1×10^6 个细胞/kg、或至少或至少约或为或为约 2×10^6 个细胞/kg。

[0846] 在某些实施方案中,将细胞、或细胞亚型的单独群体按以下给予至受试者:在为或约10万至为或约1000亿个细胞的范围和/或每公斤受试者体重所述细胞量,如例如为或约10万至为或约500亿个细胞(例如,为或约500万个细胞、为或约2500万个细胞、为或约5亿个细胞、为或约10亿个细胞、为或约50亿个细胞、为或约200亿个细胞、为或约300亿个细胞、为或约400亿个细胞或由任两个前述值限定的范围)、为或约100万至为或约500亿个细胞(例如,为或约500万个细胞、为或约2500万个细胞、为或约5亿个细胞、为或约10亿个细胞、为或约50亿个细胞、为或约200亿个细胞、为或约300亿个细胞、为或约400亿个细胞或由任两个前述值限定的范围),如为或约1000万至为或约1000亿个细胞(例如,为或约2000万个细胞、为或约3000万个细胞、为或约4000万个细胞、为或约6000万个细胞、为或约7000万个细胞、为或约8000万个细胞、为或约9000万个细胞、为或约100亿个细胞、为或约250亿个细胞、为或约500亿个细胞、为或约750亿个细胞、为或约900亿个细胞或由任两个前述值限定的范围),并且在一些情况下,为或约1亿个细胞至为或约500亿个细胞(例如,为或约1.2亿个细胞、为或约2.5亿个细胞、为或约3.5亿个细胞、为或约6.5亿个细胞、为或约8亿个细胞、为或约9亿个细胞、为或约30亿个细胞、为或约300亿个细胞、为或约450亿个细胞)或在这些范围和/或每公斤受试者体重的这些范围之间的任何值。剂量可以根据疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。在一些实施方案中,细胞的所述剂量是细胞的平坦剂量或细胞的固定剂量,使得细胞的所述剂量与受试者的体表面积或体重无关或不基于受试者的体表面积或体重。

[0847] 例如,在一些实施方案中,在受试者是人的情况下,剂量包括少于约 5×10^8 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,在为或约 1×10^6 至为或约 5×10^8 个此类细胞的范围内,如为或约 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 或 5×10^8 个总此类细胞、或任两个前述值之间的范围。例如,在一些实施方案中,在受试者是人的情况下,剂量包括多于为或约 1×10^6 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)且少于为或约 2×10^9 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如,在为或约 2.5×10^7 至为或约 1.2×10^9 个此类细胞的范围内,如为或约 2.5×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 、 8×10^8 、或 1.2×10^9 个总此类细胞、或任两个前述值之间的范围。

[0848] 在一些实施方案中,基因工程化细胞的剂量包含从为或约 1×10^5 至为或约 5×10^8 个总CAR表达(CAR表达)T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 1×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 1×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 5×10^6 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 2.5×10^6 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^5 至为或约 1×10^6 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 1×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 1×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 5×10^6 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^6 至为或约 2.5×10^6 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细

胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 1×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 1×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^6 至为或约 5×10^6 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^6 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^6 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^6 至为或约 1×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^6 至为或约 5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^6 至为或约 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^6 至为或约 1×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^7 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^7 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^7 至为或约 5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^7 至为或约 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^7 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^7 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^7 至为或约 1×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 2.5×10^7 至为或约 5×10^7 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^7 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^7 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 5×10^7 至为或约 1×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^8 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞、从为或约 1×10^8 至为或约 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、或从为或约 2.5×10^8 至为或约 5×10^8 个总CAR表达T细胞。在一些实施方案中,基因工程化细胞的剂量包含从或从约 2.5×10^7 至为或约 1.5×10^8 个总CAR表达T细胞,如从或从约 5×10^7 至或至约 1×10^8 个总CAR表达T细胞。

[0849] 在一些实施方案中,基因工程化细胞的剂量包含至少或至少约 1×10^5 个CAR表达细胞、至少或至少约 2.5×10^5 个CAR表达细胞、至少或至少约 5×10^5 个CAR表达细胞、至少或至少约 1×10^6 个CAR表达细胞、至少或至少约 2.5×10^6 个CAR表达细胞、至少或至少约 5×10^6 个CAR表达细胞、至少或至少约 1×10^7 个CAR表达细胞、至少或至少约 2.5×10^7 个CAR表达细胞、至少或至少约 5×10^7 个CAR表达细胞、至少或至少约 1×10^8 个CAR表达细胞、至少或至少约 1.5×10^8 个CAR表达细胞、至少约 5×10^6 个CAR表达细胞、至少或至少约 1×10^7 个CAR表达细胞、至少或至少约 2.5×10^7 个CAR表达细胞、至少或至少约 5×10^7 个CAR表达细胞、至少或至少约 1×10^8 个CAR表达细胞、至少或为或约 2.5×10^8 个CAR表达细胞、或至少或至少约 5×10^8 个CAR表达细胞。

[0850] 在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量,所述剂量包含如下数量的细胞:从或从约 1×10^5 至或至约 5×10^8 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),从或从约 5×10^5 至或至约 1×10^7 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC)或者从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^7 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量的细胞,所述剂量包含如下细胞数量:至少或至少约 1×10^5 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单核细胞(PBMC),如至少或至少 1×10^6 、至少或至少约 1×10^7 、至少或至少约 1×10^8 个此类细胞。在一些实施方案中,所述数量是关于CD3表达细胞或CD8表达细胞的总数,在一些情况下也是关于重组受体表达(例如CAR表达)细胞的总数。在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量,所述剂量包含如下数量的细胞:从或从约 1×10^5 至或至约 5×10^8 个表达CD3或表达CD8的总T细胞或表达CD3或表达CD8的重组受体表达细胞、从或从约 5×10^5 至或至约 1×10^7 个表达CD3或表达CD8的总T细胞或表达CD3或表达CD8的重组受体表达细

胞、或从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^7 个表达CD3或表达CD8的总T细胞或表达CD3或表达CD8的重组受体表达细胞,每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞疗法包括给予一定剂量,所述剂量包含如下数量的细胞:从或从约 1×10^5 至或至约 5×10^8 个总CD3表达/CAR表达或CD8表达/CAR表达细胞、从或从约 5×10^5 至或至约 1×10^7 个总CD3表达/CAR表达或CD8表达/CAR表达细胞、或从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^7 个总CD3表达/CAR表达或CD8表达/CAR表达细胞,每个都包含端值。

[0851] 在一些实施方案中,所述剂量的T细胞包括CD4表达T细胞、CD8表达T细胞或CD4表达和CD8表达T细胞。

[0852] 在一些实施方案中,例如,在受试者是人的情况下,所述剂量的CD8表达T细胞(包括在剂量中包括CD4表达和CD8表达T细胞)包括在为或约 1×10^6 与为或约 5×10^8 个之间的表达CD8的总重组受体(例如CAR)表达细胞,例如在从为或约 5×10^6 至为或约 1×10^8 个此类细胞的范围内,如 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 或 5×10^8 个总此类细胞,或任两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,给予患者多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。在一些实施方案中,细胞的剂量包括给予从或从约 1×10^7 至或至约 0.75×10^8 个表达CD8的总重组受体表达T细胞、从或从约 1×10^7 至或至约 5×10^7 个表达CD8的总重组受体表达T细胞、从或从约 1×10^7 至或至约 0.25×10^8 个表达CD8的总重组受体表达T细胞,每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞的剂量包括给予为或约 1×10^7 、 2.5×10^7 、 5×10^7 、 7.5×10^7 、 1×10^8 、 1.5×10^8 、 2.5×10^8 或 5×10^8 个表达CD8的总重组受体表达T细胞。

[0853] 在一些实施方案中,细胞(例如,重组受体表达T细胞)的剂量作为单剂量给予受试者,或者在两周、一个月、三个月、六个月、1年或更长的时间段内仅给予一次。

[0854] 在过继细胞疗法的情况下,给予给定“剂量”涵盖给予作为单一组合物和/或单次不间断给予(例如,作为单次注射或连续输注)的给定量或数量的细胞,并且还涵盖在指定时间段中(如在不超过约3天中)给予在多种单独组合物或输注中提供的作为分割剂量或作为多种组合物的给定量或数量的细胞。因此,在一些情况下,所述剂量是在单一时间点给予或起始的指定数量的细胞的单次或连续给予。然而,在一些情况下,所述剂量是在不超过三天的时间段中以多次注射或输注(如每天一次,持续三天或两天)来给予,或者是在一天的时间段中通过多次输注来给予。

[0855] 因此,在一些方面,将所述剂量的细胞以单一药物组合物给予。在一些实施方案中,将所述细胞剂量以共同含有所述剂量的细胞的多种组合物给予。

[0856] 在一些实施方案中,术语“分割剂量”是指被分割使得在多于一天中给予的剂量。这种类型的给药涵盖在本方法中并且被认为是单一剂量。

[0857] 因此,可以将细胞的剂量作为分割剂量(例如随时间给予的分割剂量)给予。例如,在一些实施方案中,可以将所述剂量在2天内或在3天内给予所述受试者。用于分割给药的示例性方法包括在第一天给予25%的剂量并在第二天给予剩余的75%的剂量。在其他实施方案中,可以在第一天给予33%的剂量,并且在第二天给予剩余的67%。在一些方面,在第一天给予10%的剂量,在第二天给予30%的剂量,并且在第三天给予60%的剂量。在一些实施方案中,所述分割剂量的分布不超过3天。

[0858] 在一些实施方案中,可以将所述剂量的细胞通过给予多种组合物或溶液(如第一

和/或第二,任选地更多)来给予,每种组合物或溶液含有所述剂量的一些细胞。在一些方面,任选地在某一时间段内,分开地或独立地给予各自含有不同细胞群和/或细胞亚型的所述多种组合物。例如,细胞群或细胞亚型可以分别包括CD8⁺和CD4⁺T细胞,和/或分别包括富集CD8⁺和CD4⁺的群体,例如CD4⁺和/或CD8⁺T细胞,其各自单独地包括基因工程化以表达重组受体的细胞。在一些实施方案中,所述剂量的给予包括给予第一组合物,其包含一定剂量的CD8⁺T细胞或一定剂量的CD4⁺T细胞;以及给予第二组合物,其包含另一剂量的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。

[0859] 在一些实施方案中,组合物或剂量的给予(例如,所述多种细胞组合物的给予)涉及分开给予细胞组合物。在一些方面,分开给予同时或按任何顺序依次进行。在一些实施方案中,所述剂量包含第一组合物和第二组合物,并且第一组合物和第二组合物的给予相隔0至12小时、相隔0至6小时或相隔0至2小时。在一些实施方案中,第一组合物的给予的开始和第二组合物的给予的开始相隔不超过2小时、不超过1小时或不超过30分钟,相隔不超过15分钟、不超过10分钟或不超过5分钟进行。在一些实施方案中,第一组合物的给予的开始和/或完成和第二组合物的给予的完成和/或开始相隔不超过2小时、不超过1小时或不超过30分钟,相隔不超过15分钟、不超过10分钟或不超过5分钟进行。

[0860] 在一些组合物中,第一组合物(例如,所述剂量的第一组合物)包含CD4⁺T细胞。在一些组合物中,第一组合物(例如所述剂量的第一组合物)包含CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,第一组合物是在第二组合物之前给予的。

[0861] 在一些实施方案中,细胞的剂量或组合物包括限定的或目标比率的表达重组受体的CD4⁺细胞与表达重组受体的CD8⁺细胞和/或CD4⁺细胞与CD8⁺细胞,所述比率任选地为大约1:1,或者在大约1:3与大约3:1之间,如大约1:1。在一些方面,具有不同细胞群的目标或所需比率(如CD4⁺:CD8⁺比率或CAR+CD4⁺:CAR+CD8⁺比率,例如,1:1)的组合物或剂量的给予涉及给予含有所述群体中的一种的细胞组合物,然后给予包含所述群体中的另一种的单独细胞组合物,其中所述给予是以或大致以所述目标或所需比率来进行。在一些方面,以限定比率给予细胞的剂量或组合物导致T细胞疗法的扩增、持久性和/或抗肿瘤活性得到改善。

[0862] 在一些实施方案中,受试者接受细胞的多个剂量,例如两个或更多个剂量或多个连续剂量。在一些实施方案中,将两个剂量给予受试者。在一些实施方案中,受试者接受连续剂量,例如,第二剂量是在第一剂量后大约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天给予的。在一些实施方案中,在第一剂量后给予多个连续剂量,使得在给予连续剂量后给予另外一个或多个剂量。在一些方面,以另外的剂量给予受试者的细胞数量与第一剂量和/或连续剂量相同或相似。在一些实施方案中,所述另外一个或多个剂量大于先前剂量。

[0863] 在一些方面,第一和/或连续剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如受试者对先前治疗(例如化学疗法)的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、大小或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果(例如,CRS、巨噬细胞活化综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所给予的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0864] 在一些方面,第一剂量的给予与连续剂量的给予之间的时间为约9至约35天、约14至约28天或15至27天。在一些实施方案中,给予连续剂量是在给予第一剂量后大于约14天

且小于约28天的时间点。在一些方面,第一剂量与连续剂量之间的时间为约21天。在一些实施方案中,在给予连续剂量后给予另外一个或多个剂量(例如连续剂量)。在一些方面,在给予先前剂量后至少约14天且小于约28天给予所述另外一个或多个连续剂量。在一些实施方案中,在先前剂量后小于约14天(例如,在先前剂量后4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天)给予另外的剂量。在一些实施方案中,在先前剂量后小于约14天不给予剂量,和/或在先前剂量后超过约28天不给予剂量。

[0865] 在一些实施方案中,细胞(例如,重组受体表达细胞)的剂量包含两个剂量(例如,双剂量),包含T细胞的第一剂量和T细胞的连续剂量,其中第一剂量和第二剂量中的一个或两个包含给予T细胞的分割剂量。

[0866] 在一些实施方案中,所述细胞剂量通常足够大以有效减轻疾病负荷。

[0867] 在一些实施方案中,将所述细胞以所需剂量给予,所述所需剂量在一些方面包括所需剂量或数量的细胞或一种或多种细胞类型和/或所需比率的细胞类型。因此,在一些实施方案中,所述细胞剂量基于细胞总数(或每kg体重的细胞数量)和所需的单独群体或亚型的比率,如CD4⁺与CD8⁺的比率。在一些实施方案中,所述细胞剂量基于所需的单独群体中的细胞或单独细胞类型的总数(或每kg体重的细胞数量)。在一些实施方案中,所述剂量基于此类特征的组合,此类特征是例如所需的总细胞数量、所需比率和所需的单独群体中的细胞总数。

[0868] 在一些实施方案中,以所需剂量的总细胞(如所需剂量的T细胞)的耐受差异或在所述耐受差异之内给予细胞的群体或亚型(如CD8⁺和CD4⁺T细胞)。在一些方面,所需剂量是所需细胞数量或被给予所述细胞的受试者的每单位体重的所需细胞数量,例如细胞/kg。在一些方面,所需剂量等于或高于最小细胞数量或每单位体重的最小细胞数量。在一些方面,在以所需剂量给予的总细胞中,单独群体或亚型以等于或接近所需输出比率(如CD4⁺与CD8⁺的比率)存在,例如在这种比率的一定耐受差异或误差内。

[0869] 在一些实施方案中,将所述细胞以所需剂量的一种或多种单独细胞群或亚型(如所需剂量的CD4⁺细胞和/或所需剂量的CD8⁺细胞)的耐受差异或在所述耐受差异之内给予。在一些方面,所需剂量是所需的亚型或群体的细胞数量或所需的被给予所述细胞的受试者的每单位体重的此类细胞数量,例如细胞/kg。在一些方面,所述所需剂量等于或高于群体或亚型的最小细胞数量或每单位体重的所述群体或亚型的最小细胞数量。

[0870] 因此,在一些实施方案中,所述剂量基于所需的总细胞的固定剂量和所需比率,和/或基于所需的一种或多种单独亚型或亚群(例如每一种)的固定剂量。因此,在一些实施方案中,所述剂量基于所需的T细胞的固定或最小剂量和所需的CD4⁺与CD8⁺细胞的比率,和/或基于所需的CD4⁺和/或CD8⁺细胞的固定或最小剂量。

[0871] 在一些实施方案中,将所述细胞以所需输出比率的多种细胞群或亚型(如CD4⁺和CD8⁺细胞或亚型)的耐受范围或在所述耐受范围内给予。在一些方面,所需比率可以是特定比率或者可以是一系列比率。例如,在一些实施方案中,所需比率(例如,CD4⁺与CD8⁺细胞的比率)在为或约1:5与为或约5:1之间(或大于约1:5且小于约5:1),或在为或约1:3与为或约3:1之间(或大于约1:3且小于约3:1),如在为或约2:1与为或约1:5之间(或大于约1:5且小于约2:1),如为或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、

1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5。在一些方面,所述耐受差异在所需比率的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%(包括这些范围之间的任何值)内。

[0872] 在特定实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指重组受体(例如CAR)表达细胞的数量。在其他实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指给予的所有细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0873] 在一些方面,所述剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如受试者对先前治疗(例如化学疗法)的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果(例如,CRS、巨噬细胞活化综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所给予的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0874] 在一些实施方案中,所述方法还包括给予一个或多个另外的剂量的表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞和/或淋巴细胞清除疗法,和/或重复所述方法的一个或多个步骤。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的剂量与初始剂量相同。在一些实施方案中,所述一个或多个另外的剂量不同于初始剂量,例如更高,如比初始剂量高2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍或更多倍;或者更低,如比初始剂量低2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍或更多倍。在一些实施方案中,基于以下确定一个或多个另外的剂量的给予:受试者对初试治疗或任何先前治疗的反应、受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、尺寸或程度)、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果(例如,CRS、巨噬细胞活化综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所给予的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0875] B.反应、功效和存活

[0876] 在一些实施方案中,将通过本文提供的方法(例如,如在章节I中所述)生产的细胞(例如输出细胞)给予至受试者,并且监测受试者的反应、存活、和/或毒性的体征或症状。

[0877] 在一些实施方案中,至少35%、至少40%或至少50%的用细胞组合物(例如含有CAR+CD4⁺和CD8⁺T细胞的治疗性细胞组合物)治疗的受试者产生缓解(CR);和/或至少50%、至少60%或至少70%的根据所述方法治疗的受试者实现客观缓解率(ORR)。在一些实施方案中,至少或至少约50%的受试者、至少或至少约60%的受试者、至少或至少约70%的受试者、至少或至少约80%的受试者或至少或至少约90%的根据所述方法治疗的受试者实现CR和/或实现客观反应(OR)。在一些实施方案中,有效治疗的所评估标准包括总体反应率(ORR)、完全反应(CR)、反应持续时间(DOR)、无进展存活期(PFS)和/或总存活期(OS)。

[0878] 在一些实施方案中,至少40%或至少50%的根据本文提供的方法治疗的受试者实现完全缓解(CR),展现大于或大于约3个月、6个月或12个月的无进展存活期(PFS)和/或总存活期(OS);平均而言,根据所述方法治疗的受试者展现大于或大于约6个月、12个月或18个月的中值PFS或OS;和/或所述受试者在治疗后展现至少或至少约6、12、18个月或更久的PFS或OS。

[0879] 在一些方面中,无进展存活期(PFS)被描述为治疗疾病(如癌症)期间和之后,受试者带病生存但所述疾病不恶化的时间长度。在一些方面,客观应答(OR)被描述为可测量的反应。在一些方面,客观反应率(ORR)被描述为实现CR或PR的患者的比例。在一些方面,总存活期(OS)被描述为从诊断日期或疾病(如癌症)治疗开始日期起,被诊断患有所述疾病的受

试者仍然存活的时间长度。在一些方面,无事件存活期(EFS)被描述为在癌症治疗结束后,受试者保持没有所述治疗意图预防或延迟的某些并发症或事件的时间长度。这些事件可以包括癌症的复发或某些症状的发作,如已经扩散到骨骼的癌症引起的骨痛,或死亡。

[0880] 在一些实施方案中,反应持续时间(DOR)的量度包括从记录到肿瘤反应至疾病进展的时间。在一些实施方案中,用于评估反应的参数可以包括持久反应,例如,在开始治疗的一段时间之后持续存在的反应。在一些实施方案中,持久反应是由在开始治疗后约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月的反应率来指示。在一些实施方案中,所述反应可持续超过3个月或超过6个月。

[0881] 在一些实施方案中,与使用替代性过程产生的细胞的可比方法所观察到的降低相比,给予通过本文提供的方法生产的细胞的剂量或组合物将疾病或病症的负荷(例如,肿瘤细胞的数量、肿瘤的大小、患者存活或无事件存活的持续时间)降低的程度更大和/或持续的时间段更长。在一些实施方案中,检测、评估或测量受试者中疾病或病症的负荷。在一些方面,可以通过检测受试者中或受试者的器官、组织或体液(如血液或血清)中的疾病细胞或疾病相关细胞(例如肿瘤细胞)的总数来检测疾病负荷。在一些方面,评估受试者的存活、在某一时间段内的存活、存活程度、无事件或无症状存活的存在或持续时间或无复发存活。在一些实施方案中,评估疾病或病症的任何症状。在一些实施方案中,指定疾病或病症负荷的量度。

[0882] 在一些实施方案中,与通过替代方法产生的细胞相比,通过给予从所提供的方法(例如在章节I中所述的方法)生产的细胞改善了受试者的无事件存活率或总存活率。例如,在一些实施方案中,在剂量后6个月通过所述方法治疗的受试者的无事件存活率或概率为大于或大于约40%、大于或大于约50%、大于或大于约60%、大于或大于约70%、大于或大于约80%、大于或大于约90%、或大于或大于约95%。在一些方面,总存活率为大于或大于约40%、大于或大于约50%、大于或大于约60%、大于或大于约70%、大于或大于约80%、大于或大于约90%、或大于或大于约95%。在一些实施方案中,用通过所提供的方法生产的细胞治疗的受试者展现至少6个月或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年的无事件存活期、无复发存活期或存活期。在一些实施方案中,至进展的时间得到改善,如至进展的时间大于或为或约6个月,或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。

[0883] 在一些实施方案中,与其他方法(例如,其中受试者接受含有通过替代方法生产的细胞的细胞疗法的方法)相比,在通过所述方法治疗后,复发的概率降低了。例如,在一些实施方案中,在第一剂量后6个月复发的概率为小于或小于约80%、小于或小于约70%、小于或小于约60%、小于或小于约50%、小于或小于约40%、小于或小于约30%、小于或小于约20%、或小于或小于约10%。

[0884] C. 毒性

[0885] 在某些实施方案中,将通过本文提供的方法(例如,如在章节I中所述)生产的细胞(例如输出细胞)给予至受试者,并且监测受试者的毒性的体征或症状。

[0886] 在某些实施方案中,例如,与给予替代性细胞疗法(如通过替代性过程生产的CAR+T细胞组合物相比,细胞(例如通过所提供方法生产的输出细胞)的剂量或组合物导致较低比率和/或较低程度的毒性、毒性结果或症状、促进毒性的概况、因子或特性,如与细胞因子释放综合征(CRS)或神经毒性相关或指示细胞因子释放综合征(CRS)或神经毒性的症状或

结果。

[0887] 在一些实施方案中,例如与某些其他细胞疗法和/或通过替代方法生产的细胞相比,给予通过所提供的方法生产的细胞不导致高比率或可能性的毒性或毒性结果,或者降低毒性或毒性结果(如神经毒性(NT)、细胞因子释放综合征(CRS))的比率或可能性。在一些实施方案中,给予通过所提供的方法生产的细胞(例如输出细胞)导致以下事件或不增加以下事件的风险:严重NT(sNT)、严重CRS(sCRS)、巨噬细胞活化综合征、肿瘤溶解综合征、至少或至少约38摄氏度发热三天或更多天、以及至少或至少约20mg/dL的CRP血浆水平。在一些实施方案中,大于或大于约30%、35%、40%、50%、55%、60%或更多的根据所提供方法治疗的受试者不展现任何等级的CRS或任何等级的神经毒性。在一些实施方案中,不超过50%的所治疗受试者(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多的所治疗受试者)展现高于2级的细胞因子释放综合征(CRS)和/或高于2级的神经毒性。在一些实施方案中,至少50%的根据所述方法治疗的受试者(例如,至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多的所治疗受试者)不展现严重毒性结果(例如,严重CRS或严重神经毒性),如不展现3级或更高级的神经毒性和/或不展现严重CRS,或者在治疗后某一时间段内(如在给予所述细胞的一周、两周或一个月内)不如此展现。在一些实施方案中,被评估以确定某些毒性的参数包括不良事件(AE)、剂量限制性毒性(DLT)、CRS和NT。

[0888] 给予过继T细胞疗法如用表达嵌合抗原受体的T细胞进行的治疗可以诱导毒性作用或结果,如细胞因子释放综合征和神经毒性。在一些例子中,这种效果或结果与高水平的循环细胞因子并行,高水平的循环细胞因子可能是观察到的毒性的基础。

[0889] 在一些方面,毒性结果是细胞因子释放综合征(CRS)或严重CRS(sCRS),或与细胞因子释放综合征(CRS)或严重CRS(sCRS)相关,或指示细胞因子释放综合征(CRS)或严重CRS(sCRS)。在一些情况下,在过继T细胞疗法和向受试者给予其他生物制品后可发生CRS,例如sCRS。参见Davila等人,Sci Transl Med 6,224ra25(2014);Brentjens等人,Sci.Transl.Med.5,177ra38(2013);Grupp等人,N.Engl.J.Med.368,1509-1518(2013);和Kochenderfer等人,Blood 119,2709-2720(2012);Xu等人,Cancer Letters343(2014)172-78。

[0890] 通常,CRS由增大的例如通过T细胞、B细胞、NK细胞、单核细胞和/或巨噬细胞介导的全身免疫应答引起。此类细胞可以释放大量炎症介质,如细胞因子和趋化因子。细胞因子可以触发急性炎性应答和/或诱导内皮器官损伤,从而可能导致微血管渗漏、心力衰竭或死亡。严重的危及生命的CRS可能导致肺浸润和肺损伤、肾衰竭或弥散性血管内凝血。其他严重的危及生命的毒性可以包括心脏毒性、呼吸窘迫、神经毒性和/或肝衰竭。

[0891] 可以使用抗炎疗法(如抗IL-6疗法,例如,抗IL-6抗体,例如,托珠单抗)或抗生素或如所述的其他药剂治疗CRS。CRS的结果、体征和症状是已知的,并且包括本文所述的那些。在一些实施方案中,在特定剂量方案或给予实现或不实现给定的CRS相关结果、体征或症状的情况下,可以规定特定结果、体征和症状和/或其量或程度。

[0892] 在给予CAR表达细胞的情况下,CRS通常在输注表达CAR的细胞后6-20天时发生。参见Xu等人,Cancer Letters 343(2014)172-78。在一些情况下,CRS在CAR T细胞输注后少于6天或超过20天时发生。CRS的发生率和时机可能与输注时的基线细胞因子水平或肿瘤负荷有关。通常,CRS涉及升高的干扰素(IFN)- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和/或白细胞介素(IL)-

2的血清水平。可在CRS中被快速诱导的其他细胞因子是IL-1 β 、IL-6、IL-8和IL-10。

[0893] 与CRS相关的示例性结果包括发热、寒颤、发冷、低血压、呼吸困难、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑病、ALT/AST升高、肾衰竭、心脏病、缺氧、神经紊乱和死亡。神经系统并发症包括谵妄、癫痫样活动、意识错乱、找词困难、失语和/或变得迟钝。与CRS相关的其他结果包括疲劳、恶心、头痛、癫痫、心动过速、肌痛、皮疹、急性血管渗漏综合征、肝功能损害和肾衰竭。在一些方面,CRS与一种或多种因子(如血清铁蛋白、d-二聚体、转氨酶、乳酸脱氢酶和甘油三酯)的增加相关,或与低纤维蛋白原血或肝脾肿大相关。

[0894] 已经研发出CRS标准,其似乎与CRS的发作相关联,以预测哪些患者更可能有发生sCRS的风险(参见Davilla等人Science translational medicine.2014;6(224):224ra25)。因素包括发热、缺氧、低血压、神经系统改变、升高的炎性细胞因子血清水平,如一组七种细胞因子(IFN γ 、IL-5、IL-6、IL-10、Flt-3L、曲动蛋白和GM-CSF),治疗诱导的这七种细胞因子的升高可能与治疗前肿瘤负荷和sCRS症状密切相关。关于CRS的诊断和管理的其他指南是已知的(参见例如, Lee等人, Blood.2014;124(2):188-95)。在一些实施方案中,反映CRS等级的标准是下表2中详述的那些标准。

[0895]

表2: CRS的示例性分级标准	
等级	症状的描述
1 轻度	不危及生命,只需要对症治疗如退热药和止吐药(例如,发热、恶心、疲劳、头痛、肌痛、不适)
2 中等	需要并响应中等干预: • 氧气需求<40%, 或 • 响应流体或低剂量的单一血管加压药的低血压, 或 • 2级器官毒性(依据CTCAE v4.0)
3 严重	需要并响应积极干预: • 氧气需求$\geq$40%, 或 • 需要高剂量单一血管加压药的低血压(例如,去甲肾上腺素$\geq$20 μg/kg/min、多巴胺$\geq$10 μg/kg/min、去氧肾上腺素$\geq$200 μg/kg/min或肾上腺素$\geq$10 μg/kg/min), 或 • 需要多种血管加压药的低血压(例如,加压素+上述药剂之一,或相当于$\geq$20 μg/kg/min去甲肾上腺素的组合血管加压药), 或 • 3级器官毒性或4级转氨酶升高(通过CTCAE v4.0)
4 危及生命	危及生命: • 需要呼吸机支持, 或 • 4级器官毒性(不包括转氨酶升高)
5 致命的	死亡

[0896] 在一些实施方案中,反映CRS等级的标准是下表3中详述的那些。

表3. CRS的示例性分级标准				
症状/体征	1级(轻度)	2级(中度)	3级(重度)	4级(危及生命)
CRS级别由最严重的症状(不包括发烧)定义				
体温 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}/101.3^{\circ}\text{F}$	任何	任何	任何	任何
[0897] 收缩压 ≤ 90 mm Hg	N/A	流体或单一低剂量血管加压药有反应	需要高剂量或多次血管加压药	危及生命
需要氧气以达到 $\text{SaO}_2 > 90\%$	N/A	$\text{FiO}_2 < 40\%$	$\text{FiO}_2 \geq 40\%$	需要呼吸机支持
器官毒性	N/A	2级	3级或转氨酶升高	4级(不包括转氨酶升高)

[0898] 在一些实施方案中,受试者被认为响应或继发于细胞疗法或其细胞剂量的给予而发生“严重CRS”(“sCRS”),条件是在给予后所述受试者展示:(1)在至少38摄氏度发热至少三天;(2)细胞因子升高,其包括(a)与刚刚给予后的水平相比,以下七种细胞因子的组中至少两种的至少75倍的最大倍数变化:干扰素 γ (IFN γ)、GM-CSF、IL-6、IL-10、Flt-3L、分形趋化因子(fracktalkine)和IL-5,和/或(b)与刚刚给予后的水平相比,以下七种细胞因子的组中至少一种的至少250倍的最大倍数变化:干扰素 γ (IFN γ)、GM-CSF、IL-6、IL-10、Flt-3L、分形趋化因子(fracktalkine)和IL-5;和(c)至少一种毒性临床体征,如低血压(需要至少一种静脉内血管作用加压药)或缺氧($\text{PO}_2 < 90\%$)或一种或多种神经病学障碍(包括精神状态变化、迟钝和/或癫痫)。在一些实施方案中,严重CRS包括3级或更高等级的CRS,如表2或表3中所列。

[0899] 在一些实施方案中,与严重CRS或3级CRS或更高级CRS(如4级或更高级)相关的结果包括以下中的一种或多种:持续发热,例如在指定温度(例如高于或高于约38摄氏度)发热两天或更多天,例如三天或更多天,例如四天或更多天或至少连续三天;高于或高于约38摄氏度的发热;细胞因子的升高,如与至少两种细胞因子(例如,由以下各项组成的组中的至少两种:干扰素 γ (IFN γ)、GM-CSF、IL-6、IL-10、Flt-3L、分形趋化因子(fracktalkine)和IL-5和/或肿瘤坏死因子 α (TNF α))的治疗前水平相比,例如至少或至少约75倍的最大倍数变化,或此类细胞因子中至少一种的例如至少或至少约250倍的最大倍数变化;和/或至少一种毒性临床体征,如低血压(例如,如通过至少一种静脉内血管作用加压药所测量);缺氧(例如,血浆氧(PO_2)水平低于或低于约90%);和/或一种或多种神经病学障碍(包括精神状态变化、迟钝和癫痫)。在一些实施方案中,严重CRS包括需要在重症监护病房(ICU)中进行管理或护理的CRS。

[0900] 在一些实施方案中,CRS(如严重CRS)包括以下的组合:(1)持续发热(至少38摄氏度的发热至少三天)和(2)CRP的血清水平为至少或至少约20mg/dL。在一些实施方案中,所述CRS涵盖需要使用两种或更多种血管加压药的低血压或需要机械通气的呼吸衰竭。在一些实施方案中,在第二次或后续给予中增加血管加压药的剂量。

[0901] 在一些实施方案中,严重CRS或3级CRS涵盖丙氨酸转氨酶的增加、天冬氨酸转氨酶的增加、寒战、发热型嗜中性粒细胞减少症、头痛、左心室功能不全、脑病、脑积水和/或震颤。

[0902] 可以规定测量或检测各种结果的方法。

[0903] 在一些方面,毒性结果是神经毒性或与神经毒性相关。在一些实施方案中,与神经毒性的临床风险相关的症状包括意识模糊、谵妄、表达性失语、迟钝、肌阵挛、嗜睡、精神状态改变、惊厥、癫痫样活动、癫痫(任选地如通过脑电图[EEG]证实)、β淀粉样蛋白(Aβ)水平升高、谷氨酸水平升高和氧自由基水平升高。在一些实施方案中,基于严重性对神经毒性进行分级(例如,使用1-5级量表(参见例如Guido Cavaletti&Paola Marmioli Nature Reviews Neurology 6,657-666 (2010年12月);美国国家癌症研究所一常见毒性标准第4.03版(NCI-CTCAE v4.03))。

[0904] 在一些情况下,神经症状可能是sCRS的最早症状。在一些实施方案中,观察到神经症状在细胞疗法输注后5至7天开始。在一些实施方案中,神经系统变化的持续时间可能在3至19天的范围内。在一些情况下,在sCRS的其他症状消退后,会发生神经系统变化的恢复。在一些实施方案中,通过用抗IL-6和/或一种或多种类固醇治疗不会加速神经系统变化的消退时间或程度。

[0905] 在一些实施方案中,如果在给予后受试者展示限制自理(例如洗澡、穿衣和脱衣、进食、如厕、服药)的以下症状,则认为受试者响应或继发于细胞疗法或其细胞剂量的给予而发生“严重神经毒性”:1)外周运动神经病的症状,包括外周运动神经的炎症或退化;2)外周感觉神经病的症状,包括外周感觉神经的炎症或退化、感觉迟钝(如感官知觉失真,导致异常和不愉快的感觉)、神经痛(如沿着神经或一组神经的剧烈疼痛感),和/或感觉异常(如感觉神经元的功能紊乱,导致在没有刺激的情况下刺痛、麻木、压迫、冷和温的异常皮肤感觉)。在一些实施方案中,严重神经毒性包括3级或更高等级的神经毒性如表4中所示。

[0906]

表4: 神经毒性的示例性分级标准	
等级	症状的描述
1 无症状或轻度	轻度症状或无症状
2 中等	存在限制工具性日常生活活动(ADL)(如准备饭菜、购买杂货或衣服、使用电话、理财)的症状
3 严重	存在限制自理ADL(如洗澡、穿衣和脱衣、自己进食、如厕、服药)的症状
4 危及生命	危及生命的症状,需要紧急干预
5 致命的	死亡

[0907] 在一些实施方案中,与其他方法相比,所述方法减轻与CRS或神经毒性相关的症状。在一些方面,与其他方法相比,所提供的方法减轻与CRS相关的症状、结果或因素,包括与严重CRS或3级或更高级的CRS相关的症状、结果或因素。例如,根据本方法治疗的受试者可能缺少可检测的CRS(例如,严重CRS或3级或更高级的CRS)的症状、结果或因素和/或具有减少的所述症状、结果或因素,如所述的(例如表2或表3中所列的)任何症状、结果或因素。在一些实施方案中,与通过其他方法治疗的受试者相比,根据本方法治疗的受试者可能具有减轻的神经毒性症状,如四肢无力或麻木、记忆、视力和/或智力受损、无法控制的强迫性和/或强制性行为、妄想、头痛、认知和行为问题(包括丧失运动控制、认知退化和自主神经系统功能障碍)以及性功能障碍。在一些实施方案中,根据本方法治疗的受试者可具有减轻的与外周运动神经病、外周感觉神经病、感觉迟钝、神经痛或感觉异常相关的症状。

[0908] 在一些实施方案中,给予通过所提供的方法生产的细胞减轻与神经毒性相关的结果,包括对神经系统和/或脑的损伤,如神经元的死亡。在一些方面,所述方法降低与神经毒性相关的因子(如 β 淀粉样蛋白($A\beta$)、谷氨酸和氧自由基)的水平。

[0909] 在一些实施方案中,在例如,如根据任何前述实施方案所测量,确定或证实所述受试者(如首次确定或证实)展现持续发热时或此后不久的时间,给予用于治疗所述毒性的一种或多种干预或药剂(如靶向毒性的疗法)。在一些实施方案中,在这种证实或确定的某一时间段内,如在这种证实或确定的30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、6小时或8小时内,给予所述一种或多种靶向毒性的疗法。

[0910] V. 组合物和配制品

[0911] 还提供了组合物和配制品,所述组合物和配制品含有通过本文提供的方法生产的表达重组受体的工程化细胞。在一些实施方案中,所述组合物和配制品含有通过本文(如在章节I中)所述的方法生产的细胞,例如细胞的组合物或剂量。在一些实施方案中,所述组合物和配制品是或含有细胞的输出组合物,以及任选地使用说明书,例如,用于例如通过本文(如在章节III中)所述的方法将工程化细胞给予至受试者的说明书。

[0912] 在一些实施方案中,提供包含用重组抗原受体(例如,CAR或TCR)工程化的细胞的细胞的所述剂量作为组合物或配制品,如药物组合物或配制品。在某些实施方案中,所述剂量含有本文(如在章节I-G中)所述的输出组合物的细胞。在特定实施方案中,所述剂量含有通过本文(例如在章节I中)所述的方法生产的细胞。此类组合物可以根据所提供的方法和/或与所提供制品或组合物一起使用,如用于预防或治疗疾病、病症和障碍,或用于检测、诊断和预后方法。

[0913] 术语“药物配制品”是指这样的制剂,其所采取的形式允许其中所含活性成分的生物活性有效,并且其不含对待给予所述配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0914] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0915] 在一些方面,载体的选择部分取决于特定细胞或药剂和/或给予方法。因此,存在多种合适的配制品。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编辑(1980)中。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0916] 在一些方面,组合物中包含缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中。

[0917] 所述配制品或组合物还可以含有多于一种活性成分,所述活性成分可用于用细胞或药剂预防或治疗的特定适应症、疾病或病症,其中相应活性不会相互产生不利影响。此类活性成分以有效用于既定目的的量合适地组合存在。因此,在一些实施方案中,所述药物组合物进一步包括其他药物活性剂或药物,如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中,将所述药剂或细胞以盐(例如,药学上可接受的盐)的形式给予。合适的药学上可接受的酸加成盐包括衍生自以下的那些:无机酸,如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸,硝酸和硫酸;以及有机酸,如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸,例如对甲苯磺酸。

[0918] 在一些实施方案中,所述药物组合物以有效治疗或预防所述疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)含有药剂或细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给予,根据病症,重复所述治疗直至出现疾病症状的所需抑制为止。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注给予组合物、通过多次推注给予组合物、或通过连续输注给予组合物来递送。

[0919] 所述药剂或细胞可以通过任何合适的方式给予,例如,通过推注输注,通过注射,例如,静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、结膜下(subconjunctival)注射、结膜下(subconjunctival)注射、眼球筋膜囊下(sub-Tenon)注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜(posterior juxtасcleral)递送。在一些实施方案中,将它们通过肠胃外、肺内和鼻内给予以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内给予。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给予。在一些实施方案中,给定剂量是通过所述细胞或药剂的单次推注给予来给予。在一些实施方案中,给定剂量是通过所述细胞或药剂例如在不超过3天的时间段中多次推注给予来给予,或通过所述细胞或药剂的连续输注给予来给予。

[0920] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可取决于要治疗的疾病类型、一种或多种药剂的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、给予所述药剂或细胞用于预防性目的还是治疗性目的、先前疗法、受试者的临床病史和对所述药剂或所述细胞的反应、以及主治医师的决断。在一些实施方案中,将组合物一次或在一系列治疗中合适地给予受试者。

[0921] 所述细胞或药剂可以使用标准给予技术、配制品和/或装置来给予。提供用于储存和给予组合物的配制品和装置,如注射器和小瓶。关于细胞,给予可以是自体的或异源的。例如,免疫反应性细胞或祖细胞可以从一名受试者获得,并给予同一受试者或不同但相容的受试者。外周血衍生的免疫反应性细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可以通过局部注射给予,包括导管给予、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给予。在给予治

疗组合物(例如,含有遗传修饰的免疫应答细胞或者治疗或改善神经毒性症状的药剂的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0922] 配制品包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂给予的那些。在一些实施方案中,所述药剂或细胞群是肠胃外给予的。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方案中,所述药剂或细胞群是通过静脉内、腹膜内或皮下注射使用外周全身递送给予受试者的。

[0923] 在一些实施方案中,组合物被提供为无菌液体制剂(例如,等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或粘性组合物),其在一些方面可以被缓冲至选择的pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外地,液体组合物稍微更方便给予,特别是通过注射。另一方面,粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,所述载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0924] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将所述药剂或细胞掺入溶剂中,如掺入与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)的混合物中。

[0925] 用于体内给予的配制品通产是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌性。

[0926] VI. 制品和试剂盒

[0927] 还提供了制品和试剂盒,所述制品和试剂盒含有通过本文提供的方法生产的表达重组受体的工程化细胞。在一些实施方案中,所述制品含有通过本文(如在章节I中)所述的方法生产的细胞,例如细胞的组合物或剂量。在一些实施方案中,所述试剂盒和/或制品是或含有细胞的输出组合物,以及任选地使用说明书,例如,用于例如通过本文(如在章节III中)所述的方法将工程化细胞给予至受试者的说明书。

[0928] 在一些实施方案中,本文提供了制品和/或试剂盒,其包括包含治疗有效量的本文所述的任何工程化细胞组合物,以及向受试者给药以治疗疾病或病症的说明书。在一些实施方案中,所述说明书可以规定用于给予本文所提供的细胞的方法的一些或所有要素。在一些实施方案中,所述说明书规定给予用于细胞疗法的细胞的具体指导,例如,用于给予的剂量、时间安排、受试者的选择和/或鉴定以及用于给予的条件。在一些实施方案中,所述制品和/或试剂盒进一步包含用于淋巴细胞清除疗法的药剂,并且任选地进一步包括用于给予淋巴细胞清除疗法的说明书。在一些实施方案中,所述说明书可以作为伴随用于给予的组合物的标签或包装说明书而包含在内。

[0929] 在一些实施方案中,制品可以具有包含含有表达重组受体的CD4⁺和CD8⁺T细胞的组合物的容器(任选地为小瓶)。在一些实施方案中,制品或试剂盒含有细胞组合物,所述细胞组合物具有在3:1与1:3之间、在2.5:1与1:2.5之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.4:1与1:1.4之间、在1.3:1与1:1.3之间、在1.2:1与1:1.2之间、或在1.1:1与1:1.1之间的比率的CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物具有为或约3:1、2.8:1、2.5:1、2.25:1、2:1、1.8:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.8、1:2、1:2.25、1:2.5、1:2.8、1:3的比率的CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞。在特定实施方案中,制品或试剂盒含有细胞组合物,所述细胞组合物具有在

3:1与1:3之间、在2.5:1与1:2.5之间、在2:1与1:2之间、在1.5:1与1:1.5之间、在1.4:1与1:1.4之间、在1.3:1与1:1.3之间、在1.2:1与1:1.2之间、或在1.1:1与1:1.1之间的比率的表达重组受体(例如CAR)的CD4+T细胞与表达重组受体(例如CAR)的CD8+T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物具有为或约3:1、2.8:1、2.5:1、2.25:1、2:1、1.8:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1, 1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.8、1:2、1:2.25、1:2.5、1:2.8、1:3的比率的表达重组受体(例如CAR)的CD4+T细胞与表达重组受体(例如CAR)的CD8+T细胞。

[0930] 在一些实施方案中,说明书规定了待给予的细胞的剂量。例如,在一些实施方案中,所述说明书中规定的剂量包含在为或约 1×10^6 个与为或约 3×10^8 个之间的总重组受体(例如CAR)表达细胞,例如,在为或约 1×10^7 至为或约 2×10^8 个范围内的此类细胞,如为或约 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 1.5×10^8 个总此类细胞、或任两个前述值之间的范围。在一些实施方案中,给予患者多个剂量,并且每个剂量或总剂量可以在任何前述值内。

[0931] 在一些实施方案中,容器(如小瓶)包含大于或大于或大于约 10×10^6 个T细胞或重组受体表达T细胞、大于或大于或大于约 15×10^6 个T细胞或重组受体表达T细胞、大于或大于或大于约 25×10^6 个T细胞或重组受体表达T细胞。在一些方面,所述小瓶包含在为或约1000万个细胞/mL与为或约7000万个细胞/mL之间、在为或约1000万个细胞/mL与为或约5000万个细胞/mL之间、在为或约1000万个细胞/mL与为或约2500万个细胞/mL之间、在为或约1000万个细胞/mL与为或约1500万个细胞/mL、1500万个细胞/mL与为或约7000万个细胞/mL之间、在为或约1500万个细胞/mL与为或约5000万个细胞/mL之间、在为或约1500万个细胞/mL与为或约2500万个细胞/mL之间、在为或约2500万个细胞/mL与为或约7000万个细胞/mL之间、在为或约2500万个细胞/mL与为或约5000万个细胞/mL之间、和在为或约5000万个细胞/mL与为或约7000万个细胞/mL之间。

[0932] 在一些实施方案中,规定用于给予的多个小瓶或多个细胞或单位剂量的细胞共同包含一定剂量的细胞,所述剂量包含从或从约 1×10^5 至或至约 5×10^8 个总重组受体表达T细胞或总T细胞、 1×10^5 至或至约 1×10^9 个总重组受体表达T细胞或总T细胞、从或从约 5×10^5 至或至约 1×10^9 个总重组受体表达T细胞或总T细胞、或从或从约 1×10^6 至或至约 1×10^{10} 个总重组受体表达T细胞或总T细胞,每个都包含端值。在一些方面,所述制品包含一个或多个单位剂量的所述CD4+和CD8+T细胞或CD4+受体+T细胞和CD8+受体+T细胞,其中所述单位剂量包含在为或约 1×10^7 个与为或约 2×10^8 个之间的重组受体表达T细胞、在为或约 5×10^7 个与为或约 1.5×10^8 个之间的重组受体表达T细胞、为或约 5×10^7 个重组受体表达T细胞、为或约 1×10^8 个重组受体表达T细胞、或为或约 1.5×10^8 个重组受体表达T细胞,任选地其中所述制品中的信息规定给予一个或多个单位剂量和/或对应于此一个或多个单位剂量的体积。

[0933] 在一些实施方案中,所述说明书可以规定给予的剂量方案和时间安排。例如,在一些实施方案中,所述说明书可以规定向所述受试者给予细胞的多个剂量,例如,两个或更多个剂量。在一些实施方案中,所述说明书规定所述多个剂量的时间安排,例如,第二剂量是在第一剂量之后约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21天时给予;和/或规定每个剂量中的剂量量。

[0934] 在一些实施方案中,所述说明书规定了细胞或一种或多种细胞类型的剂量或数量和/或细胞类型(例如,单独群体或亚型)的比率,如CD4+与CD8+的比率。在一些实施方案中,

细胞的群体或亚型,如CD8⁺和CD4⁺T细胞。例如,在一些实施方案中,所述说明书规定,所述细胞是以多个细胞群体或亚型(如CD4⁺和CD8⁺T细胞或亚型)的输出比率来给予,或在所述输出比率的耐受范围内给予,所述输出比率是在为或约5:1与为或约5:1之间(或大于约1:5且小于约5:1),或在为或约1:3与为或约3:1之间(或大于约1:3且小于约3:1),如在为或约2:1与为或约1:5之间(或大于约1:5且小于约2:1),如为或约5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5或1:5。在某些实施方案中,说明书规定了将富集CD4⁺T细胞的组合物和富集CD8⁺T细胞的组合物以所需比率组合作为单一细胞组合物给予至受试者。在特定实施方案中,说明书指定了将富集CD4⁺T细胞的组合物和富集CD8⁺T细胞以所需比率作为分开的组合物给予。在一些方面,所述耐受差异在所需比率的约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%(包括这些范围之间的任何值)内。

[0935] VII. 定义

[0936] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他技术和科学术语或用辞旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的此类定义不一定应当被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0937] 除非上下文另有明确规定,否则如本文所用,单数形式“一种/一个”(“a”)、“一种/一个”(“an”)和“所述”(“the”)包括复数指示物。例如,“一种/一个”(“a”)或“一种/一个”(“an”)意指“至少一种/至少一个”或“一种或多种/一个或多个”。应理解,本文所述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“本质上由方面和变化组成”。

[0938] 在整个本公开文本中,所要求保护的主体的各个方面以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应当被解释为对所要求保护的主体的范围的硬性限制。因此,应当将范围的描述视为已明确公开所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如,在提供值的范围的情况下,应理解,该范围的上限与下限之间的每个中间值以及该所陈述范围中的任何其他所陈述值或中间值涵盖在所要求保护的主体内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在所述较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主体内,受制于在所陈述范围内任何明确排除的限值。在所陈述范围包括所述限值中的一个或两个的情况下,排除那些所包括限值中的任何一个或两个的范围也被包括在所要求保护的主体内。无论范围的广度如何,这都适用。

[0939] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的常用误差范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0940] 如本文所用,叙述核苷酸或氨基酸位置“对应于”所公开序列中的核苷酸或氨基酸位置(例如序列中所述)是指,在使用标准比对算法(例如GAP算法)与所公开序列比对以使同一性最大化之后,所鉴定的核苷酸或氨基酸位置。通过比对序列,本领域技术人员可以例如使用保守和相同的氨基酸残基作为指导来鉴定相应残基。通常,为了鉴定对应位置,比对氨基酸序列使得获得最高阶匹配(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics

and Genome Projects, Smith, D.W. 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo 等人 (1988) SIAM J Applied Math 48:1073)。

[0941] 如本文所用, 术语“载体”是指能够传播其所连接的另一核酸分子的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够引导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。所述载体包括病毒载体, 如逆转录病毒 (例如, γ 逆转录病毒和慢病毒) 载体。

[0942] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用, 并且是指已引入外源核酸的细胞, 包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”, 其包括原代转化细胞和源自其的后代, 不考虑传代次数。后代在核酸含量上可能与亲代细胞不完全相同, 但可能含有突变。本文包括如在初始转化细胞中所筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变型后代。

[0943] 如本文所用, 细胞或细胞群针对特定标记呈“阳性”的陈述是指, 特定标记 (通常是表面标记) 在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标记时, 所述术语是指如通过流式细胞术检测到的, 表面表达的存在, 例如通过用与所述标记特异性地结合的抗体进行染色并检测所述抗体, 其中所述染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的, 所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色, 和/或所述水平与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平基本上相似, 和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0944] 如本文所用, 细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指, 特定标记 (通常是表面标记) 在细胞上或细胞中不存在基本上可检测的存在。当提及表面标记时, 所述术语是指如通过流式细胞术检测到的, 表面表达的不存在, 例如通过用与所述标记特异性地结合的抗体进行染色并检测所述抗体, 其中所述染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到, 所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色, 和/或所述水平基本上低于已知对所述标记呈阳性的细胞的水平, 和/或所述水平与已知对所述标记呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0945] 如本文所用, 在关于氨基酸序列 (参考多肽序列) 使用时, “氨基酸序列同一性百分比 (%)” 和 “同一性百分比” 定义为, 在比对序列并在必要时引入空位以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视作序列同一性的一部分之后, 候选序列 (例如, 主题抗体或片段) 中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以按本领域熟知的多种方式来实现, 例如使用公众可获得的计算机软件, 如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数, 包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0946] 氨基酸取代可以包括用另一种氨基酸替代多肽中的一个氨基酸。所述取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代。可以将氨基酸取代引入感兴趣的结合分子 (例如抗体)、和针对所希望的活性 (例如保留/改进的抗原结合、降低的免疫原性或改进的 ADCC 或 CDC) 筛选的产物中。

[0947] 通常可以根据以下常见的侧链特性将氨基酸进行分组：

[0948] (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0949] (2) 中性亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0950] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0951] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0952] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0953] (6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

[0954] 在一些实施方案中，保守取代可能涉及将这些类别之一的成员交换为同一类别的另一个成员。在一些实施方案中，非保守氨基酸取代可能涉及将这些类别之一的成员交换为另一个类别。

[0955] 如本文所用的，组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物（包括细胞）的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0956] 如本文所用，“受试者”是哺乳动物，如人或其他动物，并且通常是人。

[0957] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术术语、符号和其他技术和科学术语或用辞旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下，为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语，并且本文中包含的此类定义不一定应当被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0958] VIII. 示例性实施方案

[0959] 所提供的实施方案包括：

[0960] 1. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法，所述方法包括：

[0961] (a) 以在2:1与1:2之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率组合CD4+T细胞组合物和CD8+T细胞组合物，从而产生输入组合物；

[0962] (b) 在刺激条件下孵育所述输入组合物，从而产生刺激组合物；其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在，所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域；

[0963] 并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞。

[0964] 2. 根据实施方案1所述的方法，其中所述输入组合物中的CD4+和CD8+细胞被富集或选自来自受试者的原代样品，任选地其中所述输入组合物中的CD4+和CD8+细胞被分开地富集或选自来自受试者的原代样品。

[0965] 3. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法，其中所述CD4+T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD4+T细胞。

[0966] 4. 根据实施方案1或2所述的方法，其中所述CD8+T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD8+T细胞。

[0967] 5. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法，所述方法包括在刺激条件下孵育输入组合物，从而产生刺激组合物，其中：

[0968] 所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4+与CD8+T细胞，并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞；并且

[0969] 所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[0970] 6.根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中所述孵育是在无血清培养基中进行。

[0971] 7.根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的为CD4+T细胞或CD8+T细胞的细胞。

[0972] 8.根据实施方案1-7中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在 100×10^6 个与 500×10^6 个之间的总CD4+和CD8+T细胞。

[0973] 9.根据实施方案1-8中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约 300×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞。

[0974] 10.根据实施方案9所述的方法,其中所述总CD4+和CD8+T细胞是活细胞。

[0975] 11.根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在 1×10^6 个细胞/mL与 5×10^6 个细胞/mL之间的浓度。

[0976] 12.根据实施方案1-11中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约 3×10^6 个细胞/mL的浓度。

[0977] 13.根据实施方案1-12中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4+与CD8+细胞。

[0978] 14.根据实施方案1-13中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4+与CD8+细胞。

[0979] 15.根据实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约1:1的比率的CD4+与CD8+细胞。

[0980] 16.根据实施方案1-15中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4+和CD8+。

[0981] 17.根据实施方案16所述的方法,其中呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4+细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8+细胞的比率为或为约1.1:1。

[0982] 18.根据实施方案1-17中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4+和CD8+细胞。

[0983] 19.根据实施方案18所述的方法,其中呈CD27和CCR7表面阳性的CD4+细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的CD8+细胞的比率为或为约1.69:1。

[0984] 20.根据实施方案1-19中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含任选地在2.0:1至1.5:1之间的比率的呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4+和CD8+细胞。

[0985] 21.根据实施方案1-20中任一项所述的方法,其还包括:

[0986] 将重组受体引入来自所述刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括使所述刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷酸的药剂接触。

[0987] 22.根据实施方案21所述的方法,其中:

[0988] 所述接触是通过用载体转染进行,其中所述载体是转座子,任选地睡美人(SB)转座子或Piggybac转座子;或者

- [0989] 所述接触是通过病毒载体转导进行。
- [0990] 23. 根据实施方案1-22中任一项所述的方法,其还包括:
- [0991] 将重组受体引入来自所述刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导所述刺激组合物的细胞。
- [0992] 24. 根据实施方案21-23中任一项所述的方法,其中所述引入是在无血清培养基中进行。
- [0993] 25. 根据实施方案21-24中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含少于 300×10^6 个细胞。
- [0994] 26. 根据实施方案21-25中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含在 50×10^6 个与 200×10^6 个之间的细胞。
- [0995] 27. 根据实施方案21-26中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含为或约 100×10^6 个细胞。
- [0996] 28. 根据实施方案21-27中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度。
- [0997] 29. 根据实施方案21-28中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含在 0.5×10^6 个细胞/mL与 2×10^6 个细胞/mL之间的浓度。
- [0998] 30. 根据实施方案21-29中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含为或约 1×10^6 个细胞/mL的浓度。
- [0999] 31. 根据实施方案21-30中任一项所述的方法,其包括在将所述重组受体引入所述刺激组合物的细胞中之前,在刺激条件下孵育之后,调节所述刺激组合物的组成。
- [1000] 32. 根据实施方案21-32中任一项所述的方法,其中所述刺激组合物的细胞是活细胞。
- [1001] 33. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括将重组受体引入T细胞组合物的细胞中,所述T细胞组合物包含至少或约至少 1×10^6 个活细胞/mL的浓度,其中所述T细胞组合物的细胞的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%是CD4+T细胞或CD8+T细胞。
- [1002] 34. 根据实施方案33所述的方法,其中所述T细胞组合物的浓度为小于 5×10^6 个活细胞/mL。
- [1003] 35. 根据实施方案33或34中任一项所述的方法,其中所述T细胞组合物包含至少或约至少或约 100×10^6 个活细胞。
- [1004] 36. 根据实施方案33-35中任一项所述的方法,其中所述T细胞组合物包含少于 300×10^6 个活细胞。
- [1005] 37. 根据实施方案33-36中任一项所述的方法,其中所述引入包括通过转导包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体来接触所述T细胞。
- [1006] 38. 根据实施方案33-37中任一项所述的方法,其中所述引入是在无血清培养基中进行。
- [1007] 39. 根据实施方案33-38中任一项所述的方法,其中所述T细胞组合物中的一种或多种细胞被激活和/或包含所述LDL受体的表面表达。

[1008] 40. 根据实施方案33-39中任一项所述的方法, 其中所述细胞组合物中的细胞的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%:

[1009] (i) 表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表

[1010] 面标记;

[1011] (ii) 包含选自IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的细胞因子的细胞内表达;

[1012] (iii) 处于细胞周期的G1期或较后期; 和/或

[1013] (iv) 能够增殖。

[1014] 41. 根据实施方案33-40中任一项所述的方法, 其中在所述引入之前, 通过包括在刺激条件下孵育包含CD4⁺和CD8⁺T细胞的输入组合物的过程来产生所述组合物的细胞, 其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在, 所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[1015] 42. 根据实施方案41所述的方法, 其中所述孵育是在无血清培养基中进行。

[1016] 43. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法, 所述方法包括:

[1017] (a) 在刺激条件下孵育输入组合物, 从而产生刺激组合物, 其中:

[1018] 所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞, 并且包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个CD4⁺和CD8⁺T细胞; 并且

[1019] 所述刺激条件包括刺激试剂的存在, 所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域; 并且

[1020] (b) 将重组受体引入所述刺激组合物的少于 300×10^6 个细胞中, 从而产生工程化细胞组合物, 其中所述引入包括使所述刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体接触。

[1021] 44. 根据实施方案43中任一项所述的方法, 其中所述孵育和/或所述引入是在无血清培养基中进行。

[1022] 45. 根据实施方案43或44中任一项所述的方法, 其中所述CD4⁺和CD8⁺T细胞是活细胞。

[1023] 46. 根据实施方案44中任一项所述的方法, 其中来自所述刺激组合物的细胞是活细胞。

[1024] 47. 根据实施方案33-46中任一项所述的方法, 其中所述引入是在刺激条件下孵育开始之后的2天内和/或在将所述输入组合物的所述CD4⁺T细胞和所述CD8⁺T细胞组合之后的2天内开始。

[1025] 48. 根据实施方案33-47中任一项所述的方法, 其中所述引入是在刺激条件下孵育开始之后的36小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4⁺T细胞和所述CD8⁺T细胞组合之后的36小时内开始。

[1026] 49. 根据实施方案33-48中任一项所述的方法, 其中所述引入是在刺激条件下孵育开始之后的30小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4⁺T细胞和所述CD8⁺T细胞组合之后的30小时内开始。

[1027] 50. 根据实施方案33-49中任一项所述的方法, 其还包括在促进所述工程化细胞的

增殖和/或扩增的条件下培育所述工程化组合物,从而生产包含所述工程化T细胞的输出组合物。

[1028] 51.根据实施方案50所述的方法,其中所述培育是在无血清培养基中进行。

[1029] 52.一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:

[1030] (a) 在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物;其中所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞,并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞;并且其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;

[1031] (b) 将重组受体引入来自所述刺激组合物的少于 300×10^6 个细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导所述刺激组合物的细胞。

[1032] (c) 在促进所述工程化细胞的增殖和/或扩增的条件下培育所述工程化组合物,从而生产包含所述工程化T细胞的输出组合物。

[1033] 53.根据实施方案52所述的方法,其中所述孵育、引入和/或培育是在无血清培养基中进行。

[1034] 54.根据实施方案41-53所述的方法,其中所述输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞、在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞,任选地为或约1:1的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞。

[1035] 55.根据实施方案41-54中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺。

[1036] 56.根据实施方案55所述的方法,其中呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.1:1。

[1037] 57.根据实施方案41-56中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[1038] 58.根据实施方案57所述的方法,其中呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.69:1。

[1039] 59.根据实施方案41-58中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[1040] 60.根据实施方案43-59中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含少于 300×10^6 个细胞。

[1041] 61.根据实施方案43-60中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含在 50×10^6 个与 200×10^6 个之间的细胞,任选地为或约 100×10^6 个细胞。

[1042] 62.根据实施方案43-61中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1043] 63.根据实施方案43-62中任一项所述的方法,其中对于所述引入,所述刺激组合物包含在 0.5×10^6 个细胞/mL与 2×10^6 个细胞/mL之间的浓度,任选地为或约 1×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1044] 64.根据实施方案43-63中任一项所述的方法,其在将所述重组受体引入所述刺激

组合物的细胞中之前,在刺激条件下孵育之后,调节所述刺激组合物的组成。

[1045] 65.根据实施方案1-64中任一项所述的方法,其中所述孵育是在一种或多种细胞因子的存在下进行。

[1046] 66.根据实施方案65所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15。

[1047] 67.根据实施方案66所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1048] 68.根据实施方案66或67所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1049] 69.根据实施方案1-68中任一项所述的方法,其中所述刺激组合物中的细胞的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%:

[1050] (i) 表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;

[1051] (ii) 包含选自IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的细胞因子的细胞内表达;

[1052] (iii) 处于细胞周期的G1期或较后期;和/或

[1053] (iv) 能够增殖。

[1054] 70.根据实施方案1-69中任一项所述的方法,其中所述刺激试剂包含与TCR复合物的成员特异性地结合、任选地与CD3特异性地结合的一级药剂。

[1055] 71.根据实施方案70所述的方法,其中所述刺激试剂还包含与T细胞共刺激分子特异性地结合的二级药剂,任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

[1056] 72.根据实施方案70或实施方案71所述的方法,其中所述一级和/或二级药剂包含抗体,任选地其中所述刺激试剂包括与抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段一起孵育。

[1057] 73.根据实施方案71-72中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和/或二级药剂存在于固体支持物的表面上。

[1058] 74.根据实施方案73所述的方法,其中所述固体支持物是或包含珠。

[1059] 75.根据实施方案74所述的方法,其中所述珠包含大于或大于约3.5 μm ,但是不大于约9 μm 或不大于约8 μm 或不大于约7 μm 或不大于约6 μm 或不大于约5 μm 的直径。

[1060] 76.根据实施方案74或实施方案75所述的方法,其中所述珠包含为或约4.5 μm 的直径。

[1061] 77.根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述珠是惰性的。

[1062] 78.根据实施方案74-77中任一项所述的方法,其中所述珠是或包含聚苯乙烯表面。

[1063] 79.根据实施方案74-78中任一项所述的方法,其中所述珠是磁性的或超顺磁性的。

[1064] 80.根据实施方案74-79中任一项所述的方法,其中珠与细胞的比率为小于3:1。

[1065] 81.根据实施方案74-80中任一项所述的方法,其中珠与细胞的比率为从或从约2:

1至0.5:1。

[1066] 82.根据实施方案74-81中任一项所述的方法,其中珠与细胞的比率为或为约1:1。

[1067] 83.根据实施方案1-82中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育少于48小时。

[1068] 84.根据实施方案1-83中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育持续12小时与36小时之间,包含端值。

[1069] 85.根据实施方案1-84中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育持续18小时与30小时之间,包含端值。

[1070] 86.根据实施方案1-85中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育,持续或持续约24小时。

[1071] 87.根据实施方案23-86中任一项所述的方法,其中将所述接触(任选地转导)进行少于48小时。

[1072] 88.根据实施方案23-87中任一项所述的方法,其中将所述接触(任选地转导)进行持续12小时与36小时之间,包含端值。

[1073] 89.根据实施方案23-88中任一项所述的方法,其中将所述接触(任选地转导)进行持续18小时与30小时之间,包含端值。

[1074] 90.根据实施方案23-89中任一项所述的方法,其中将所述接触(任选地转导)进行持续或持续约24小时。

[1075] 91.根据实施方案23-90中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。

[1076] 92.根据实施方案23-91中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

[1077] 93.根据实施方案23-92中任一项所述的方法,其中所述接触(任选地转导)是在不存在转导佐剂的情况下进行。

[1078] 94.根据实施方案23-93中任一项所述的方法,其中所述引入是在一种或多种细胞因子的存在下进行。

[1079] 95.根据实施方案94所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15。

[1080] 96.根据实施方案94或95所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1081] 97.根据实施方案94-96中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1082] 98.根据实施方案50-97中任一项所述的方法,其中所述培育的至少一部分是伴随混合和/或灌注进行的。

[1083] 99.根据实施方案98所述的方法,其中所述培育的至少一部分是伴随为、约、或至少500mL/天、600mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、900mL/天、1,000mL/天、1,200mL/天、1,400mL/天、1,500mL/天、1,600mL/天、1,800mL/天、和/或2,000mL/天的速率下的灌注

进行的。

[1084] 100. 根据实施方案98或99所述的方法,其中所述培育的至少第一部分是在为、约、或至少500mL/天、750mL/天、或1,000mL/天的灌注速率下进行的,并且其中所述培育的至少第二部分是在为、约、或至少1,200mL/天、1,400mL/天、或1,500mL/天的灌注速率下进行的。

[1085] 101. 根据实施方案98-100中任一项所述的方法,其中当所述细胞达到特定密度时,开始和/或增加所述灌注。

[1086] 102. 根据实施方案101所述的方法,其中所述特定密度为、为约或为至少 0.4×10^6 个细胞、 0.5×10^6 个细胞、 0.6×10^6 个细胞、 0.8×10^6 个细胞、 1.0×10^6 个细胞、 1.2×10^6 个细胞、 1.4×10^6 个细胞、 1.6×10^6 个细胞、 1.8×10^6 个细胞、 2.0×10^6 个细胞、 2.2×10^6 个细胞、或 2.4×10^6 个细胞。

[1087] 103. 根据实施方案98-102中任一项所述的方法,其中当所述细胞达到为或为约 0.6×10^6 个细胞/mL的密度时,开始和/或增加所述灌注至为或为约750mL/天的速率。

[1088] 104. 根据实施方案98所述的方法,其中当所述细胞达到为或为约 2.0×10^6 个细胞/mL的密度时,开始和/或增加所述灌注至为或为约1500mL/天的速率。

[1089] 105. 根据实施方案50-104中任一项所述的方法,其中所述培育是在一种或多种细胞因子的存在下进行。

[1090] 106. 根据实施方案105所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15。

[1091] 107. 根据实施方案105或106所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在50IU/mL与400IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1092] 108. 根据实施方案105-107中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在50IU/mL与400IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1093] 109. 根据实施方案50-108中任一项所述的方法,其中所述培育是在刺激条件下孵育开始之后的3天内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的3天内开始。

[1094] 110. 根据实施方案50-109中任一项所述的方法,其中所述培育是在刺激条件下孵育开始之后的60小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的60小时内开始。

[1095] 111. 根据实施方案50-110中任一项所述的方法,其中所述培育是在刺激条件下孵育开始之后的48小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的48小时内开始。

[1096] 112. 根据实施方案50-111中任一项所述的方法,其中将所述培育进行至少直到所述组合物包含阈值数量的T细胞。

[1097] 113. 根据实施方案112所述的方法,其中将所述培育继续进行达到所述阈值数量的T细胞之后的至少一天。

[1098] 114. 根据实施方案113所述的方法,其中T细胞的所述阈值数量为、为约或为至少 1200×10^6 个细胞。

- [1099] 115. 根据实施方案50-114中任一项所述的方法,其中T细胞的所述阈值数量为、为约或为至少 3500×10^6 个细胞。
- [1100] 116. 根据实施方案50-115中任一项所述的方法,其中T细胞的所述阈值数量为、为约或为至少 5500×10^6 个细胞。
- [1101] 117. 根据实施方案50-116中任一项所述的方法,其包括在所述培育后收集所述输出组合物的细胞。
- [1102] 118. 根据实施方案50-117所述的方法,其包括在所述培育后收集所述输出组合物的细胞,其中在刺激条件下孵育开始之后至少9天收集所述输出组合物的细胞。
- [1103] 119. 根据实施方案50-118所述的方法,其包括在所述培育后收集所述输出组合物的细胞,其中在刺激条件下孵育开始之后至少10天收集所述输出组合物的细胞。
- [1104] 120. 根据实施方案118或119所述的方法,其包括在8天至25天内的在开始孵育与收集所述输出组合物的细胞之间的时间量的95%置信区间。
- [1105] 121. 根据实施方案118或119所述的方法,其包括在9天至21天内的在开始孵育与收集所述输出组合物的细胞之间的时间量的95%置信区间。
- [1106] 122. 根据实施方案118或119所述的方法,其包括在9天至16天内的在开始孵育与收集所述输出组合物的细胞之间的时间量的95%置信区间。
- [1107] 123. 根据实施方案52-122中任一项所述的方法,其还包括任选地在药学上可接受的赋形剂的存在下配制所述输出组合物的细胞以便低温保存和/或给予至受试者。
- [1108] 124. 根据实施方案123所述的方法,其中在低温保护剂的存在下配制所述输出组合物的细胞。
- [1109] 125. 根据实施方案124所述的方法,其中所述低温保护剂包含DMSO。
- [1110] 126. 根据实施方案122-124中任一项所述的方法,其中将所述输出组合物的细胞配制在容器中,任选地小瓶或袋中。
- [1111] 127. 根据实施方案1-126中任一项所述的方法,其还包括在所述孵育之前从生物样品中分离所述CD4+T细胞和/或所述CD8+T细胞。
- [1112] 128. 根据实施方案127所述的方法,其中所述分离包括基于CD4和/或CD8的表面表达,任选地通过阳性或阴性选择来选择细胞。
- [1113] 129. 根据实施方案127或实施方案128所述的方法,其中所述分离包括进行基于免疫亲和力的选择。
- [1114] 130. 根据实施方案127-129中任一项所述的方法,其中所述生物样品包含从受试者获得的原代T细胞。
- [1115] 131. 根据实施方案130所述的方法,其中所述受试者是人受试者。
- [1116] 132. 根据实施方案127-131中任一项所述的方法,其中所述生物样品是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。
- [1117] 133. 根据实施方案1-132中任一项所述的方法,其中所述重组受体能够与靶抗原结合,所述靶抗原与疾病、障碍或病症的细胞或组织相关,为疾病、障碍或病症的细胞或组织所特有,和/或在疾病、障碍或病症的细胞或组织上表达。
- [1118] 134. 根据实施方案133所述的方法,其中所述疾病、障碍或病症是感染性疾病或障

碍、自身免疫性疾病、炎性疾病、或者肿瘤或癌症。

[1119] 135. 根据实施方案133或134所述的方法, 其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

[1120] 136. 根据实施方案133-135中任一项所述的方法, 其中所述靶抗原选自5T4、8H9、avb6整合素、B7-H6、B细胞成熟抗原(BCMA)、CA9、癌症-睾丸抗原、碳酸酐酶9(CAIX)、CCL-1、CD19、CD20、CD22、CEA、乙型肝炎表面抗原、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、癌胚抗原(CEA)、CE7、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、c-Met、双重抗原、EGFR、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、EPHa2、肝配蛋白B2、erb-B2、erb-B3、erb-B4、erbB二聚体、EGFR vIII、雌激素受体、胎儿AChR、叶酸受体 α 、叶酸结合蛋白(FBP)、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱受体、G250/CAIX、GD2、GD3、gp100、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13受体 α 2(IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、路易斯Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MART-1、间皮素、鼠CMV、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、NCAM、NKG2D、NKG2D配体、NY-ESO-1、O-乙酰化GD2(OGD2)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、PSCA、孕酮受体、存活蛋白、ROR1、TAG72、VEGF受体、VEGF-R2、Wilms肿瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原以及与通用标签相关的抗原。

[1121] 137. 根据实施方案1-136中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是或包含功能性非TCR抗原受体或TCR或其抗原结合片段。

[1122] 138. 根据实施方案1-137中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[1123] 139. 根据实施方案1-138中任一项的方法, 其中所述重组受体是抗BCMA CAR。

[1124] 140. 根据实施方案138或139所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体包含含有抗原结合结构域的细胞外结构域。

[1125] 141. 根据实施方案140所述的方法, 其中所述抗原结合结构域是或包含抗体或其抗体片段, 所述抗体片段任选地是单链片段。

[1126] 142. 根据实施方案141所述的方法, 其中所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

[1127] 143. 根据实施方案141或实施方案142所述的方法, 其中所述片段包含scFv。

[1128] 144. 根据实施方案138-143中任一项所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体还包含间隔子和/或铰链区。

[1129] 145. 根据实施方案138-144中任一项所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体包含细胞内信号传导区。

[1130] 146. 根据实施方案145所述的方法, 其中所述细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。

[1131] 147. 根据实施方案146所述的方法, 其中所述细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体(TCR)组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的信号传导结构域。

[1132] 148. 根据实施方案146或147所述的方法, 其中所述细胞内信号传导结构域是或包含CD3链任选地CD3-zeta(CD3 ζ)链的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

- [1133] 149.根据实施方案145-148中任一项所述的方法,其中所述嵌合抗原受体还包含设置在所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导区之间的跨膜结构域。
- [1134] 150.根据实施方案145-149中任一项所述的方法,其中所述细胞内信号传导区还包含共刺激信号传导区。
- [1135] 151.根据实施方案150所述的方法,其中所述共刺激信号传导区包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。
- [1136] 152.根据实施方案150或实施方案152所述的方法,其中所述共刺激信号传导区包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。
- [1137] 153.根据实施方案150-152中任一项所述的方法,其中所述共刺激信号传导区位于所述跨膜结构域与所述细胞内信号传导区之间。
- [1138] 154.根据实施方案113-153中任一项所述的方法,其中在所述方法的大于或大于约85%、大于或大于约90%、或者大于或大于约95%的迭代中生产出包含所述阈值数量或更多数量的细胞的输出组合物。
- [1139] 155.根据实施方案1-154中任一项所述的方法,其中所述无血清培养基包含:
- [1140] 0.5mM至5mM的在基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺;
- [1141] 0.5mM至5mM L-谷氨酰胺;和
- [1142] 至少一种蛋白质,其中所述培养基不含血清。
- [1143] 156.根据实施方案155所述的无血清培养基,其中所述二肽形式的L-谷氨酰胺是L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。
- [1144] 157.根据实施方案155或实施方案156所述的无血清培养基,其中在所述无血清培养基中的所述二肽形式的L-谷氨酰胺的浓度为或为约2mM。
- [1145] 158.根据实施方案155-157中任一项所述的无血清培养基,其中在所述无血清培养基中的L-谷氨酰胺的浓度为或为约2mM。
- [1146] 159.根据实施方案155-158中任一项所述的无血清培养基,其中所述至少一种蛋白质包含白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种,任选地人或重组白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种。
- [1147] 160.一种组合物,其包含通过根据实施方案1-159中任一项所述的方法生产的工程化细胞。
- [1148] 161.根据实施方案160所述的组合物,其还包含药学上可接受的载体。
- [1149] 162.根据实施方案160或实施方案161所述的组合物,其包含低温保护剂,任选地DMSO。
- [1150] 163.一种制品,其包含根据实施方案160-162中任一项所述的组合物,以及用于将所述输出组合物给予至受试者的说明书。
- [1151] 164.根据实施方案163所述的制品,其中所述受试者患有疾病或病症,任选地其中所述重组受体特异性地识别或特异性地结合与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原。
- [1152] 165.根据实施方案55-159中任一项所述的方法,其中在所述培育的至少一部分期间,监测所述细胞的细胞活力、浓度、密度、数量或其组合。
- [1153] 166.根据实施方案165所述的方法,其中通过光学方法,任选地显微术来进行所述

监测。

[1154] 167.根据实施方案165或实施方案166所述的方法,其中通过明视野显微术、荧光显微术、微分干涉差显微术、相差显微术、数字全息显微术(DHM)、差分数字全息显微术(DDHM)或其组合来进行所述监测。

[1155] 168.根据实施方案165-167中任一项所述的方法,其中通过差分数字全息显微术(DDHM)来进行所述监测。

[1156] 169.根据实施方案165-168中任一项所述的方法,其中在所述培育的至少一部分期间,间歇地或连续地进行所述监测,任选地在所述培育期间至少每1小时、6小时、12小时、18小时、24小时或26小时进行一次。

[1157] 170.根据实施方案165-169中任一项所述的方法,其中进行所述监测直到所述细胞达到T细胞的阈值数量、活T细胞的阈值数量、T细胞的阈值浓度或活T细胞的阈值浓度。

[1158] 171.根据实施方案165-170中任一项所述的方法,其中所述监测和培育是在封闭系统中进行。

[1159] 172.根据实施方案50-159和165-171中任一项所述的方法,其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有记忆表型;其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有中枢记忆表型;和/或其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-、和/或CD127+。

[1160] 173.根据实施方案50-159和165-172中任一项所述的方法,其中所述方法的迭代生产出多种所述输出组合物,任选地从人生物样品中生产出,其中所述方法在多名不同的个体受试者中进行,其中:

[1161] 在所述多种所述输出组合物中的具有记忆表型的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1162] 在所述多种所述输出组合物中的具有中枢记忆表型的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1163] 在所述多种所述输出组合物中的为CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-和/或CD127+的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1164] 在所述多种所述输出组合物中的为CCR7+/CD45RA-或CCR7+/CD45RO+的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1165] 在所述多种所述输出组合物中的所述工程化CD4+T细胞、任选地CAR+CD4+T细胞中的中枢记忆CD4+T细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约

45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1166] 在所述多种所述输出组合物中的所述工程化CD8+T细胞、任选地CAR+CD8+T细胞中的中枢记忆CD8+T细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;和/或

[1167] 在所述多种所述输出组合物中的所述工程化T细胞、任选地CAR+T细胞中的中枢记忆T细胞,任选地CD4+中枢记忆T细胞和CD8+中枢记忆T细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间。

[1168] 174.根据实施方案1-159和165-173中任一项所述的方法,其中所述方法生产出在至少约80%、约90%、约95%、约97%、约99%、约100%、或100%的所述人生物样品中展现出预定特征的输出组合物,所述预定特征任选地为在所述输出组合物中表达所述CAR的细胞的阈值数量,其中所述方法在多名不同的个体受试者中进行。

[1169] 175.根据实施方案174所述的方法,其中所述多名不同的个体受试者包括患有疾病或病症的受试者。

[1170] 176.根据实施方案175所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

[1171] 177.根据实施方案176所述的方法,其中所述癌症是血液癌症,任选地多发性骨髓瘤。

[1172] 178.根据实施方案160所述的组合物,其中:

[1173] 所述组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有记忆表型;

[1174] 其中所述组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有中枢记忆表型;

[1175] 其中所述组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、颗粒酶B-、和/或CD127+;和/或

[1176] 其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CCR7+/CD45RA-或呈CCR7+/CD45RO+。

[1177] IX. 实施例

[1178] 仅出于说明性目的包括以下实施例,并不意图限制本发明的范围。

[1179] 实施例1:用于产生表达抗BCMA CAR的工程化T细胞的治疗组合物的过程。

[1180] 通过示例性过程生产出含有表达抗BCMA嵌合抗原受体(CAR)的CD4+和CD8+T细胞的原代T细胞工程化组合物,所述过程包括在以确定的比率组合所选择的细胞用于后续处理步骤之前从样品中单独选择CD4+和CD8+T细胞。从人白细胞单采术样品(包括来自患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者的人白细胞单采术样品)的分离的PBMC中选择CD4+和CD8+细胞的分开的组合物,并将所选细胞组合物低温冷冻。随后,在进行刺激、转导和扩增步骤之前,将所选择的CD4+和CD8+T细胞组合物解冻,并以1:1的活CD4+T细胞与活CD8+T细胞的比率混

合。

[1181] 在示例性无血清培养基(参见例如实施例3)中,以1:1的珠与细胞比率,在具有附接的抗CD3和抗CD28抗体的由聚苯乙烯包被的顺磁性珠的存在下,以约 3×10^6 个细胞/mL的密度刺激来自混合的细胞组合物的大约 300×10^6 个T细胞(150×10^6 个CD4+和 150×10^6 个CD8+T细胞)。培养基还含有重组IL-2、IL-7和IL-15。通过孵育将刺激进行18至30小时之间。

[1182] 在孵育后,洗涤来自刺激的细胞组合物的大约 100×10^6 个活细胞,并将其重悬浮于含有重组IL-2、IL-7和IL-15的示例性无血清培养基中。没有添加转导佐剂。通过旋转接种60分钟用编码抗BCMA CAR的慢病毒载体转导细胞,随后在约37℃下孵育约18至30小时。旋转接种后的细胞密度为约 1×10^6 个细胞/mL。CAR含有对BCMA具特异性的scFv抗原结合结构域、CD28跨膜区域、4-1BB共刺激信号传导区和CD3- ζ 来源的细胞内信号传导结构域。

[1183] 然后,通过转移到生物反应器(例如摇摆运动生物反应器)中的约500mL示例性无血清培养基中来培育转导的细胞以进行扩增,所述示例性无血清培养基含有两倍于在孵育和转导步骤期间所用的浓度的IL-2、IL-7和IL-15。在此示例性过程中,培养基不含有泊洛沙姆。在实现大于或约 0.6×10^6 个细胞/mL的阈值细胞密度之后,逐步添加培养基,定期(如在约2与约15分钟之间)逐步添加新鲜培养基的注液至1000mL的体积,并且在稳定的摇摆条件下(非灌注)培育细胞直到实现大于或约 0.6×10^6 个细胞/mL的阈值活细胞密度。如果活细胞密度大于 0.8×10^6 个细胞/mL,则开始组合填充/灌注步骤,其中以如上所示的逐步方式添加第一培养基,直到目标体积为1000mL,然后按以下所解释的开始灌注。然后,通过伴随连续混合的半连续灌注替换培养基。在扩增阶段期间随着细胞密度增加将灌注速率和/或摇摆速度增加至少一倍。在扩增阶段期间随着细胞密度增加灌注速率增加至少一倍。以逐步的方式将培养基添加到培养物中,每天的总体积由活细胞密度决定(一旦达到某一密度,则以较高的速率),直至速率例如导致每天向培养物中添加大约750mL或1500mL的总新鲜培养基(当达到更高的细胞浓度时,以更高的速率),在一天中定期(例如在约每0.5小时与约每1.5或2小时之间)添加新鲜培养基的注液。某一天在有核细胞(TNC)总数已经达到至少或至少大约 3500×10^6 个之后的时候以及在TNC数量已经达到至少或至少大约 5500×10^6 个总有核细胞的某个时间点时收获细胞。在收获后,通过暴露于磁场将抗CD3和抗CD28抗体缀合的珠从细胞组合物中除去。

[1184] 然后配制细胞,并将组合物的等分试样转移到容器中,例如用于下游存储或使用。在一些实施方案中,将配制的组合物或其部分转移至适合于例如用于潜在地给予至受试者的细胞组合物的低温保存和存储的冷冻袋(如CryoStore冷冻袋)中,和/或将组合物或其部分转移至小瓶或其他容器中例如用于细胞的进一步分析。例如在适合于下游解冻和给予用途的条件下,将细胞低温冷冻。在一些情况下,将30mL体积的配制细胞用于单独的袋中。在一些情形中,将细胞以可变的总细胞浓度低温保存,例如,以允许在细胞用于给予的情境下每个剂量中有一致数量或浓度的CAR+T细胞。在一些实施方案中,目标CAR+CD3+细胞数量为每30mL或每袋有等于或大约所需数量(例如为或约 37.5×10^6 个)的CAR+CD3+细胞,这在一些实施方案中涉及由不同的供体或患者产生的组合物之间总细胞浓度的变化。

[1185] 对于从一系列多发性骨髓瘤患者中获得的个体白细胞单采术样品,使用此示例性过程从此类样品中产生工程化细胞组合物,观察到从激活开始到收获的过程部分的持续时间范围在7天与10天之间,并且这些样品之间的平均持续时间为大约7.5天。进一步确定,在

不同样品之间,整个过程的历程中平均累积群体倍增数为大约7.5。图6A和6B分别示出了在工程化细胞组合物中在CD4+CAR+细胞中(图6A)和在CD8+CAR+细胞中(图6B)具有有所指示表型(基于CD45RA和CCR7表面表达)的细胞的百分比的中值(水平线)、四分位距(框)和1.5x四分位距(须触线)。图6C和6D分别示出了在工程化细胞组合物中在CD4+CAR+细胞中(图6A)和在CD8+CAR+细胞中(图6B)具有有所指示表型(基于CD27和CD28表面表达)的细胞百分比的中值(水平线)、四分位距(框)和1.5x四分位距(须触线)。

[1186] 实施例2:评估所产生的CD4+和CD8+CAR-T细胞治疗组合物的特征

[1187] 通过实施例1中所述的示例性过程,从健康供体中产生了含有表达抗BCMA CAR的CD4+和CD8+T细胞的多种工程化细胞组合物。使用重组人BCMA试剂评估细胞的活力、抗BCMA CAR表达和CAR抗原特异性刺激。通过示例性过程生产的工程化细胞组合物一致地显示出低百分比的半胱天冬酶阳性细胞和高细胞活力(如吖啶橙(AO)和碘化丙啶染色所测量)。此外,在CD4+和CD8+细胞中,CAR+细胞的百分比相似。根据我们的经验,在将工程化细胞组合物与表达抗原的靶细胞一起孵育24小时之后,细胞因子(包括IFN- γ 、TNF- α 、IL2、颗粒酶B和穿孔素)的产生导致处于与活性工程化细胞组合物一致的值的细胞因子产生。这些结果表明,使用如实施例1中所述的过程可以一致地生产活性CAR工程化细胞。

[1188] 实施例3:用于在将细胞工程化的过程中使用的无血清培养基

[1189] 实施例1中所述的用于产生治疗性T细胞组合物的示例性方法包括在无血清培养基中进行激活、转导和培育以扩增细胞的步骤,所述无血清培养基由以下制备:(1)含有约2mM L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的液体基础培养基(GlutaMax);(2)在使用之前保持冷冻的、含有80mM谷氨酰胺和血清替代蛋白的第一补充剂;和(3)以液体溶液提供的第二补充剂,例如OpTmizer™T细胞扩增补充剂。基础培养基含有营养素混合物和缓冲液,并且不含有酚红。在将冷冻的补充剂解冻之后,将组分以约95.0%+/-0.2%(v/v)的基础培养基、约2.5%+/-0.2%(v/v)的第一补充剂和约2.5%+/-0.2%(v/v)的第二补充剂组合,从而产生示例性无血清细胞生长培养基(命名为“SFM-A”)。冷冻补充剂中L-谷氨酰胺的存在确保了其在添加至基础培养基中之前的稳定性,以最小化由于L-谷氨酰胺的不稳定性可能发生的在无血清培养基配制品中可变的谷氨酰胺浓度和/或渐增的氨浓度。由于L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的存在,L-谷氨酰胺在第一补充剂中保持可溶。另外,培养基补充有细胞因子,如IL-2、IL-7和/或IL-15。

[1190] 由上述示例性过程生产出工程化T细胞的七十九种单独的组合物。如通过活细胞的总数所确定,由79个制造运行中的每一个(包括源自健康供体和多发性骨髓瘤患者的那些),在培育期间观察到稳健的扩增。在培育开始的6天内,所有运行都能够生产具有以总细胞计高于 5.5×10^9 个的目标阈值的细胞密度的细胞组合物。在培育开始的6天内,对于所有制造运行都观察到活细胞数量增加大于27倍,其中超过85%的运行在第5天就实现了这种扩增。总体而言,这些数据支持无血清培养基配制品在源自健康供体和患者供体的细胞上的稳健表现。

[1191] 实施例4:评估通过涉及无血清培养基的过程生产的CAR+T细胞组合物。

[1192] 通过基本上如实施例1所述的过程,在示例性SFM-A的存在下生产了表达嵌合抗原受体(CAR)的基因工程化人T细胞。在这项研究中,为了产生表达CAR的T细胞,通过基于免疫亲和力的富集从供体白细胞单采术样品中单独分离CD4+和CD8+T细胞,以约1:1混合,在抗

CD3/抗CD28磁珠的存在下激活,用编码抗BCMA CAR的病毒载体转导,并通过在约37℃下孵育以扩增细胞进行培育。在含5% (v/v) 人血清的培养基中或在实施例3中所述的SFM-A培养基中各自在细胞因子的存在下进行激活、转导和培育以扩增细胞。在SFM-A或含血清培养基的存在下由相同供体产生的匹配细胞组合物之间比较了所生产的工程化T细胞组合物的示例性特征。

[1193] A. 活力

[1194] 评估了在激活之后、在激活和转导之后以及在培育开始(第0天)后的每一天直到第6天的T细胞活力。在过程早期至培育开始后第2天,与含血清培养基相比,在SFM-A的存在下培养的细胞组合物中观察到了较低的细胞数量和活力。然而,到扩增的第3天,在SFM-A的存在与含血清配制品的存在下培养的细胞之间活力是可比的。此结果与在无血清培养基的存在下T细胞扩增的延迟一致,例如,因为细胞在所述过程的初始阶段期间适应无血清条件。尽管最初的细胞数量较低,但在第5天和第6天在SFM-A的存在下培养细胞产生的活细胞数量略多,并且与含血清培养基相比活细胞百分比是可比的。

[1195] B. CAR-T细胞活性

[1196] 在高尔基体抑制剂的存在下,在用佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)/离子霉素刺激后,通过监测细胞因子积累来评估扩增后T细胞组合物中CAR+T细胞的功能活性。在细胞中通过针对IL-2、IFN- γ 和TNF- α 的细胞内细胞因子染色(ICS)评估了细胞因子的多功能积累,还针对表面CD4、CD8或抗BCMA CAR对所述细胞进行共染色。与用含血清培养基培养的细胞相比,在SFM-A的存在下培养的细胞中观察到如通过IL-2、IFN- γ 和TNF- α 的多功能积累确定的功能性CAR+CD4+T细胞或CAR+CD8+T细胞的可比百分比。

[1197] 在将所产生的抗BCMA CAR+T细胞组合物与表达抗原的细胞共培养后,使用Luminex Multiplex测定还在上清液中测量细胞因子IL-2、IFN- γ 、TNF- α 和GM-CSF的产生。与含血清培养基相比,在SFM-A的存在下产生的培养物中,炎性细胞因子(IL-2、TNF- α 、GM-CSF和IFN- γ)的分泌是可比的。

[1198] C. 凋亡标记

[1199] 评估了抗BCMA CAR+T细胞组合物的活性半胱天冬酶3的表面表达,所述抗BCMA CAR+T细胞组合物是通过使用含血清培养基或示例性SFM-A的过程生产的,并且随后被低温保存和解冻,之后进行分析。在SFM-A的存在下培养的所产生的工程化CD3+CAR+细胞的小于5%对于活性半胱天冬酶-3呈阳性。与含血清培养基相比,当在SFM-A的存在下培养时,在从示例性供体生产的匹配的T细胞组合物中,对于活性半胱天冬酶-3呈阳性的CD3+CAR+细胞的频率较低。

[1200] D. 转导频率

[1201] 通过流式细胞术确定所产生的T细胞组合物的转导频率。使用CAR特异性试剂测量抗BCMA CAR的表面表达。在示例性供体匹配的T细胞组合物中,与通过涉及含血清培养基的过程生产的细胞相比,通过涉及SFM-A的过程生产的细胞展现出增加的转导效率。在示例性实验中,转导效率从约53%增加到约68%。

[1202] 实施例5:通过无血清培养基过程生产的CAR表达T细胞的抗肿瘤作用

[1203] 基本上如实施例1和3中所述的通过涉及示例性SFM-A的过程生产抗BCMA CAR+T细胞组合物。作为比较,除了使用含血清培养基外,通过相似的过程从匹配的供体产生T细胞

组合物。通过在荷瘤动物模型(包括OPM2人多发性骨髓瘤弥散的异种移植小鼠模型)中监测在过继转移细胞后的肿瘤,评估所产生的CAR+T组合物的抗肿瘤作用。

[1204] 为了产生荷瘤小鼠,向六至八周龄的雌性NOD.Cg.Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)小鼠注射 2×10^6 个用萤火虫萤光素酶转染的OPM2(多发性骨髓瘤)细胞(OPM2-ffluc)。使用生物发光成像在第13天监测肿瘤大小,并在第14天向小鼠给予单次静脉内(i.v.)注射抗BCMA CAR+T细胞组合物,所述抗BCMA CAR+T细胞组合物通过包括SFM-A的过程生产或通过包括含血清培养基的过程生产而来。所评估的抗BCMA CAR+T细胞组合物是从同一人供体产生。以 1×10^6 、 5×10^5 、或 2.5×10^5 个CAR表达T细胞的剂量给予细胞。将不表达CAR的细胞(模拟物)用作阴性对照。在给予细胞后的100天时间段内监测小鼠的肿瘤生长和存活。

[1205] 在CAR T细胞注射后直至第100天的不同天,通过生物发光成像监测过继转移的CAR表达细胞的抗肿瘤活性。对于生物发光成像,小鼠接受了重悬于PBS (15 μ g/g体重)中的萤光素底物(CaliperLife Sciences,马萨诸塞州霍普金顿)的腹膜内(i.p.)注射。本质上如WO 2015/095895中所述将小鼠麻醉并成像。在每个时间点确定总通量(光子/s)。对于阴性对照治疗的小鼠,由于高的肿瘤负荷,在CAR-T转移之后22与26天之间处死动物。用SFM-A或含血清培养基生产的CAR表达T细胞减慢了肿瘤生长,并延长了存活期,这在所有评估剂量下总体上是可比的。

[1206] 实施例6:示例性过程条件

[1207] 评估了与示例性过程中使用的条件相关的各种参数,所述示例性过程与实施例1中所述的示例性过程相似,但是其中不同的过程步骤的多个方面有改变。改变的方面包括激活密度和孵育时间、转导参数、所使用的一种或多种细胞因子的类型和浓度、和灌注速率的方面。评估了由这些不同的变化过程产生的细胞组合物的结果。

[1208] 在此实施例6中的每个过程都包括一个选择步骤,其中从来自供体受试者的白细胞单采样品中选择CD4+T细胞和CD8+T细胞,分别产生CD4+和CD8+T细胞的两种分开的组合物,随后以大约1:1比率的活CD4+和活CD8+细胞混合活细胞,随后在无血清培养基中在抗CD3/抗CD28磁珠和一种或多种细胞因子的存在下激活所混合的细胞,用编码示例性CAR的病毒载体进行转导并在无血清培养基中在抗CD3/抗CD28磁珠和一种或多种细胞因子的存在下进行培育,随后用在不同过程中有所改变的某些特定参数进行配制和低温保存。

[1209] A. 激活孵育时间

[1210] 在一项研究中,在选择后和转导之前的孵育(在抗CD3/抗CD28包被的磁珠、一种或多种细胞因子和无血清培养基的存在下)的持续时间有所不同。具体地,将孵育进行24小时(n=来自3名个体供体的5种细胞组合物)或48小时(n=来自2名个体供体的2种细胞组合物)。

[1211] 通过针对CD3(使用抗CD3试剂)和CAR(使用重组BCMA-Fc试剂)的表面表达进行染色,通过流式细胞术评估了由所述过程产生的最终细胞组合物中的T细胞的转导效率。观察到,与通过在转导开始之前使用48小时孵育持续时间的时间过程产生的细胞组合物相比,通过在转导开始之前使用24小时孵育持续时间的时间过程产生的工程化细胞组合物具有的转导的T(CD3+CAR+)细胞的百分比高了大约2倍。

[1212] 另外,将通过使用不同孵育持续时间的时间过程生产的工程化细胞与K562-BCMA共培养4天。为了监测增殖,用增殖标记染料CELLTRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher

Scientific, Waltham MA) 来标记细胞。在共培养后, 针对抗BCMA CAR、CD4和CD8的表面表达对细胞进行染色, 并用流式细胞术进行测量。

[1213] 结果总结在表E1中。与使用48小时孵育的过程相比, 在通过用抗CD3/抗CD28磁珠进行24小时转导前孵育的过程产生的工程化细胞组合物中观察到, 在CD4+和CD8+T细胞二者中, 在CAR+细胞中的CAR表面表达水平更高(如通过平均荧光强度(MFI)所确定的)、以及在此测定中抗原表达细胞诱导的增殖的程度更高(如通过CTV染料的稀释所测量的, 由CTV MFI降低所指示)。这些结果与通过示例性过程的CAR转导效率和CAR抗原特异性功能增加相一致, 所述示例性过程包括小于48小时的选择后、转导前孵育持续时间, 例如大约24小时的持续时间。

[1214] 表E1: 在与K562-BCMA靶细胞孵育后的CAR和CTV染色

[1215]		细胞类型	中 值 CAR MFI	中 值 CTV MFI
	24小时刺激	CD4+ T细胞	14463	4057
		CD8+ T细胞	16187	4116
	48小时刺激	CD4+ T细胞	5659	22932
		CD8+ T细胞	12862	8099

[1216] B. 激活细胞密度

[1217] 还通过比较以下工程化细胞组合物的特征来评估用抗CD3/抗CD28磁珠、细胞因子和培养基进行转导前孵育期间细胞密度的影响: 通过以初始细胞密度为 1.5×10^6 个细胞/mL的细胞开始孵育的过程产生的工程化细胞组合物, 与以 3×10^6 个细胞/mL的细胞开始孵育的过程产生的工程化细胞组合物, 与通过以初始密度为 5×10^6 个细胞/mL的细胞开始孵育步骤的过程产生的工程化细胞组合物。在每种情况下, 孵育持续时间为大约24小时。

[1218] 为了评估细胞密度对通过此类过程产生的细胞的功能活性的影响, 将此类细胞进行一系列刺激测定, 其中在多轮抗原暴露中将所产生的抗BCMA CAR-T细胞与经辐照的K562-BCMA靶细胞在共培养物中一起孵育持续7天或更长时间。在共培养的第4天, 在将细胞数量重置为初始接种密度之后, 在相同的培养条件下将细胞收获、计数并与新的靶细胞一起再孵育。如上所述, 在第4天和第7天收集T细胞并评估其增殖。

[1219] 一般而言, 观察到以 1.5×10^6 个细胞/mL或 3×10^6 个细胞/mL的细胞密度开始转导前孵育的过程生产出跨越多名人供体的细胞组合物, 其与通过以 5×10^6 个细胞/mL细胞密度开始孵育步骤的过程产生的示例性工程化细胞组合物相比在此测定中在多轮刺激中具有一致的抗原特异性功能和增殖能力。这些结果与以下结论一致: 在通过以低于 5×10^6 个细胞/mL的细胞密度开始转导之前的孵育的过程产生的工程化细胞组合物中, 经过多轮刺激后在增殖和展现抗原特异性功能的能力方面的一致性得到改善。

[1220] C. 转导条件

[1221] 评估了转导条件的影响。通过如上所述的在转导条件方面有所不同的过程产生细胞组合物。具体地, 在不同的过程中, 在有或没有旋转接种(例如, 使用立式离心机以1600g离心60分钟)的情况下以及在有或没有转导佐剂的情况下进行转导。与在没有旋转接种的情况下进行转导的细胞相比, 观察到在有旋转接种的情况下的转导具有显著更高的CD3+CAR+细胞频率。即使在转导步骤期间不存在转导佐剂时, 在这些过程中也观察到相似的转

导效率。

[1222] 实施例7:扩增期间的抗CD3/抗CD28珠:细胞比率

[1223] 如实施例1中所述的过程(除了在扩增步骤中使用含血清培养基外,其中在含血清培养基中珠与细胞的比率为1:1或3:1)的转导后孵育(扩增)步骤期间,改变抗CD3/抗CD28磁珠与细胞的比率对通过与实施例1和实施例6中所述的过程类似的过程生产的工程化细胞的特征的影响。在所述过程的转导后扩增阶段期间,每天评估细胞组合物的扩增、活力以及细胞外pH和乳酸水平。在此测定中,使用3:1的珠:细胞比率进行此孵育步骤的细胞在接种到摇摆运动生物反应器中后5天显示出更大程度的扩增,但在接种后3天展现出细胞活力下降趋势。观察到细胞外pH和乳酸水平成逆相关。对于以1:1比率孵育的细胞,即使细胞继续扩增,3天之后细胞外乳酸积累和pH下降也减慢了。对于以3:1比率孵育的细胞,细胞外乳酸水平继续积累,并且pH继续下降超过第3天,这与细胞活力下降相一致。

[1224] 评估了使用不同的抗CD3/抗CD28磁珠与细胞的比率产生工程化细胞的过程。通过以下过程产生工程化细胞组合物,所述过程包括从供体受试者的白细胞单采样品中选择CD4⁺和CD8⁺T细胞,随后在含血清培养基中以1:1或3:1的珠与细胞比率用抗CD3/抗CD28磁珠激活之前以大约1:1的比率混合细胞,用示例性抗BCMA CAR进行转导,并进行培育以扩增细胞。

[1225] 通过流式细胞术检查来自工程化组合物的细胞。使用重组BCMA-Fc试剂针对CAR表达对细胞进行染色,并针对CD3、CD4、CD8和活性半胱天冬酶3(一种示例性凋亡标记)的表面表达对细胞进行染色。以3:1的珠与细胞比率刺激的CD3⁺细胞的大约50%对于激活的半胱天冬酶3呈阳性,其中有大约一半对于抗BCMA CAR表达呈阳性。相比之下,以1:1比率刺激的CD3⁺细胞的大约10%对于活性半胱天冬酶3呈阳性,其中有31%表达CAR。观察到对于活性半胱天冬酶3呈阳性的CD4⁺与CD8⁺细胞的比率相似。

[1226] 这些结果与以1:1的抗CD3和抗CD28抗体缀合的珠与细胞的比率刺激的工程化细胞组合物中的活力得以改善相一致。

[1227] 实施例8:在产生含有CAR-T细胞的细胞组合物的制造过程期间包含细胞因子

[1228] 评估了对通过与实施例1和实施例6中所述的过程类似的过程(除了改变存在于培养基中的细胞因子的类型以外)生产的工程化细胞的特征的影响。在IL-2、IL-7和IL-15的不同组合的存在下,由分离的T细胞产生含有表达抗BCMA CAR的CD4⁺和CD8⁺T细胞的工程化组合物。测试了来自六名多发性骨髓瘤个体供体的T细胞。

[1229] 从源自多发性骨髓瘤患者的样品中分离CD4⁺和CD8⁺T细胞。在抗CD3/抗CD28磁珠的存在下刺激细胞,用编码抗BCMA CAR的病毒载体转导所述细胞并培育以扩增所述细胞。刺激、转导和扩增的每个步骤均在细胞因子(仅IL-2; IL-2、IL-7和IL-15; IL-2和IL-15; 或IL-2和IL-7)的存在下在无血清培养基中进行。

[1230] 使用重组BCMA-Fc试剂针对抗BCMA CAR的表达、以及针对CD3、CD4、CD8和活性半胱天冬酶3的表面表达通过流式细胞术评估来自工程化组合物的细胞。

[1231] 在不同细胞因子组合的存在下生产的所有工程化细胞组合物中均观察到高频率的CD3⁺CAR⁺细胞。所有三种细胞因子的组合显示出最低和最一致的呈活性半胱天冬酶3阳性的CD3⁺T细胞的百分比。

[1232] 用细胞内细胞因子染色(ICS)评估了抗原刺激活性。在高尔基体抑制剂的存在下,

将来自工程化组合物的细胞与经辐射的MM.1S细胞(一种表达BCMA的人多发性骨髓瘤细胞系)共培养。评价细胞中的IL-2、IFN- γ 或TNF- α 的细胞内细胞因子积累、或所有三种细胞因子的多功能染色。结果表明,由每名供体生产的工程化细胞组合物含有功能性CD4+CAR+和CD8+CAR+T细胞。在用细胞因子的每种组合生产的工程化细胞组合物中观察到对于内部IL-2、IFN- γ 、TNF- α 呈阳性的经抗原刺激的CD4+和CD8+细胞、以及对于所有三种都呈阳性的多功能细胞。

[1233] 通过流式细胞术通过用CD45RA、CCR7、CD27和CD28染色来评估工程化组合物的细胞的亚表型。CD45RA和CCR7染色的结果表明,在每种条件下产生的工程化细胞组合物主要由CD45RA+CCR7+CD4+和CD8+T细胞构成。在所有工程化细胞组合物中均观察到低水平的CD45RA+CCR7-细胞。CD27和CD28染色的结果表明,在每种条件下产生的工程化细胞组合物主要含有CD27+CD28+CD4+和CD8+T细胞。在所有工程化细胞组合物中均观察到低水平的CD27-CD28-CD4+和CD8+T细胞。

[1234] 实施例9:起始组合物的表型与CAR+T细胞组合物中表达CAR的CD4+和CD8+细胞的比率之间的相关性

[1235] 含有表达嵌合抗原受体(CAR)的自体T细胞的CAR+T细胞组合物是通过从11个单独供体收集的单采术产生,其中从每个供体样品分开处理四个测试样品。一个供体是患有骨髓瘤的患者,其余供体是健康受试者。在洗涤每个单采术样品后,针对细胞活力使用细胞凋亡标记以及针对CD4和CD8的表面表达,通过流式细胞术评估每个样品,以确定每次单采术样品运行中活CD4+与CD8+T细胞的比率(CD4/CD8比率)。

[1236] 通过基于免疫亲和力的选择从单采术样品选择CD4+和CD8+T细胞。将CD4+T细胞和CD8+T细胞以活CD4+与CD8+细胞的1:1比率组合。针对细胞活力使用细胞凋亡特异性标记以及针对包括CD4、CD8、CD45RA和CCR7的标记的表面表达,通过流式细胞术评估组合细胞的样品。确定所选CD4和CD8细胞的混合物中活CD45RA+/CCR7+CD4+与活CD45RA+/CCR7+CD8+的比率(CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率)。

[1237] 为了产生CAR+T细胞组合物,将组合的CD4+和CD8+T细胞通过与抗CD3和抗CD28抗体包被的珠在细胞因子的存在下一起孵育来激活,然后用编码抗BCMA CAR的慢病毒载体转导。CAR含有对BCMA具有特异性的scFv抗原结合结构域、间隔子、CD28跨膜区、4-1BB共刺激信号传导区、和CD3- ζ 衍生的细胞内信号传导结构域。在转导后,将细胞扩增,然后通过低温保存冷冻。将冷冻组合物中的细胞解冻,并通过流式细胞术使用BCMA-Fc试剂评估活力、CD4和CD8的表面表达以及CAR表达。确定呈CD4+的活CAR+细胞与呈CD8+的活CAR+细胞的比率(CAR+CD4/CD8比率)。

[1238] 将单采术样品中的CD4/CD8比率或所选CD4和CD8细胞的混合物中的CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率与工程化CAR-T细胞组合物中的CAR+CD4/CD8比率进行事后(post facto)比较。通过双变量分析评估来自每个受试者的平均比率的相关度,并且表示所绘制数据的0.990概率区的双变量正态椭圆分别示于图1A和图1B中。表E2A和表E2B分别展示关于图1A和图1B中绘制的数据进行的皮尔逊相关性分析的结果。

[1239]

表E2A: 双变量正态椭圆P=0.990; 单采术样品中的CD4/CD8比率				
变量	平均值	标准差	相关性	显著性概率
起始 CD4/CD8 比率	1.57	0.42	-0.11	0.75
最终 CAR+ CD4/CD8比率	1.35	1.00		

[1240]

表E2B: 双变量正态椭圆P=0.990; 所选CD4与CD8细胞的混合物中的CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8比率				
变量	平均值	标准差	相关性	显著性概率
起始 CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8比率	1.52	1.09	0.99	<0.0001
最终 CAR+ CD4/CD8比率	1.35	1.00		

[1241] 如图1A和表E2A中所示,在这个实验中,来自单采术样品的CD4+与CD8+T细胞的活CD4/CD8比率与最终组合物中的CAR+CD4/CD8比率不相关。这个结果与以下观察结果一致:在激活之前基于总活细胞以1:1比率混合纯化的CD4和CD8 T细胞不一定与输出T细胞组合物中CD4+和CD8+T细胞的1:1比率相关。

[1242] 如图1B和表E2B中所示,在这个实验中,最终T细胞组合物中的CAR+CD4/CD8比率与起始幼稚样细胞CD4/CD8 T细胞比率正相关,如通过CD4与CD8细胞的混合物中的CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率的比率所确定。特定地,图1B中的结果示出,基于皮尔逊相关系数和p值<0.0001,在起始样品中CD45RA+/CCR7+/CD4+细胞与CD45RA+/CCR7+/CD8+细胞的比率与T细胞组合物中的CAR+CD4/CD8比率之间的相关性高。虽然在输入组合物中和过程运行之间存在变化,但该相关性仍保持。基于来自这个示例性样品组的该模型拟合,确定约1.1:1的CD45RA+/CCR7+/CD4+与CD45RA+/CCR7+/CD8+的比率可产生输出T细胞组合物中约1:1的CAR+CD4/CD8比率。

[1243] 这些数据支持以下假设:可能通过控制幼稚样CD4+子集与幼稚样CD8+T细胞受试者的比率(如通过CD45RA+和CCR7+表面表达所确定),来控制 and/或调整输出T细胞组合物中CD4+细胞与CD8+细胞的比率和/或组成。

[1244] 实施例10:起始T细胞群的表型与工程化CAR+T细胞组合物中CAR+CD4+和CAR+CD8+T细胞的比率之间的相关性

[1245] 由从15名健康供体和一名多发性骨髓瘤患者收集的单采术样品产生总计50种工程化CAR+T细胞组合物。为了产生CAR-T组合物,将活的所选CD4+和CD8+T细胞以1:1比率组合为起始细胞组合物,然后如实施例9中所述进行激活、转导和扩增。针对活力以及针对包括CD4、CD8、CD27、CD45RA、CCR7和CD62L的标记的表面表达,通过流式细胞术评估来自组合的活CD4+和CD8+T细胞的起始组合物的样品。

[1246] 针对CAR表达以及针对包括CD4和CD8的标记的表面表达,评估来自工程化CAR+T细胞组合物的样品。计算相同供体的单独CAR+T细胞组合物中CD4+CAR+T细胞与CD8+CAR+T细胞的比率(CAR+CD4/CD8比率)的平均值,所述CAR+T细胞组合物是使用与实施例9中所述相同的示例性工艺来产生,但是某些工艺参数发生变化。针对与组合的活CD4+与CD8+细胞的起始组合物的各种表型的相关性,分析平均CAR+CD4/CD8比率。在激活之前以1:1比率组合

所选CD4⁺和CD8⁺T细胞不一定与所产生的输出细胞组合物中1:1的CAR+CD4/CD8比率相关。

[1247] 通过双变量分析来评估平均CAR+CD4/CD8比率与来自每个供体的表型之间的相关度。针对CD45RA⁺/CCR7⁺/CD4⁺T细胞与CD45RA⁺/CCR7⁺/CD8⁺的比率(CD45RA⁺/CCR7+CD4/CD8比率;图2A);CD62L⁻/CCR7⁺/CD4⁺与CD62L⁻/CCR7⁺/CD8⁺的比率(CD62L⁻/CCR7+CD4/CD8比率;图2B);和CD27⁺/CCR7⁺/CD4⁺与CD27⁺/CCR7⁺/CD8⁺的比率(CD27⁺/CCR7+CD4/CD8比率;图2C),示出表示0.950概率的双变量正态椭圆。表E3展示关于图2A-图2C中绘制的数据进行的皮尔逊相关性分析的结果。

[1248]

表E3: 示例性表型的双变量正态椭圆P=0.950					
表型	平均值	标准差	相关性	显著性概率	数量
CD45RA ⁺ /CCR7 ⁺ CD4/CD8比率	1.14	0.56	0.88	<0.0001	16
% CD62L ⁻ /CCR7 ⁺ CD4/CD8比率)	1.66	0.83	0.88	<0.0001	16
% CD27 ⁺ /CCR7 ⁺ CD4/CD8比率	2.01	0.91	0.93	<0.0001	16
输出 CAR ⁺ CD4/CD8比率	1.22	.80			

[1249] 分析指示,使用实施例9中所述的示例性方案,CAR+CD4/CD8比率与健康供体的CD45RA⁺/CCR7+CD4/CD8 T细胞比率呈正相关,但是在这个实验中,对于一个患者样品并非如此。显示CAR+CD4/CD8比率与健康供体和患者样品起始细胞组合物二者中的CD62L⁻/CCR7+CD4/CD8比率和CD27⁺/CCR7+CD4/CD8比率呈正相关。基于模型拟合,计算出预测1.69:1的起始CD27⁺/CCR7+CD4/CD8比率可产生具有约1:1的CAR+CD4/CD8比率的输出细胞组合物。这些结果与以下发现一致:可以调整起始细胞组合物中的CD27+CCR7+CD4/CD8比率以控制和/或预测工程化细胞组合物的所得CAR+CD4/CD8比率。

[1250] 实施例11:基于起始组合物的表型生产CAR+T细胞组合物的过程

[1251] 由从3名单独供体收集的单采术产生含有表达CAR的自体T细胞的十种CAR+T细胞组合物,所述单独供体包括两名健康供体和一名多发性骨髓瘤患者。如实施例9中所述从单采术样品选择CD4⁺和CD8⁺T细胞。针对活力和包括CD27、CCR7、CD4和CD8的表面标记,通过流式细胞术评估单采术样品和所选的CD4⁺和CD8⁺T细胞。确定所选CD4⁺和CD8⁺T细胞中CD27⁺/CCR7+细胞的频率,且每名供体在单采术样品中展现不同的CD27⁺/CCR7+CD4⁺细胞与CD27⁺/CCR7+CD8⁺细胞的比率。例如,患者样品展现约12.2:1的CD27⁺/CCR7+CD4⁺细胞与CD27⁺/CCR7+CD8⁺细胞的比率,而两个健康供体样品展现3.56:1和2.15:1的CD27⁺/CCR7+CD4⁺细胞与CD27⁺/CCR7+CD8⁺细胞的比率。通过以下方式产生输入细胞组合物:(1)以1:1的活CD4⁺与CD8⁺比率(活CD4/CD8)组合所选择的CD4⁺和CD8⁺细胞,或(2)在激活之前以1.69:1的CD27⁺/CCR7+CD4⁺细胞与CD27⁺/CCR7+CD8⁺细胞的比率(CD27⁺/CCR7+CD4/CD8)组合CD4⁺和CD8⁺细胞。基本上如实施例9中所述对来自输入组合物的总计300x 10⁶个细胞或100x 10⁶个细胞进行激活、转导和扩增以产生输出细胞组合物。

[1252] 未观察到激活步骤中的细胞总数影响CAR+CD4/CD8比率。从含有以约1.69:1比率混合的CD27⁺/CCR7+CD4/CD8细胞的起始组合物(包括来自患者样品)产生的输出细胞组合物展现接近1:1的所需目标比率的CAR+CD4/CD8比率(例如在约1.86:1至1:1.86之间)。与从

以1.69:1的CD27+/CCR7+CD4+细胞与CD27+/CCR7+CD8+细胞的比率含有CD4+和CD8+细胞的输入组合物产生的组合物相比,从含有以1:1比率混合的活CD4/CD8细胞的输入组合物产生的输出细胞组合物显示CAR+CD4/CAR+CD8比率的更大变化。在这个实验中,在激活 100×10^6 个细胞或 300×10^6 个细胞时,在示例性过程中使用患者物质产生的输出组合物分别展现约7.6和8.6的CAR+CD4/CAR+CD8比率。当在类似过程中基于表型例如以1.69:1的CD27+CCR7+CD4+:CD27+CCR7+CD8+T细胞比率混合时,在激活 100×10^6 个细胞或 300×10^6 个细胞时,最终CAR+CD4/CAR+CD8比率分别为1.6和1.3。这些结果与以下发现一致:特定表型(例如CD27+/CCR7+细胞)可能与从健康供体和患者样品二者产生的输出组合物中的所得CAR+CD4/CAR+CD8比率相关。

[1253] 实施例12:对于来自患病受试者的样品,评估起始组合物的表型与在CAR+T细胞组合物中的表达CAR的CD4+和CD8+细胞的比率之间的相关性

[1254] 由从患有多发性骨髓瘤的7名单独供体收集的单采术产生含有表达嵌合抗原受体(CAR)的自体T细胞的CAR+T细胞组合物。

[1255] 通过基于免疫亲和力的选择从单采术样品选择CD4+和CD8+T细胞。将CD4+T细胞和CD8+T细胞以活CD4+与CD8+细胞的1:1比率组合。针对包括CD4、CD8、CD27、CD45RA、CCR7和CD62L的标记的表面表达,评估组合的细胞的样品。在所选CD4和CD8细胞的混合物中,确定以下细胞表型的比率:(1) CD27+/CCR7+CD4+细胞与CD27+/CCR7+CD8+细胞的比率(CD27+/CCR7+CD4/CD8比率), (2) CD45RA+/CCR7+CD4+细胞与CD45RA+/CCR7+CD8+细胞的比率(CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率), 和(3) CD62L-/CCR7+CD4+细胞与CD62L-/CCR7+CD8+细胞的比率(CD62L-/CCR7+CD4/CD8比率)。

[1256] 使用基本上如实施例9中所述的过程产生表达抗BCMA CAR的CAR+T细胞组合物,所述过程包括对所产生细胞的激活、转导、扩增和低温保存。将冷冻组合物中的细胞解冻,并通过流式细胞术使用BCMA-Fc试剂评估活力、CD4和CD8的表面表达以及CAR表达。确定呈CD4+的活CAR+细胞与呈CD8+的活CAR+细胞的比率(CAR+CD4/CD8比率)。

[1257] 将所选CD4与CD8细胞的混合物中的CD27+/CCR7+CD4/CD8比率、CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率或CD62L-/CCR7+CD4/CD8比率与工程化CAR-T细胞组合物中的CAR+CD4/CD8比率进行事后比较。通过表示所绘制数据的0.950概率区的双变量正态椭圆评估来自每名受试者的平均比率的相关度并显示于图3A-3C中。如图所示,基于皮尔逊相关性分析,起始样品中的CD27+/CCR7+CD4/CD8比率、CD45RA+/CCR7+CD4/CD8比率或CD62L-/CCR7+CD4/CD8比率与T细胞组合物中的CAR+CD4/CD8比率之间的相关性是显著的。表E4A-E4C显示关于图3A-3C中所绘制数据进行的相关性分析的结果。显著性<.05用*标注。

[1258]

表E4A: 双变量正态椭圆P=0.950; 起始样品和输出细胞组合物中的CD4/CD8比率				
变量	平均值	标准差	相关性	显著性概率
起 始%CD27+CCR7+ CD4/CD8比率	2.689438	1.788478	0.895786	0.0064*
CAR+ CD4/CD8比 率	2.560108	2.459516		

[1259]

表E4B: 双变量正态椭圆P=0.950; 起始样品和输出细胞组合物中的CD4/CD8比率				
变量	平均值	标准差	相关性	显著性概率
起始%CD45RA+CCR7+ CD4/CD8比率	1.394018	0.937173	0.86723	0.0115*
CAR+ CD4/CD8比率	2.560108	2.459516		

[1260]

表E4C: 双变量正态椭圆P=0.950; 起始样品和输出细胞组合物中的CD4/CD8比率				
变量	平均值	标准差	相关性	显著性概率
起始%CD62L-CCR7+ CD4/CD8比率	2.179702	1.153181	0.88584	0.0079*
CAR+ CD4/CD8比率	2.560108	2.456516		

[1261] 实施例13: 用于确定培育期间的细胞活力的连续在线成像

[1262] 使用在线差分数字全息显微术 (DHM) 获得了进行工程化以表达重组受体的过程中的T细胞的各种光学参数。差分DHM允许以用于对象分割的高对比度图像对细胞进行无标签成像, 并获得定量描述成像对象的多个光学或形态特征, 例如, 用于确定细胞计数和活力。

[1263] 大体上如以上实施例1和6中所述, 使用示例性工程化过程将来自健康人类供体的原代T细胞工程化以表达抗BCMA嵌合抗原受体 (CAR)。进行了两次实验运行 (运行1、运行2)。通过转移至生物反应器 (例如, 摇摆运动生物反应器) 来培育细胞以进行扩增。培育包括在半连续灌注和连续混合情况下替换培养基。

[1264] 在培养的长达大约120小时内使用在线差分DHM成像系统 (“连续”), 例如Ovizio iLine F (Ovizio Imaging Systems NV/SA, 布鲁塞尔, 比利时) 连续捕获细胞的全息图像和光学参数。在线差分DHM系统包括连接至生物反应器的一次性管路系统, 使得样品可以从生物反应器流经管路系统, 其中成像系统捕获行进穿过的细胞的全息图像和光学参数, 并且使样品返回到生物反应器。从图像确定细胞活力和活细胞计数 (VCC)。还将工程化细胞的活力与通过手动采样 (“手动”) 和使用自动细胞计数器进行细胞计数 (在培养的长达大约120小时内的各个时间点采样) 的结果进行比较。基于时程分析和线性回归比较了这两种方法。

[1265] 图4A和4B示出了在实验运行1 (图4A) 和运行2 (图4B) 中使用通过差分DHM的连续监测或手动采样评估的活细胞计数 (VCC) 和活力的比较。以下表E5示出了比较的 R^2 和斜率。如使用这两种方法所测量的VCC的差异落在手动采样方法的预期方差之内。

[1266] 表E5. 采样方法之间的比较的 R^2 和斜率。

[1267]

实验	R^2		斜率	
	VCC	活力	VCC	活力
运行1	0.97	0.96	0.92	0.80
运行2	0.99	0.98	0.94	0.98

[1268] 结果表明, 在连续监测和手动采样时的VCC和活力高度相关。所述结果与在细胞工程化过程中的用于扩增细胞的培育期间通过差分DHM连续监测的效用一致。

[1269] 实施例14: 使用连续在线成像比较手动扩增和自动化扩增

[1270] 将通过在线成像和自动化灌注来连续监测细胞的完全自动化、无需操作者的细胞

扩增方法与手动扩增方法进行比较。

[1271] 使用示例性工程化过程,将来自健康人供体的原代T细胞激活并用载体转导,以表达示例性嵌合抗原受体(CAR)。转导后,将细胞汇集并接种以进行两种不同的培养,一种是基于使用差分DHM的连续在线成像的自动化扩增,并且另一种是手动扩增方法。

[1272] 在自动化扩增培养中,在摇摆运动生物反应器中培育细胞,其中在半连续灌注和连续混合的情况下进行培养基替换。大体上如以上实施例13中所述,使用自动化差分DHM成像系统监测细胞活力和活细胞计数(VCC)。对于两种培养,在接种时的初始VCC是相似的(对于自动化培养 0.12×10^6 个细胞/mL,对于手动培养为 0.14×10^6 个细胞/mL)。自动化扩增中的灌注是基于通过软件算法计算的VCC的四小时滚动平均值,其中所述方法的进展要求VCC平均值大于目标VCC。对于3个灌注步骤,目标VCC为 0.6×10^6 个细胞/mL、 1×10^6 个细胞/mL和 4×10^6 个细胞/mL。接种后不发生另外的操作者干预。在手动扩增培养中,大体上如以上实施例1中所述进行灌注,每天进行一次采样。还通过流式细胞术评估细胞的细胞表面标记表达。

[1273] 如图5中所示,在自动化扩增系统的情况下观察到更高的T细胞生长。如通过连续差分DHM成像评估的细胞活力和如通过流式细胞术评估的细胞表型在自动化扩增过程与手动扩增过程之间相似。

[1274] 所述结果与无需人操作者的用于在T细胞工程化过程期间培育和监测细胞的连续DHM成像和自动化扩增过程的效用一致。在一些方面,这种方法可用于确定原代T细胞的生长动力学,并确定收获细胞以进行工程化或给予的时间。

[1275] 实施例15:评估通过示例性制造过程产生的T细胞组合物

[1276] 在本质上如实施例1中所述的示例性过程中,从收集自50名单独的人受试者的单采术(每名受试者一个单采术)(包括10名健康供体和40名多发性骨髓瘤患者)中产生了含有表达抗BCMA CAR的自体T细胞的50种CAR+T细胞组合物。从单采术样品中选择CD4+和CD8+T细胞,并分开低温保存。然后将细胞解冻,并且将CD4+T细胞和CD8+T细胞以1:1的活CD4+与CD8+细胞的比率组合。本质上如实施例1中所述,将所组合的CD4+和CD8+T细胞激活,用编码CAR的载体转导,扩增,并通过低温保存进行冷冻。

[1277] 在示例性替代性过程中,通过包括从来自55名单独人癌症受试者的白细胞单采术样品中基于免疫亲和力选择T细胞的过程来产生治疗性T细胞组合物。将混合T细胞进行激活并用编码CAR的病毒载体转导,扩增和低温保存。

[1278] 将冷冻组合物中的细胞解冻,并通过流式细胞术评估其活力、凋亡标记(如活性半胱天冬酶3(CAS))的表达、CD3、CD4、CD8、CD27、CD28、CCR7和CD45RA和CAR的表面表达。确定了组合物中CD3+CAR+细胞中的CD3+细胞的百分比、CAR+凋亡标记阴性细胞的百分比、以及组合物中中枢记忆CD4+CAR+细胞的百分比和中枢记忆CD8+CAR+细胞的百分比。评估了通过所述制造过程产生的细胞组合物的细胞表型,并且在一些方面将其与通过替代性过程产生的细胞组合物的那些细胞表型进行比较。

[1279] 此实施例的制造过程导致经历所述制造过程的100%的人生物样品中满足某些预定特征的工程化细胞组合物,所述预定特征包括向患者给予的细胞组合物中的表达CAR的细胞的阈值数量。图6A和6B示出了对于由来自40名多发性骨髓瘤受试者的样品组单独产生的组合物,分别在所述组合物中的CD4+CAR+细胞中(图6A)和CD8+CAR+细胞中(图6B)具有所

指示表型(基于CD45RA和CCR7表面表达)的细胞的百分比的中值(水平线)、四分位距(框)和1.5x四分位距(须触线)。图6C和6D示出了对于由来自40名多发性骨髓瘤受试者的样品组单独产生的组合物,分别在所述组合物中的CD4+CAR+细胞中(图6A)和CD8+CAR+细胞中(图6B)具有指示表型(基于CD27和CD28表面表达)的细胞的百分比的中值(水平线)、四分位距(框)和1.5x四分位距(须触线)。对于从一系列多发性骨髓瘤患者中获得的个体白细胞单采术样品,使用此示例性过程从此类样品中产生工程化细胞组合物,观察到从激活开始到收获的过程部分的持续时间范围在7天与10天之间,并且这些样品之间的平均持续时间为大约7.5天。进一步确定,在不同样品之间,整个过程的历程中平均累积群体倍增数为大约7.5。

[1280] 在这项研究中,在通过示例性过程生产的细胞组合物中的工程化T细胞群包括小于15%的表达凋亡标记的细胞,并且如与起始样品和与使用示例性替代性过程产生的细胞组合物相比,其富集中枢记忆表型。

[1281] 实施例16:用于产生表达抗BCMA CAR的工程化T细胞的治疗组合物的过程。

[1282] 进行与实施例1中所述的过程相似的示例性过程,以生产含有表达抗BCMA嵌合抗原受体(CAR)的CD4+和CD8+T细胞的工程化组合物。原代CD4+和CD8+细胞来自人白细胞单采术样品(包括来自患有多发性骨髓瘤(MM)的受试者)的含PBMC的生物样品中富集。在进行刺激、转导和扩增步骤之前,将富集的CD4+和富集的CD8+细胞组合物分开低温冷冻,并且随后以1:1的活CD4+T细胞与活CD8+T细胞的比率混合。

[1283] 在含有重组IL-2、IL-7和IL-15的示例性无血清培养基(参见例如实施例3)中,以1:1的珠与细胞比率,在具有附接的抗CD3和抗CD28抗体的由顺磁性聚苯乙烯包被的珠的存在下,以约 3×10^6 个细胞/mL的密度将来自混合的细胞组合物的大约 300×10^6 个T细胞(例如 150×10^6 个CD4+和 150×10^6 个CD8+T细胞)孵育18与30小时之间。

[1284] 在孵育后,在具有细胞因子的示例性无血清培养基中,通过旋转接种60分钟用编码抗BCMACAR的慢病毒载体转导来自孵育的细胞组合物的至少大约 100×10^6 个和多达大约 200×10^6 个活细胞,随后在约37°C下孵育约18至30小时。CAR含有对BCMA具特异性的scFv抗原结合结构域、CD28跨膜区域、4-1BB共刺激信号传导区和CD3- ζ 来源的细胞内信号传导结构域。

[1285] 然后,通过在生物反应器(例如摇摆运动生物反应器)中的约500mL示例性无血清培养基中培育来扩增转导的细胞,所述无血清培养基含有两倍于在孵育和转导步骤期间所用的浓度的IL-2、IL-7和IL-15。培养基不含有泊洛沙姆。在认为实现大于或大于约 0.6×10^6 个细胞/mL的细胞密度之后,逐步添加培养基,定期(如在约2与约15分钟之间)添加新鲜培养基的注液至1000mL的体积,并且在稳定的摇摆条件下(非灌注)培育细胞直到实现大于或约 0.6×10^6 个细胞/mL的阈值活细胞密度。如果活细胞密度大于 0.8×10^6 个细胞/mL,则开始组合填充/灌注步骤,其中以如上所示的逐步方式添加第一培养基,直到目标体积为1000mL,然后按以下所解释的开始灌注。然后,通过伴随连续混合的半连续灌注替换培养基。在扩增阶段期间随着细胞密度增加将灌注速率和/或摇摆速度增加至少一倍。在扩增阶段期间随着细胞密度增加灌注速率增加至少一倍。以逐步的方式将培养基添加到培养物中,每天的总体积由活细胞密度决定(一旦达到某一密度,则以较高的速率),直至速率例如导致每天向培养物中添加大约750mL或1500mL的总新鲜培养基(当达到更高的细胞浓度时,

以更高的速率),在一天中定期(例如在约每0.5小时与约每1.5或2小时之间)添加新鲜培养基的注液。某一天在有核细胞(TNC)总数已经达到至少或至少大约 1000×10^6 个之后的时候以及在TNC数量已经达到至少或至少大约 2400×10^6 个总有核细胞的某个时间点时收获细胞,活力为至少85%。在收获后,将抗CD3和抗CD28抗体缀合的珠从细胞组合物中除去。

[1286] 然后配制细胞,并将组合物的等分试样转移到容器中,例如用于下游存储或使用。在一些实施方案中,将配制的组合物或其部分转移至适合于例如用于潜在地给予至受试者的细胞组合物的低温保存和存储的冷冻袋(如CryoStore冷冻袋)中,和/或将组合物或其部分转移至小瓶或其他容器中例如用于细胞的进一步分析。例如在适合于下游解冻和给予用途的条件下,将细胞低温冷冻。在一些情况下,将30mL体积的配制细胞用于单独的袋中。在一些情形中,将细胞以可变的总细胞浓度低温保存,例如,以允许在细胞用于给予的情境下每个剂量中有一致数量或浓度的CAR+T细胞。在一些实施方案中,目标CAR+CD3+细胞数量为每30mL或每袋有等于或大约所需数量(例如为或约 37.5×10^6 个)的CAR+CD3+细胞,这在一些实施方案中涉及由不同的供体或患者产生的组合物之间总细胞浓度的变化。

[1287] 对于从一系列多发性骨髓瘤患者中获得的个体白细胞单采术样品,已确定使用此示例性过程从此类样品中产生工程化细胞组合物会导致从激活开始到收获的过程部分的持续时间范围在5天与8天之间,并且这些样品之间的平均持续时间为5.5天。进一步确定,对于这组样品,在过程中的平均累积群体倍增数将为大约5。

[1288] 此实施例中的示例性过程用于从许多人多发性骨髓瘤白细胞单采术样品中产生工程化T细胞组合物。评估了各种参数,包括反映细胞表型、功能和细胞工程化的那些参数。观察到T细胞纯度、T细胞谱系代表、转导频率和功能基本上与使用如实施例1所述的过程用这些白细胞单采术产物产生的组合物的相似。观察到与实施例1中的示例性过程相比,使用此实施例中的示例性过程生产时群体倍增数和从激活开始到收获之间的平均持续天数减少。通常,与实施例1相比,在通过此实施例的示例性过程生产的工程化细胞组合物中观察到中枢记忆表型细胞的百分比相似或增加(和效应记忆表型细胞的百分比相似或减少)。

[1289] 本发明在范围上并不旨在限于具体公开的实施方案,所提供的实施方案例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授,对所述组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不背离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践此类变化,并且此类变化旨在落入本公开文本的范围内。

[1290] 综上所述,本发明包括但不限于以下各项:

[1291] 1.一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:

[1292] (a) 以在2:1与1:2之间的CD4+T细胞与CD8+T细胞的比率组合CD4+T细胞组合物和CD8+T细胞组合物,从而产生输入组合物;

[1293] (b) 在刺激条件下孵育所述输入组合物,从而产生刺激组合物,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;

[1294] 并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞。

[1295] 2.根据项1所述的方法,其中所述输入组合物中的CD4+和CD8+细胞被富集或选自

来自受试者的原代样品,任选地其中所述输入组合物中的CD4⁺和CD8⁺细胞被分开地富集或选自来自受试者的原代样品。

[1296] 3.根据项1或项2所述的方法,其中所述CD4⁺T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD4⁺T细胞。

[1297] 4.根据项1-3中任一项所述的方法,其中所述CD8⁺T细胞组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的CD8⁺T细胞。

[1298] 5.一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物,其中:

[1299] 所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞,并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞;并且

[1300] 所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[1301] 6.根据项1-5中任一项所述的方法,其中所述孵育是在无血清培养基中进行。

[1302] 7.根据项1-6中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的为CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞的细胞。

[1303] 8.根据项1-7中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在 100×10^6 个与 500×10^6 个之间的总CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[1304] 9.根据项1-8中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约 300×10^6 个总CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[1305] 10.根据项9所述的方法,其中所述总CD4⁺和CD8⁺T细胞是活细胞。

[1306] 11.根据项1-10中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在 1×10^6 个细胞/mL与 5×10^6 个细胞/mL之间的浓度。

[1307] 12.根据项1-11中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约 3×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1308] 13.根据项1-12中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。

[1309] 14.根据项1-13中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。

[1310] 15.根据项1-14中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含为或约1:1的比率的CD4⁺与CD8⁺细胞。

[1311] 16.根据项1-15中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺。

[1312] 17.根据项16所述的方法,其中呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.1:1。

[1313] 18.根据项1-17中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[1314] 19.根据项18所述的方法,其中呈CD27和CCR7表面阳性的CD4⁺细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的CD8⁺细胞的比率为或为约1.69:1。

[1315] 20. 根据项1-19中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含任选地在2.0:1至1.5:1之间的比率的呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4⁺和CD8⁺细胞。

[1316] 21. 根据项1-20中任一项所述的方法,其还包括:

[1317] 将重组受体引入来自所述刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括使所述刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷酸的药剂接触。

[1318] 22. 根据项21所述的方法,其中:

[1319] 所述接触是通过用载体转染进行,其中所述载体是转座子,任选地睡美人(SB)转座子或Piggybac转座子;或者

[1320] 所述接触是通过病毒载体转导进行。

[1321] 23. 根据项1-22中任一项所述的方法,其还包括:

[1322] 将重组受体引入来自所述刺激组合物的细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导所述刺激组合物的细胞。

[1323] 24. 根据项21-23中任一项所述的方法,其中所述引入是在无血清培养基中进行。

[1324] 25. 根据项21-24中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含少于 300×10^6 个细胞。

[1325] 26. 根据项21-25中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含在 50×10^6 个与 200×10^6 个之间的细胞,任选地约 100×10^6 个细胞,例如约 100×10^6 个CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[1326] 27. 根据项21-25中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含至少约 100×10^6 个和至多约 200×10^6 个之间的细胞,例如至少约 100×10^6 个细胞和至多约 200×10^6 个CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[1327] 28. 根据项21-27中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1328] 29. 根据项21-28中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含在 0.5×10^6 个细胞/mL与 2×10^6 个细胞/mL之间的浓度。

[1329] 30. 根据项21-29中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含为或约 1×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1330] 31. 根据项21-30中任一项所述的方法,其包括在将所述重组受体引入所述刺激组合物的细胞中之前,在刺激条件下孵育之后,调节所述刺激组合物的组成。

[1331] 32. 根据项21-31中任一项所述的方法,其中所述刺激组合物的细胞是活细胞。

[1332] 33. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括将重组受体引入T细胞组合物的细胞中,所述T细胞组合物包含至少或约至少 1×10^6 个活细胞/mL的浓度,其中所述T细胞组合物的细胞的至少80%、至少85%、至少90%或至少95%是CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞。

[1333] 34. 根据项33所述的方法,其中所述T细胞组合物的浓度为少于 5×10^6 个活细胞/mL。

[1334] 35. 根据项33或34中任一项所述的方法,其中所述T细胞组合物包含至少或至少约

或约 100×10^6 个活细胞,或其中所述T细胞组合物包含至少约 100×10^6 个活细胞和至多约 200×10^6 个活细胞。

[1335] 36.根据项33-35中任一项所述的方法,其中所述T细胞组合物包含少于 300×10^6 个活细胞。

[1336] 37.根据项33-36中任一项所述的方法,其中所述引入包括通过转导包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体来接触所述T细胞。

[1337] 38.根据项33-37中任一项所述的方法,其中所述引入是在无血清培养基中进行。

[1338] 39.根据项33-38中任一项所述的方法,其中所述T细胞组合物中的一种或多种细胞被激活和/或包含LDL受体的表面表达。

[1339] 40.根据项33-39中任一项所述的方法,其中所述细胞组合物中的细胞的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%:

[1340] (i) 表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;

[1341] (ii) 包含选自IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的细胞因子的细胞内表达;

[1342] (iii) 处于细胞周期的G1期或较后期;和/或

[1343] (iv) 能够增殖。

[1344] 41.根据项33-40中任一项所述的方法,其中在所述引入之前,通过包括在刺激条件下孵育包含CD4+和CD8+T细胞的输入组合物的过程来产生所述组合物的细胞,其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域。

[1345] 42.根据项41所述的方法,其中所述孵育是在无血清培养基中进行,任选地所述引入是在与用于所述孵育的无血清培养基相同或不同组成的无血清培养基中进行。

[1346] 43.一种用于生产工程化细胞组合物的方法,所述方法包括:

[1347] (a) 在刺激条件下孵育输入组合物,从而产生刺激组合物,其中:

[1348] 所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4+与CD8+T细胞,并且包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个CD4+和CD8+T细胞;并且

[1349] 所述刺激条件包括刺激试剂的存在,所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;并且

[1350] (b) 将重组受体引入所述刺激组合物的少于 300×10^6 个细胞中,从而产生工程化细胞组合物,其中所述引入包括使所述刺激组合物的细胞与包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体接触。

[1351] 44.根据项43所述的方法,其中所述孵育和/或所述引入是在无血清培养基中进行。

[1352] 45.根据项43或44中任一项所述的方法,其中所述CD4+和CD8+T细胞是活细胞。

[1353] 46.根据项44所述的方法,其中来自所述刺激组合物的所述细胞是活细胞。

[1354] 47.根据项33-46中任一项所述的方法,其中所述引入是在刺激条件下孵育开始之后的2天内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的2天内开始。

[1355] 48. 根据项33-47中任一项所述的方法, 其中所述引入是在刺激条件下孵育开始之后的36小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的36小时内开始。

[1356] 49. 根据项33-48中任一项所述的方法, 其中所述引入是在刺激条件下孵育开始之后的30小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的30小时内开始。

[1357] 50. 根据项33-49中任一项所述的方法, 其还包括在促进所述工程化细胞的增殖和/或扩增的条件下培育所述工程化组合物, 从而生产包含所述工程化T细胞的输出组合物。

[1358] 51. 根据项50所述的方法, 其中所述培育是在无血清培养基中进行。

[1359] 52. 一种用于生产工程化细胞组合物的方法, 所述方法包括:

[1360] (a) 在刺激条件下孵育输入组合物, 从而产生刺激组合物; 其中所述输入组合物包含在2:1与1:2之间的比率的CD4+与CD8+T细胞, 并且其中所述输入组合物包含浓度小于 5×10^6 个细胞/mL的至少 100×10^6 个总CD4+和CD8+T细胞; 并且其中所述刺激条件包括刺激试剂的存在, 所述刺激试剂能够激活TCR复合物的一种或多种组分的一个或多个细胞内信号传导结构域和/或一种或多种共刺激分子的一个或多个细胞内信号传导结构域;

[1361] (b) 将重组受体引入来自所述刺激组合物的少于 300×10^6 个细胞中, 从而产生工程化细胞组合物, 其中所述引入包括用包含编码所述重组受体的多核苷酸的病毒载体转导所述刺激组合物的细胞。

[1362] (c) 在促进所述工程化细胞的增殖和/或扩增的条件下培育所述工程化组合物, 从而生产包含所述工程化T细胞的输出组合物。

[1363] 53. 根据项52所述的方法, 其中在无血清培养基中或在无血清培养基中进行所述孵育、引入和培育步骤中的一个、两个或所有, 任选地其中所述无血清培养基具有相同的组成或不同的组成。

[1364] 54. 根据项41-53所述的方法, 其中所述输入组合物包含在1.5:1与1:1.5之间的比率的CD4+与CD8+细胞、在1.2:1与0.8:1之间的比率的CD4+与CD8+细胞, 任选地为或约1:1的比率的CD4+与CD8+T细胞。

[1365] 55. 根据项41-54中任一项所述的方法, 其中所述输入组合物包含呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4+和CD8+。

[1366] 56. 根据项55所述的方法, 其中呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD4+细胞与呈CD45RA和CCR7表面阳性的CD8+细胞的比率为或为约1.1:1。

[1367] 57. 根据项41-56中任一项所述的方法, 其中所述输入组合物包含呈CD27和CCR7表面阳性的CD4+和CD8+细胞。

[1368] 58. 根据项57所述的方法, 其中呈CD27和CCR7表面阳性的CD4+细胞与呈CD27和CCR7表面阳性的CD8+细胞的比率为或为约1.69:1。

[1369] 59. 根据项41-58中任一项所述的方法, 其中所述输入组合物包含呈CCR7表面阳性且呈CD62L表面阴性的CD4+和CD8+细胞。

[1370] 60. 根据项43-59中任一项所述的方法, 其中, 对于所述引入, 所述刺激组合物包含少于 300×10^6 个, 任选地在 50×10^6 个与 200×10^6 个之间的活细胞, 以及任选地为或约 100×10^6 个。

106个活细胞。

[1371] 61. 根据项43-59中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含至少约 100×10^6 个活细胞和至多约 200×10^6 个活细胞。

[1372] 62. 根据项43-61中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含小于 3×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1373] 63. 根据项43-62中任一项所述的方法,其中,对于所述引入,所述刺激组合物包含在 0.5×10^6 个细胞/mL与 2×10^6 个细胞/mL之间的浓度,任选地为或约 1×10^6 个细胞/mL的浓度。

[1374] 64. 根据项43-63中任一项所述的方法,其在将所述重组受体引入所述刺激组合物的细胞中之前,在刺激条件下孵育之后,调节所述刺激组合物的组成。

[1375] 65. 根据项1-64中任一项所述的方法,其中所述孵育是在一种或多种细胞因子的存在下任选地在无血清培养基中进行。

[1376] 66. 根据项65所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15。

[1377] 67. 根据项66所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1378] 68. 根据项66或67所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。

[1379] 69. 根据项1-68中任一项所述的方法,其中所述刺激组合物中的细胞的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%或至少60%:

[1380] (i) 表达选自HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和4-1BB的表面标记;

[1381] (ii) 包含选自IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的细胞因子的细胞内表达;

[1382] (iii) 处于细胞周期的G1期或较后期;和/或

[1383] (iv) 能够增殖。

[1384] 70. 根据项1-69中任一项所述的方法,其中所述刺激试剂包含与TCR复合物的成员特异性地结合、任选地与CD3特异性地结合的一级药剂。

[1385] 71. 根据项70所述的方法,其中所述刺激试剂还包含与T细胞共刺激分子特异性地结合的二级药剂,任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

[1386] 72. 根据项70或项71所述的方法,其中所述一级和/或二级药剂包含抗体,任选地其中所述刺激试剂包括与抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段一起孵育。

[1387] 73. 根据项71-72中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和/或二级药剂存在于固体支持物的表面上。

[1388] 74. 根据项73所述的方法,其中所述固体支持物是或包含珠。

[1389] 75. 根据项74所述的方法,其中所述珠的直径大于或大于约 $3.5 \mu\text{m}$,但是不大于约 $9 \mu\text{m}$ 或不大于约 $8 \mu\text{m}$ 或不大于约 $7 \mu\text{m}$ 或不大于约 $6 \mu\text{m}$ 或不大于约 $5 \mu\text{m}$ 。

[1390] 76. 根据项74或项75所述的方法,其中所述珠的直径为或为约 $4.5 \mu\text{m}$ 。

[1391] 77. 根据项74-76中任一项所述的方法,其中所述珠是惰性的。

- [1392] 78. 根据项74-77中任一项所述的方法,其中所述珠是或包含聚苯乙烯表面。
- [1393] 79. 根据项74-78中任一项所述的方法,其中所述珠是磁性的或超顺磁性的。
- [1394] 80. 根据项74-79中任一项所述的方法,其中珠与细胞的比率为小于3:1。
- [1395] 81. 根据项74-80中任一项所述的方法,其中珠与细胞的比率为从或从约2:1至0.5:1,任选地珠与细胞的比率为或为约1:1。
- [1396] 82. 根据项71-72中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚颗粒试剂的表面上。
- [1397] 83. 根据项1-82中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育少于48小时。
- [1398] 84. 根据项1-83中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育持续12小时与36小时之间,包含端值。
- [1399] 85. 根据项1-84中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育持续18小时与30小时之间,包含端值。
- [1400] 86. 根据项1-85中任一项所述的方法,其中将所述输入组合物在刺激条件下孵育,持续或持续约24小时。
- [1401] 87. 根据项23-86中任一项所述的方法,其中将所述接触、任选地转导进行少于48小时。
- [1402] 88. 根据项23-87中任一项所述的方法,其中将所述接触、任选地转导进行持续12小时与36小时之间,包含端值。
- [1403] 89. 根据项23-88中任一项所述的方法,其中将所述接触、任选地转导进行持续18小时与30小时之间,包含端值。
- [1404] 90. 根据项23-89中任一项所述的方法,其中将所述接触、任选地转导进行或进行约24小时。
- [1405] 91. 根据项23-90中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
- [1406] 92. 根据项23-91中任一项所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。
- [1407] 93. 根据项23-92中任一项所述的方法,其中所述接触、任选地转导是在不存在转导佐剂的情况下进行。
- [1408] 94. 根据项23-93中任一项所述的方法,其中所述引入是在一种或多种细胞因子的存在下任选地在无血清培养基中进行。
- [1409] 95. 根据项94所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15。
- [1410] 96. 根据项94或95所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和/或在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。
- [1411] 97. 根据项94-96中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包含:在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-2;在100IU/mL与1,000IU/mL之间的重组IL-7;和在10IU/mL与200IU/mL之间的重组IL-15。
- [1412] 98. 根据项50-97中任一项所述的方法,其中所述培育的至少一部分是伴随混合

和/或灌注进行的。

[1413] 99. 根据项98所述的方法, 其中所述培育的至少一部分是伴随为、约、或至少500mL/天、600mL/天、700mL/天、750mL/天、800mL/天、900mL/天、1,000mL/天、1,200mL/天、1,400mL/天、1,500mL/天、1,600mL/天、1,800mL/天、和/或2,000mL/天的速率下的灌注进行的。

[1414] 100. 根据项98或99所述的方法, 其中所述培育的至少第一部分是在为、约、或至少500mL/天、750mL/天、或1,000mL/天的灌注速率下进行的, 并且其中所述培育的至少第二部分是在为、约、或至少1,200mL/天、1,400mL/天、或1,500mL/天的灌注速率下进行的。

[1415] 101. 根据项98-100中任一项所述的方法, 其中当所述细胞达到特定密度时, 开始和/或增加所述灌注。

[1416] 102. 根据项101所述的方法, 其中所述特定密度为、为约或为至少 0.4×10^6 个细胞、 0.5×10^6 个细胞、 0.6×10^6 个细胞、 0.8×10^6 个细胞、 1.0×10^6 个细胞、 1.2×10^6 个细胞、 1.4×10^6 个细胞、 1.6×10^6 个细胞、 1.8×10^6 个细胞、 2.0×10^6 个细胞、 2.2×10^6 个细胞、或 2.4×10^6 个细胞。

[1417] 103. 根据项98-102中任一项所述的方法, 其中当所述细胞达到为或为约 0.6×10^6 个细胞/mL的密度时, 开始和/或增加所述灌注至为或为约750mL/天的速率。

[1418] 104. 根据项98所述的方法, 其中当所述细胞达到为或为约 2.0×10^6 个细胞/mL的密度时, 开始和/或增加所述灌注至为或为约1500mL/天的速率。

[1419] 105. 根据项50-104中任一项所述的方法, 其中所述培育是在一种或多种细胞因子的存在下任选地在无血清培养基中进行。

[1420] 106. 根据项105所述的方法, 其中所述一种或多种细胞因子选自重组IL-2、重组IL-7和/或重组IL-15。

[1421] 107. 根据项105或106所述的方法, 其中所述一种或多种细胞因子包含: 在50IU/mL与400IU/mL之间的重组IL-2; 在100IU/mL与2,000IU/mL之间的重组IL-7; 和/或在50IU/mL与400IU/mL之间的重组IL-15。

[1422] 108. 根据项105-107中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种细胞因子包含: 在50IU/mL与400IU/mL之间的重组IL-2; 在100IU/mL与2,000IU/mL之间的重组IL-7; 和在50IU/mL与400IU/mL之间的重组IL-15。

[1423] 109. 根据项50-108中任一项所述的方法, 其中所述培育是在刺激条件下孵育开始之后的3天内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的3天内开始。

[1424] 110. 根据项50-109中任一项所述的方法, 其中所述培育是在刺激条件下孵育开始之后的60小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的60小时内开始。

[1425] 111. 根据项50-110中任一项所述的方法, 其中所述培育是在刺激条件下孵育开始之后的48小时内和/或在将所述输入组合物的所述CD4+T细胞和所述CD8+T细胞组合之后的48小时内开始。

[1426] 112. 根据项50-111中任一项所述的方法, 其中进行所述培育至少直到所述组合物包含阈值数量的T细胞、阈值数量的活T细胞、阈值浓度的T细胞、阈值浓度的活T细胞。

[1427] 113.根据项112所述的方法,其中所述阈值数量的T细胞或阈值数量的活T细胞为、为约或为至少 2400×10^6 个或 5500×10^6 个总数量的有核细胞,可选地其中所述总数量的有核细胞的活力是约或至少约75%或约或至少约85%。

[1428] 114.根据项112所述的方法,其中将所述培育继续进行达到所述阈值数量的T细胞、阈值数量的活T细胞、阈值浓度的T细胞、阈值浓度的活T细胞之后的至少一天,任选地其中所述阈值数量的T细胞或阈值数量的活T细胞为、为约或为至少 900×10^6 、 1200×10^6 、或 3500×10^6 个总数量的有核细胞。

[1429] 115.根据项50-114中任一项所述的方法,其中所述阈值数量的T细胞是为或约 2400×10^6 个总数量的具有约或至少约85%活力的有核细胞。

[1430] 116.根据项50-114中任一项所述的方法,其中所述阈值数量的T细胞是或是约 5500×10^6 个总数量的有核细胞。

[1431] 117.根据项50-116中任一项所述的方法,其包括在所述培育后收集所述输出组合物的细胞。

[1432] 118.根据项50-117所述的方法,其包括在所述培育后收集所述输出组合物的细胞,其中在刺激条件下孵育开始之后至少9天收集所述输出组合物的细胞。

[1433] 119.根据项50-118所述的方法,其包括在所述培育后收集所述输出组合物的细胞,其中在刺激条件下孵育开始之后至少10天收集所述输出组合物的细胞。

[1434] 120.根据项118或119所述的方法,其包括在8天至25天内、任选地在14-18天之间的在开始孵育与收集所述输出组合物的细胞之间的时间量的95%置信区间。

[1435] 121.根据项118或119所述的方法,其包括在9天至21天内的在开始孵育与收集所述输出组合物的细胞之间的时间量的95%置信区间。

[1436] 122.根据项118或119所述的方法,其包括在9天至16天内的在开始孵育与收集所述输出组合物的细胞之间的时间量的95%置信区间。

[1437] 123.根据项52-122中任一项所述的方法,其还包括任选地在药学上可接受的赋形剂的存在下配制所述输出组合物的细胞以便低温保存和/或给予至受试者。

[1438] 124.根据项123所述的方法,其中在低温保护剂的存在下配制所述输出组合物的细胞。

[1439] 125.根据项124所述的方法,其中所述低温保护剂包含DMSO。

[1440] 126.根据项122-125中任一项所述的方法,其中将所述输出组合物的细胞配制在容器中,任选地小瓶或袋中。

[1441] 127.根据项1-126中任一项所述的方法,其还包括在所述孵育之前从生物样品中分离所述CD4+T细胞和/或所述CD8+T细胞。

[1442] 128.根据项127所述的方法,其中所述分离包括基于CD4和/或CD8的表面表达,任选地通过阳性或阴性选择来选择细胞。

[1443] 129.根据项127或项128所述的方法,其中所述分离包括进行基于免疫亲和力的选择。

[1444] 130.根据项127-129中任一项所述的方法,其中所述生物样品包含从受试者获得的原代T细胞。

[1445] 131.根据项130所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

[1446] 132. 根据项127-131中任一项所述的方法, 其中所述生物样品是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。

[1447] 133. 根据项1-132中任一项所述的方法, 其中所述重组受体能够与靶抗原结合, 所述靶抗原与疾病、障碍或病症的细胞或组织相关, 为疾病、障碍或病症的细胞或组织所特有, 和/或在疾病、障碍或病症的细胞或组织上表达。

[1448] 134. 根据项133所述的方法, 其中所述疾病、障碍或病症是感染性疾病或障碍、自身免疫性疾病、炎性疾病、或者肿瘤或癌症。

[1449] 135. 根据项133或134所述的方法, 其中所述靶抗原是肿瘤抗原。

[1450] 136. 根据项133-135中任一项所述的方法, 其中所述靶抗原选自5T4、8H9、avb6整合素、B7-H6、B细胞成熟抗原(BCMA)、CA9、癌症-睾丸抗原、碳酸酐酶9(CAIX)、CCL-1、CD19、CD20、CD22、CEA、乙型肝炎表面抗原、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、癌胚抗原(CEA)、CE7、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、c-Met、双重抗原、EGFR、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、EPHa2、肝配蛋白B2、erb-B2、erb-B3、erb-B4、erbB二聚体、EGFR vIII、雌激素受体、胎儿AchR、叶酸受体 α 、叶酸结合蛋白(FBP)、FCRL5、FCRH5、胎儿乙酰胆碱受体、G250/CAIX、GD2、GD3、gp100、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体C型家族5D(GPRC5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13受体 α 2(IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、路易斯Y、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MART-1、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、鼠CMV、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、NCAM、NKG2D、NKG2D配体、NY-ESO-1、O-乙酰化GD2(OGD2)、癌胚抗原、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)、PSCA、孕酮受体、存活蛋白、ROR1、TAG72、酪氨酸酶相关蛋白1(TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2(TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、VEGF受体、VEGF-R2、Wilms肿瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原以及与通用标签相关的抗原。

[1451] 137. 根据项1-136中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是或包含功能性非TCR抗原受体或TCR或其抗原结合片段。

[1452] 138. 根据项1-137中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[1453] 139. 根据项1-138中任一项所述的方法, 其中所述重组受体是抗BCMA CAR。

[1454] 140. 根据项138或139所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体包含含有抗原结合结构域的细胞外结构域。

[1455] 141. 根据项140所述的方法, 其中所述抗原结合结构域是或包含抗体或其抗体片段, 所述抗体片段任选地是单链片段。

[1456] 142. 根据项141所述的方法, 其中所述片段包含通过柔性接头连接的抗体可变区。

[1457] 143. 根据项141或项142所述的方法, 其中所述片段包含scFv。

[1458] 144. 根据项138-143中任一项所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体还包含间隔子和/或铰链区。

[1459] 145. 根据项138-144中任一项所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体包含细胞内信

号传导区。

[1460] 146. 根据项145所述的方法, 其中所述细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。

[1461] 147. 根据项146所述的方法, 其中所述细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体 (TCR) 组分的信号传导结构域和/或包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 的信号传导结构域。

[1462] 148. 根据项146或147所述的方法, 其中所述细胞内信号传导结构域是或包含CD3链任选地CD3-zeta (CD3 ζ) 链的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[1463] 149. 根据项145-148中任一项所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体还包含设置在所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导区之间的跨膜结构域。

[1464] 150. 根据项145-149中任一项所述的方法, 其中所述细胞内信号传导区还包含共刺激信号传导区。

[1465] 151. 根据项150所述的方法, 其中所述共刺激信号传导区包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[1466] 152. 根据项150或项151所述的方法, 其中所述共刺激信号传导区包含CD28、4-1BB或ICOS的细胞内信号传导结构域或其信号传导部分。

[1467] 153. 根据项150-152中任一项所述的方法, 其中所述共刺激信号传导区位于所述跨膜结构域与所述细胞内信号传导区之间。

[1468] 154. 根据项113-153中任一项所述的方法, 其中在所述方法的大于或大于约85%、大于或大于约90%、或者大于或大于约95%的迭代中生产出包含所述阈值数量或更多数量的细胞的输出组合物。

[1469] 155. 根据项1-154中任一项所述的方法, 其中所述无血清培养基包含:

[1470] 0.5mM至5mM的在基础培养基中的二肽形式的L-谷氨酰胺;

[1471] 0.5mM至5mM L-谷氨酰胺; 和

[1472] 至少一种蛋白质, 其中所述培养基不含血清。

[1473] 156. 根据项155所述的方法, 其中所述二肽形式的L-谷氨酰胺是L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[1474] 157. 根据项155或项156所述的方法, 其中在所述无血清培养基中所述二肽形式的L-谷氨酰胺的浓度为或为约2mM。

[1475] 158. 根据项155-157中任一项所述的方法, 其中在所述无血清培养基中L-谷氨酰胺的浓度为或为约2mM。

[1476] 159. 根据项155-158中任一项所述的方法, 其中所述至少一种蛋白质包含白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种, 任选地人或重组白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种。

[1477] 160. 一种组合物, 其包含通过根据项1-159或165-177中任一项所述的方法生产的工程化细胞。

[1478] 161. 根据项160所述的组合物, 其还包含药学上可接受的载体。

[1479] 162. 根据项160或项161所述的组合物, 其包含低温保护剂, 任选地DMSO。

[1480] 163. 一种制品, 其包含根据项160-162中任一项所述的组合物, 以及用于将所述输

出组合物给予至受试者的说明书。

[1481] 164. 根据项163所述的制品,其中所述受试者患有疾病或病症,任选地其中所述重组受体特异性地识别或特异性地结合至与所述疾病或病症相关或在所述疾病或病症的细胞上表达或存在的抗原。

[1482] 165. 根据项55-159中任一项所述的方法,其中在所述培育的至少一部分期间,监测所述细胞的细胞活力、浓度、密度、数量或其组合。

[1483] 166. 根据项165所述的方法,其中通过光学方法,任选地显微术来进行所述监测。

[1484] 167. 根据项165或项166所述的方法,其中通过明视野显微术、荧光显微术、微分干涉差显微术、相差显微术、数字全息显微术(DHM)、差分数字全息显微术(DDHM)或其组合来进行所述监测。

[1485] 168. 根据项165-167中任一项所述的方法,其中通过差分数字全息显微术(DDHM)来进行所述监测。

[1486] 169. 根据项165-168中任一项所述的方法,其中在所述培育的至少一部分期间,间歇地或连续地进行所述监测,任选地在所述培育期间至少每1小时、6小时、12小时、18小时、24小时或26小时进行一次。

[1487] 170. 根据项165-169中任一项所述的方法,其中进行所述监测直到所述细胞达到T细胞的阈值数量、活T细胞的阈值数量、T细胞的阈值浓度或活T细胞的阈值浓度。

[1488] 171. 根据项165-170中任一项所述的方法,其中所述监测和培育是在封闭系统中进行。

[1489] 172. 根据项50-159和165-171中任一项所述的方法,其中:

[1490] 所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有记忆表型;

[1491] 其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有中枢记忆表型;

[1492] 其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA-、CD45RO+、CD62L+、CD3+、CD95+、颗粒酶B-、和/或CD127+;和/或

[1493] 其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CCR7+/CD45RA-或呈CCR7+/CD45RO+。

[1494] 173. 根据项50-159和165-172中任一项所述的方法,其中所述方法的迭代生产出多种所述输出组合物,任选地从人生物样品中生产出,其中所述方法在多名不同的个体受试者中进行,其中:

[1495] 在所述多种所述输出组合物中的具有记忆表型的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1496] 在所述多种所述输出组合物中的具有中枢记忆表型的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间;

[1497] 在所述多种所述输出组合物中的为CD27+、CD28+、CCR7+、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L⁺、CD3⁺、CD95⁺、颗粒酶B⁻和/或CD127⁺的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间；

[1498] 在所述多种所述输出组合物中的为CCR7+/CD45RA⁻或CCR7+/CD45RO⁺的细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间；

[1499] 在所述多种所述输出组合物中的所述工程化CD4⁺T细胞、任选地CAR+CD4⁺T细胞中的中枢记忆CD4⁺T细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间；

[1500] 在所述多种所述输出组合物中的所述工程化CD8⁺T细胞、任选地CAR+CD8⁺T细胞中的中枢记忆CD8⁺T细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间；和/或

[1501] 在所述多种所述输出组合物中的所述工程化T细胞、任选地CAR+T细胞中的中枢记忆T细胞，任选地CD4⁺中枢记忆T细胞和CD8⁺中枢记忆T细胞的平均百分比在约40%与约65%之间、在约40%与约45%之间、在约45%与约50%之间、在约50%与约55%之间、在约55%与约60%之间、或在约60%与约65%之间。

[1502] 174. 根据项1-159和165-173中任一项所述的方法，其中所述方法生产出在至少约80%、约90%、约95%、约97%、约99%、约100%、或100%的所述人生物样品中展现出预定特征的输出组合物，所述预定特征任选地为在所述输出组合物中表达所述CAR的细胞的阈值数量，其中所述方法在多名不同的个体受试者中进行。

[1503] 175. 根据项174所述的方法，其中所述多名不同的个体受试者包括患有疾病或病症的受试者。

[1504] 176. 根据项175所述的方法，其中所述疾病或病症是癌症。

[1505] 177. 根据项176所述的方法，其中所述癌症是血液癌症，任选地多发性骨髓瘤。

[1506] 178. 根据项160所述的组合物，其中：

[1507] 所述组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有记忆表型；

[1508] 其中所述组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%具有中枢记忆表型；

[1509] 其中所述组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CD27⁺、CD28⁺、CCR7⁺、CD45RA⁻、CD45RO⁺、CD62L⁺、CD3⁺、颗粒酶B⁻、和/或CD127⁺；和/或

[1510] 其中所述输出组合物中的细胞的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或大于95%呈CCR7+/CD45RA⁻或呈CCR7+/CD45RO⁺。

[1511] 序列

#	序列	注释
1	ESKYGPPCPPCP	间隔子 (IgG4 铰链) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	间隔子 (IgG4 铰链) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰链-C _H 3 间隔子
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰链-C _H 2-C _H 3 间隔子
5	RWPESPQAQASSVPTAQPPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARRPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-铰链-Fc
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的氨基酸 153-179)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的氨基酸 114-179)
10	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747 的氨基酸 180-220)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL 至 GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的氨基酸 214-255)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ

[1512]

14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGDLGY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHGDLGY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ
16	RKVCNGIGIGIEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILPVAFRG DSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENL EIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKN LCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE GCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQC HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIAT GMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG- (SGGGG) 5-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸并且S是 丝氨酸	接头
23	GSADDAKKDAAKKDGS	接头
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacac ccagcattcctcctgatccca	GMCSFR α 链 信号序列
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR α 链 信号序列
26	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 α 信号肽
27	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCASGYTFIDYYVYWMRQAPGQGL ESMGWINPNSSGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELSRLRSD TAMYYCARSQRDGYMDYWGQGTLVTVSS	可变重链 (V _H) 抗BCMA
28	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAPKLMY EDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSNTRS STLVFGGGTKLTVLG	可变轻链 (V _H) 抗BCMA
29	ESKYGPCCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS LGK	铰链 -C _H 2-C _H 3 间隔子 智人 (Homo sapiens)
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSINWVKRAPGKGL KWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYED TATYFCALDYSYAMDYWGQTSVTVSS	可变重链 (V _H) 抗BCMA
31	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPG QPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEEDDVAVY YCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK	可变轻链 (V _H) 抗BCMA
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFNFGMNWVKQAPGKGF KMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATTAYLQINNLTED TATYFCARGEIYYGYDGGFAYWGQGLTVTVSA	可变重链 (V _H) 抗BCMA
33	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQKPGQSPK LLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYYCQQ HYSTPWTFGGGTKLDIK	可变轻链 (V _H) 抗BCMA

[1513]

34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARYSGSFDNWGQGT LVT VSS	可变重链 (V _H) 抗BCMA
35	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWYQQLPGTAP KLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA AWDGS LNLGLVFGGGTKLTVLG	可变轻链 (V _H) 抗BCMA
36	GGGGS	接头
37	GGGS	接头
38	GGGSGGGSGGGGS	接头
39	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头
40	SRGGGSGGGSGGGGSLEMA	接头
41	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCARSGYSKSI VSYMDYWGQGT LVT VSS	可变重链 (V _H) 抗BCMA
42	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSNVFWYQQLPGTAP KLVIYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG	可变轻链 (V _H) 抗BCMA
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGRIIPILGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSGYGSYRWEDSWGQGT LVT VSS	可变重链 (V _H) 抗BCMA
44	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYFWYQQLPGTAP KLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSASYVFGTGTKVTVLG	可变轻链 (V _H) 抗BCMA
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYYMHVWRQAPGQRL EWMGWINPNSGGTNYA QKFQDRITVTRDTSSNTGYMELTRLRSD TAVYYCARSPYSGVLDKKGQGT LVT VSS	可变重链 (V _H) 抗BCMA
46	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTA PKLLIYGNNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC QSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLG	可变轻链 (V _H) 抗BCMA
47	RASQDISKYN	CDR L1
48	SRLHSGV	CDR L2
49	GNTLPYTFG	CDR L3
50	DYGVS	CDR H1
51	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
52	YAMDYWG	CDR H3
53	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	V _H
54	DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEIT	V _L
55	DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE TTYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	scFv
56	KASQNVGTNVA	CDR L1
57	SATYRNS	CDR L2
58	QQYNRYPYT	CDR L3
59	SYWMN	CDR H1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2

[1514]

61	KTISSVVDIFYFDY	CDR H3
62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGL EWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSED SAVYFCARKTIISSVVDIFYFDYWGGQTTVTVSS	V _H
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPK PLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQ YNRYPYTSGGGTKLEIKR	V _L
64	GGGSGGGSGGGGS	接头
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGL EWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSED SAVYFCARKTIISSVVDIFYFDYWGGQTTVTVSSGGGSGGGSGGG GSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQS PKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFC QQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
67	HTSRLHS	LC-CDR2
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3
69	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctg ggcgaccgggtgaccatcagctgccgggcccagccaggacatcagc aagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcacccgtcaag ctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagc cgggttagcgccagcggctccggcaccgactacagcctgaccatc tccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttgccagcag ggcaacacactgccctacacctttggcgccggaacaaagctggaa atcacccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgag ggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggc ctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagc ggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccc cccaggaagggcctggaatggctggcgctgatctggggcagcgag accacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatc aaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctg cagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactac tacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagc gtgaccgtgagcagc	编码 scFv 的序列
70	X1PPX2P X1是甘氨酸、半胱氨酸或精氨酸 X2是半胱氨酸或苏氨酸	铰链
71	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头
72	DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYES AVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKP SAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	链霉亲和素 物种:阿维丁链 霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>) UniProt 编号 P22629
73	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTG RYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEAR INTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小链霉亲和 素 物种:阿维丁链 霉菌
74	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY IGARG NAESRYVLTG RYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEAR	突变蛋白链霉

[1515]

	INTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种:阿维丁链霉菌
75	WSHPQFEK	Strep-标签® II
76	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQFEK	双-Strep-标签
77	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQFEK	双-Strep-标签
78	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	双-Strep-标签
79	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY IG ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉菌亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种:阿维丁链霉菌
80	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	链霉菌亲和素结合肽 Xaa 是任何氨基酸; Yaa 是 Gly 或 Glu Zaa 是 Gly、Lys 或 Arg
81	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	链霉菌亲和素结合肽, Strep-标签®
82	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	链霉菌亲和素结合肽的顺序模块 Xaa 是任何氨基酸; n 是 8 或 12
83	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	链霉菌亲和素结合肽的顺序模块 n 是 2 或 3
84	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHQFEK	双-Strep-标签
85	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	双-Strep-标签
86	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY VT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉菌亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种:阿维丁链霉菌
87	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY VT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉菌亲和素 Val44-Thr45-A

[1516]

		la46-Arg47 物种:阿维丁链霉菌
88	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YVT ARGNAESRYVLT GRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGA EARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种:阿维丁链霉菌
89	His-Pro-Gln-Phe	链霉亲和素结合肽
90	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	链霉亲和素结合肽 Oaa是Trp、Lys或Arg; Xaa是任何氨基酸; Yaa 是 Gly 或 Glu; Zaa是Gly、Lys或Arg
91	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YIG ARG NAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKP SAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47 物种:阿维丁链霉菌
92	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YVT ARGNAESRYVLTG RYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGA EARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 和 Glu117、 Gly120、Try121 (突变蛋白 ml-9) 物种:阿维丁链霉菌
93	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTF IVT AGADGALTGT YVT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSAT TWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKP SAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 和 Glu117、 Gly120、Try121 (突变蛋白 ml-9) 物种:阿维丁链霉菌
94	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YES AVGNAESRYVLT GRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGA EARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小链霉亲和素

[1517]

		物种:阿维丁链霉菌
--	--	-----------

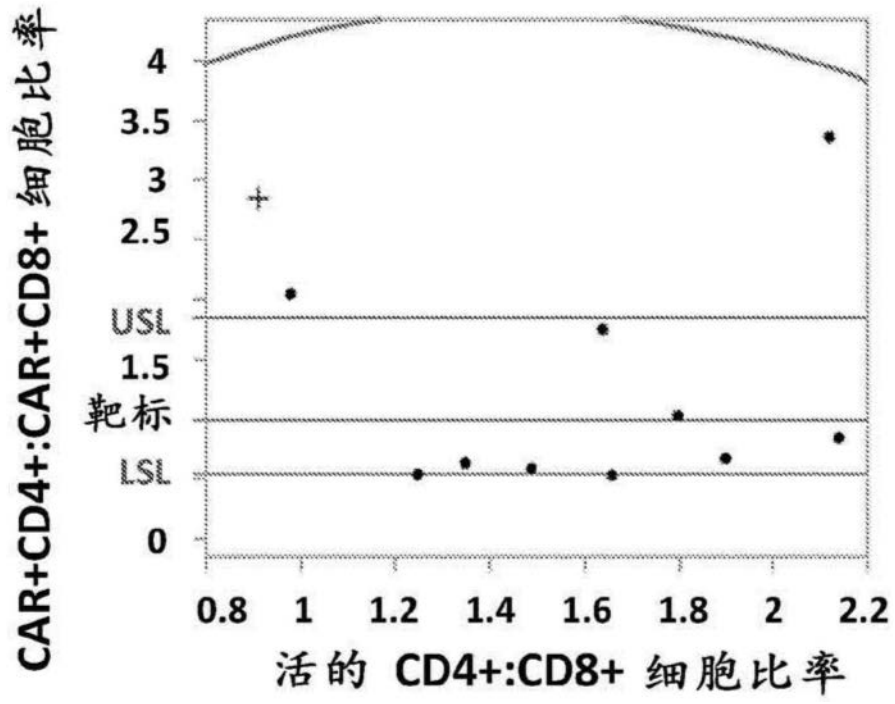


图1A

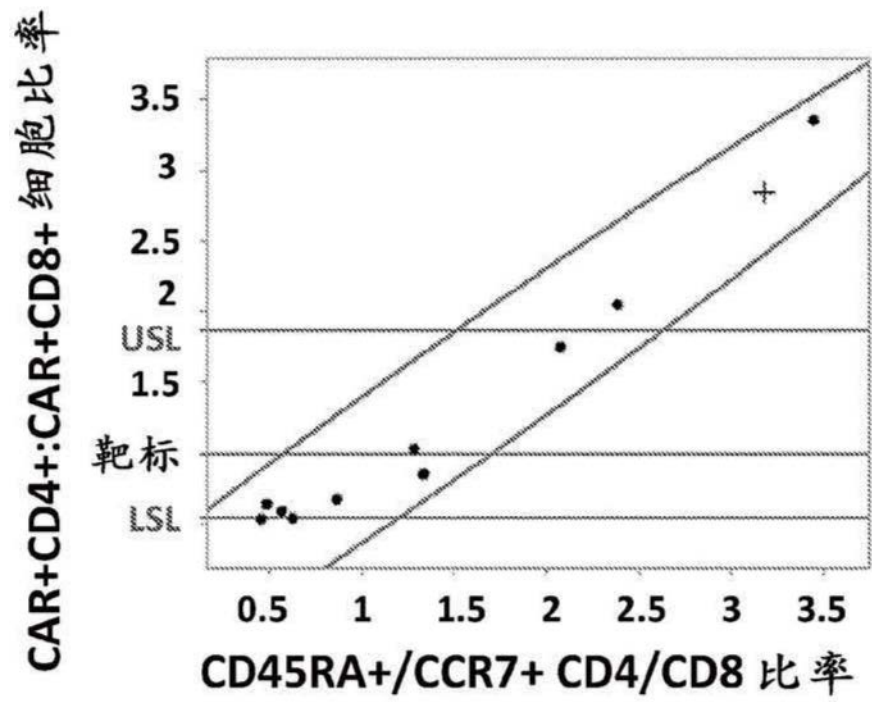


图1B

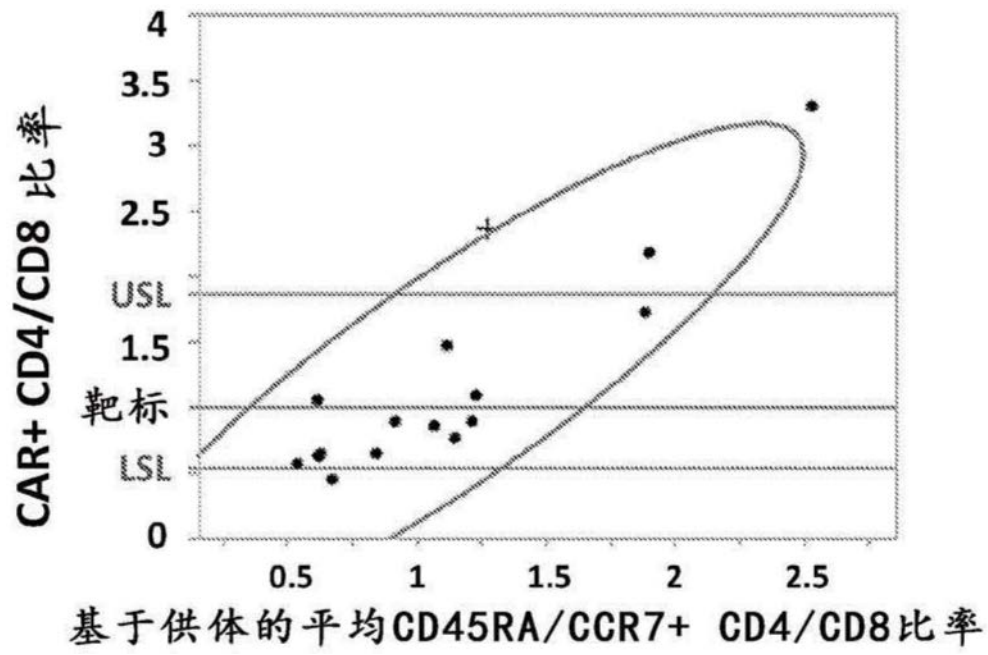


图2A

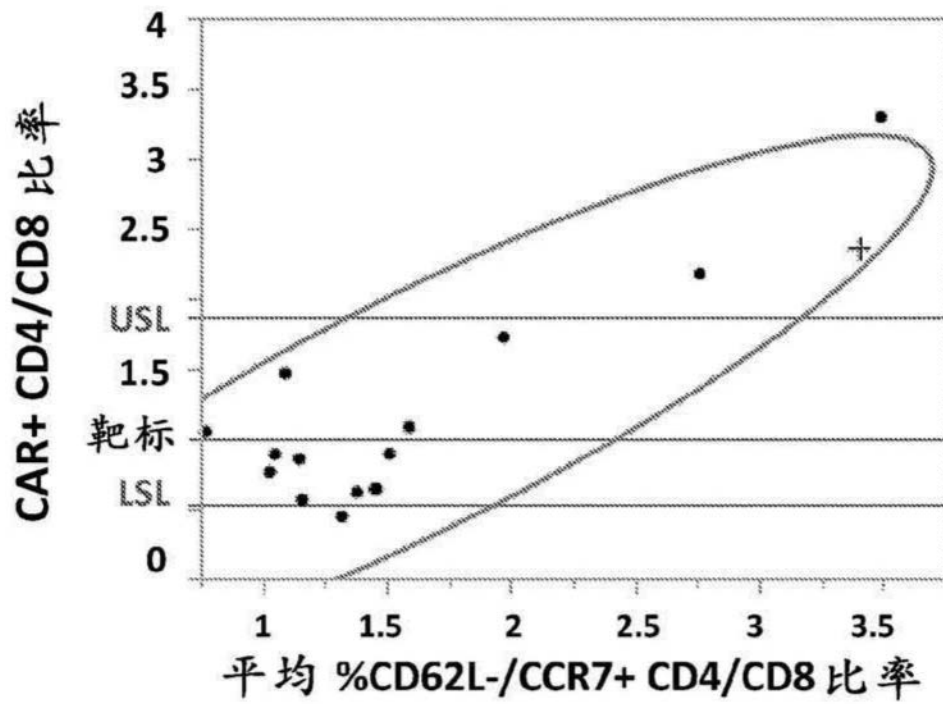


图2B

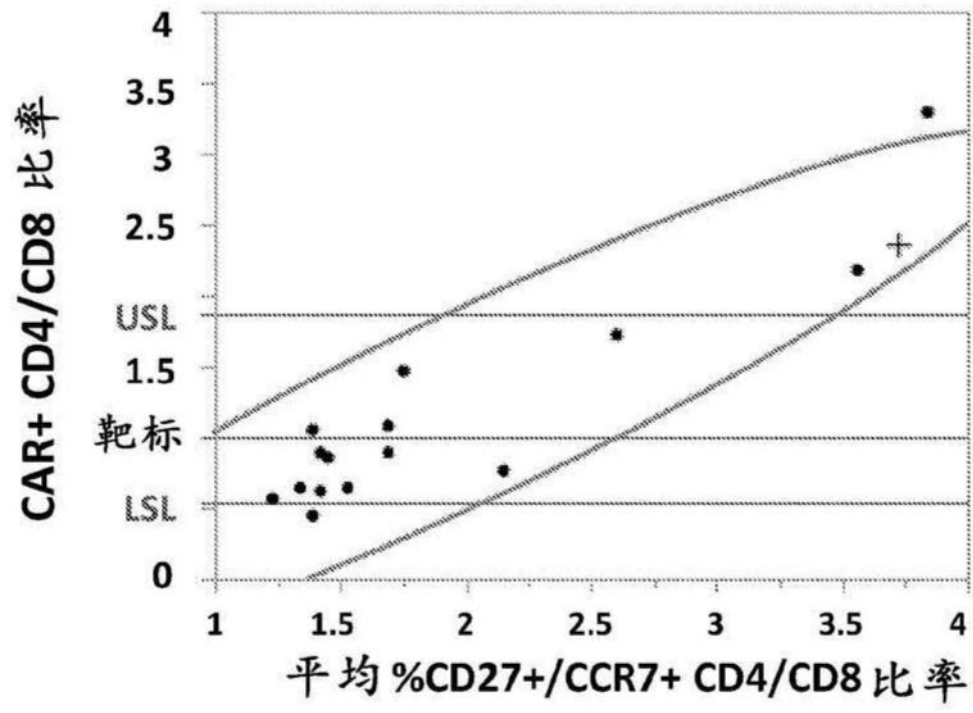


图2C

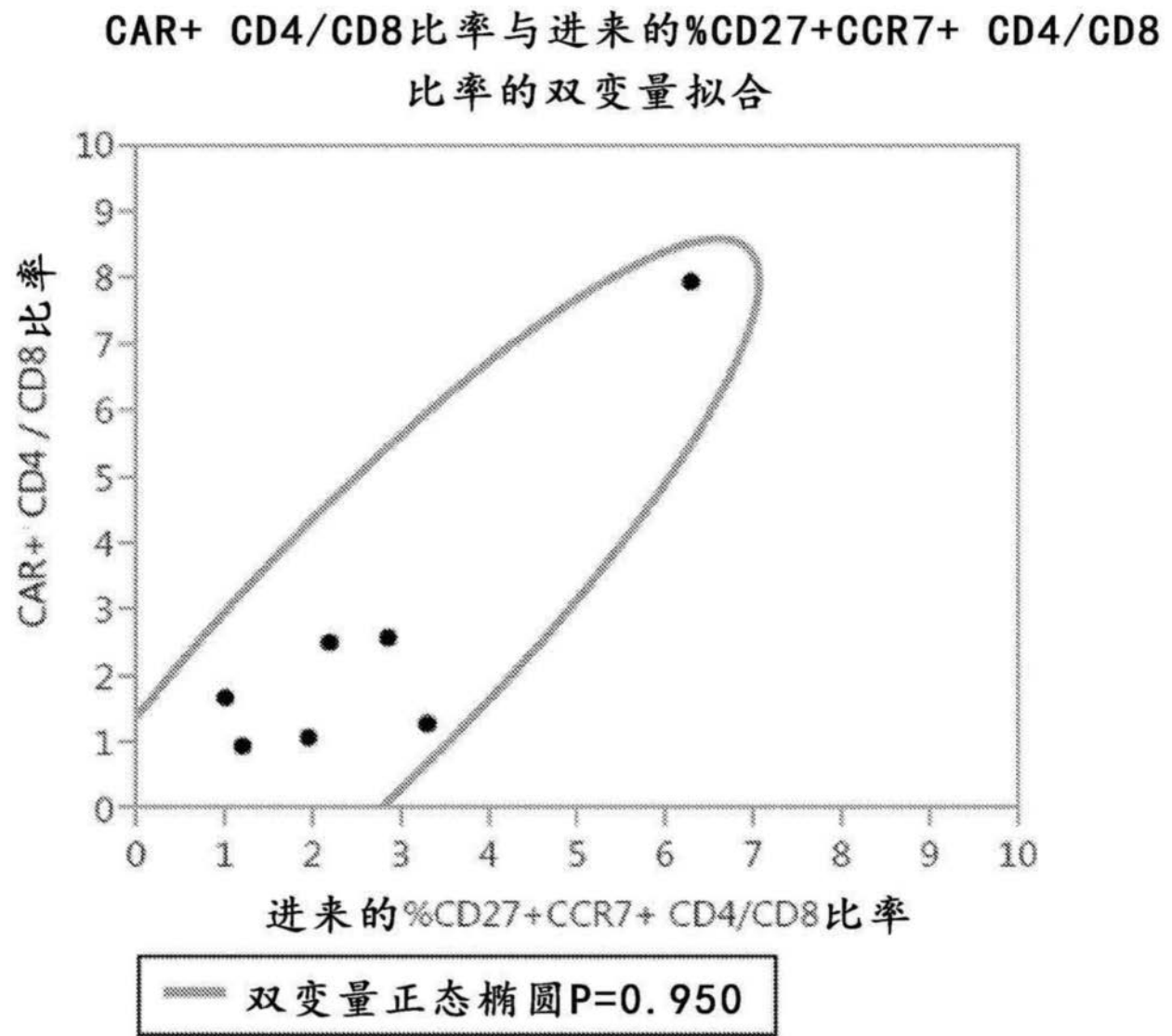


图3A

**CAR+ CD4/CD8比率与进来的%CD45RA+CCR7+
CD4/CD8比率的双变量拟合**

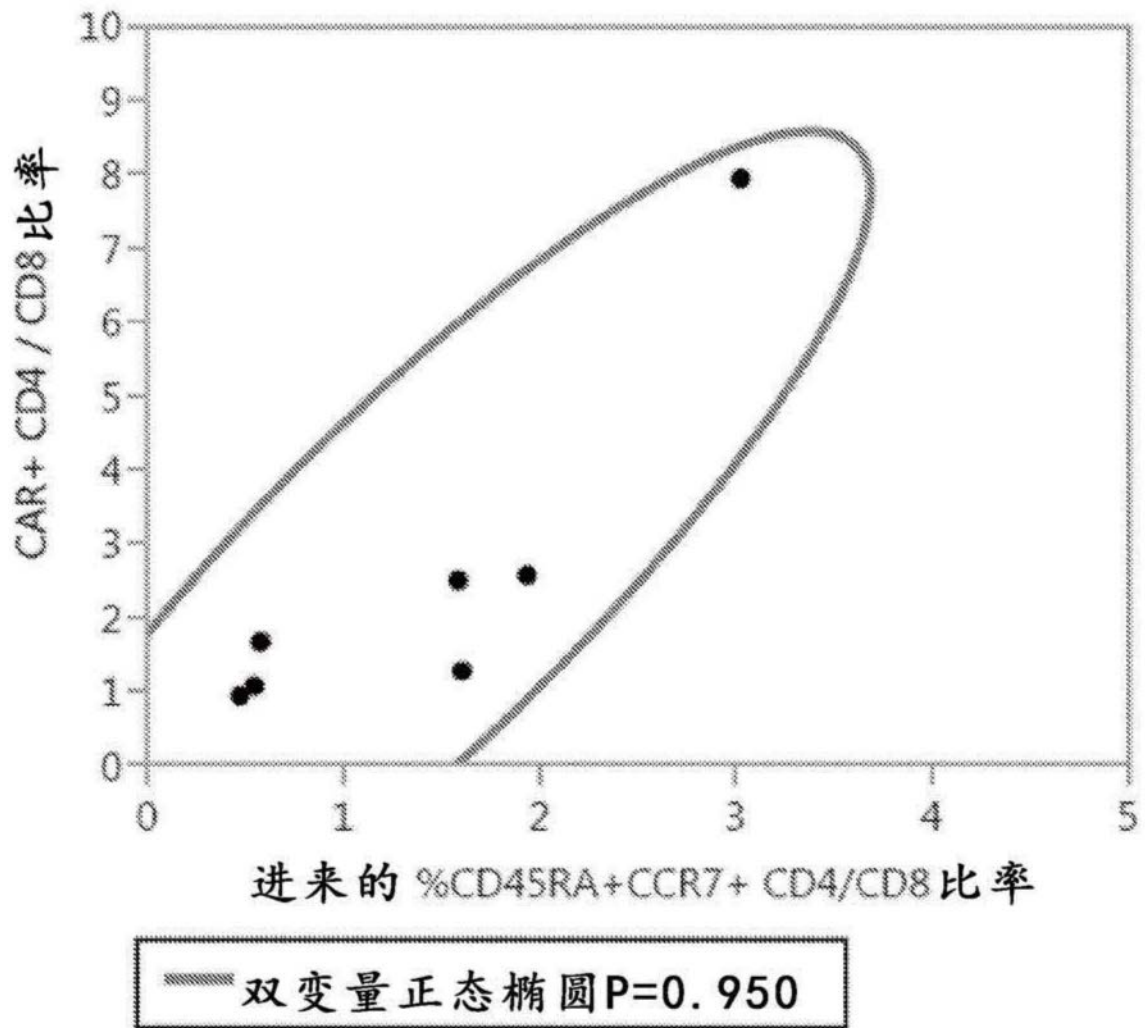


图3B

**CAR+ CD4/CD8比率与进来的%CD62L-CCR7+
CD4/CD8比率的双变量拟合**

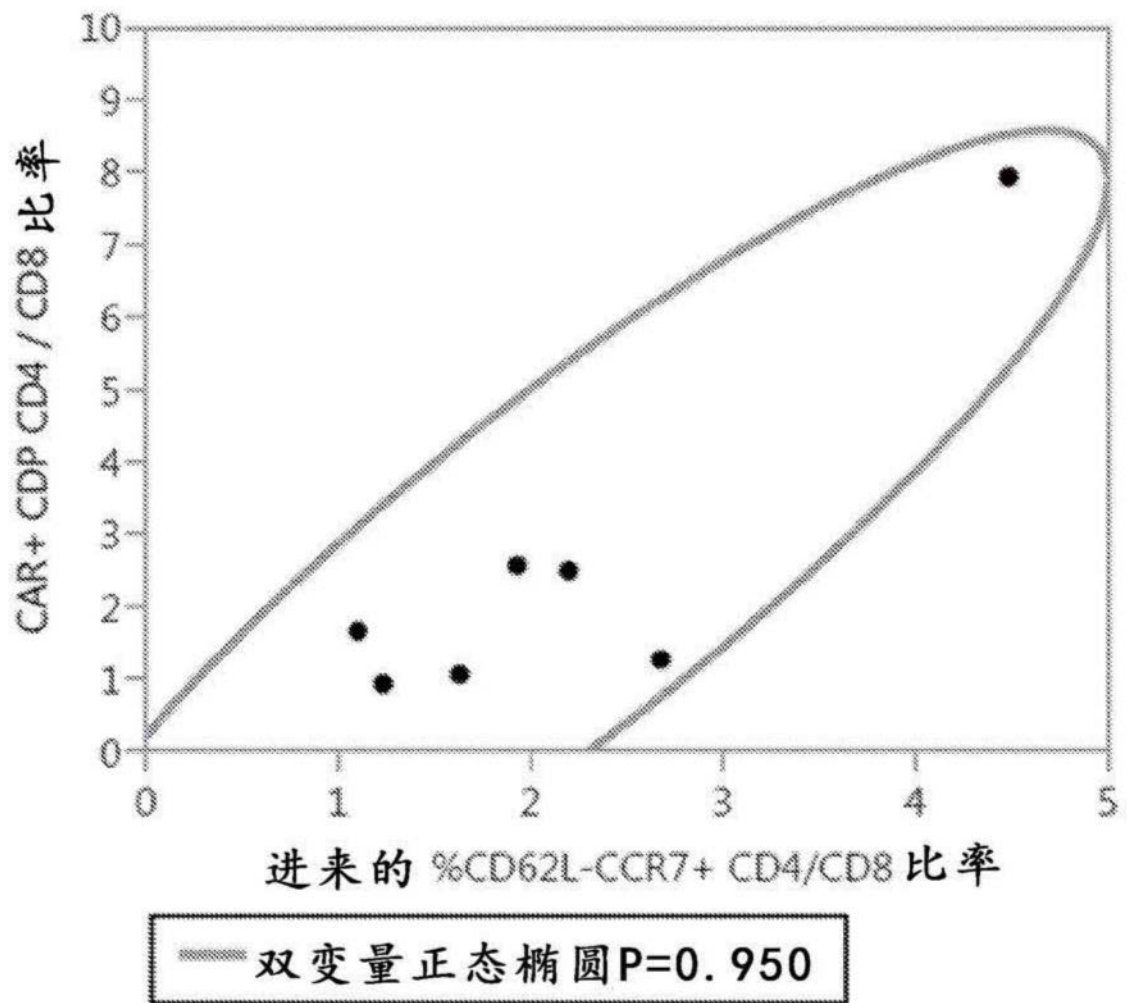


图3C

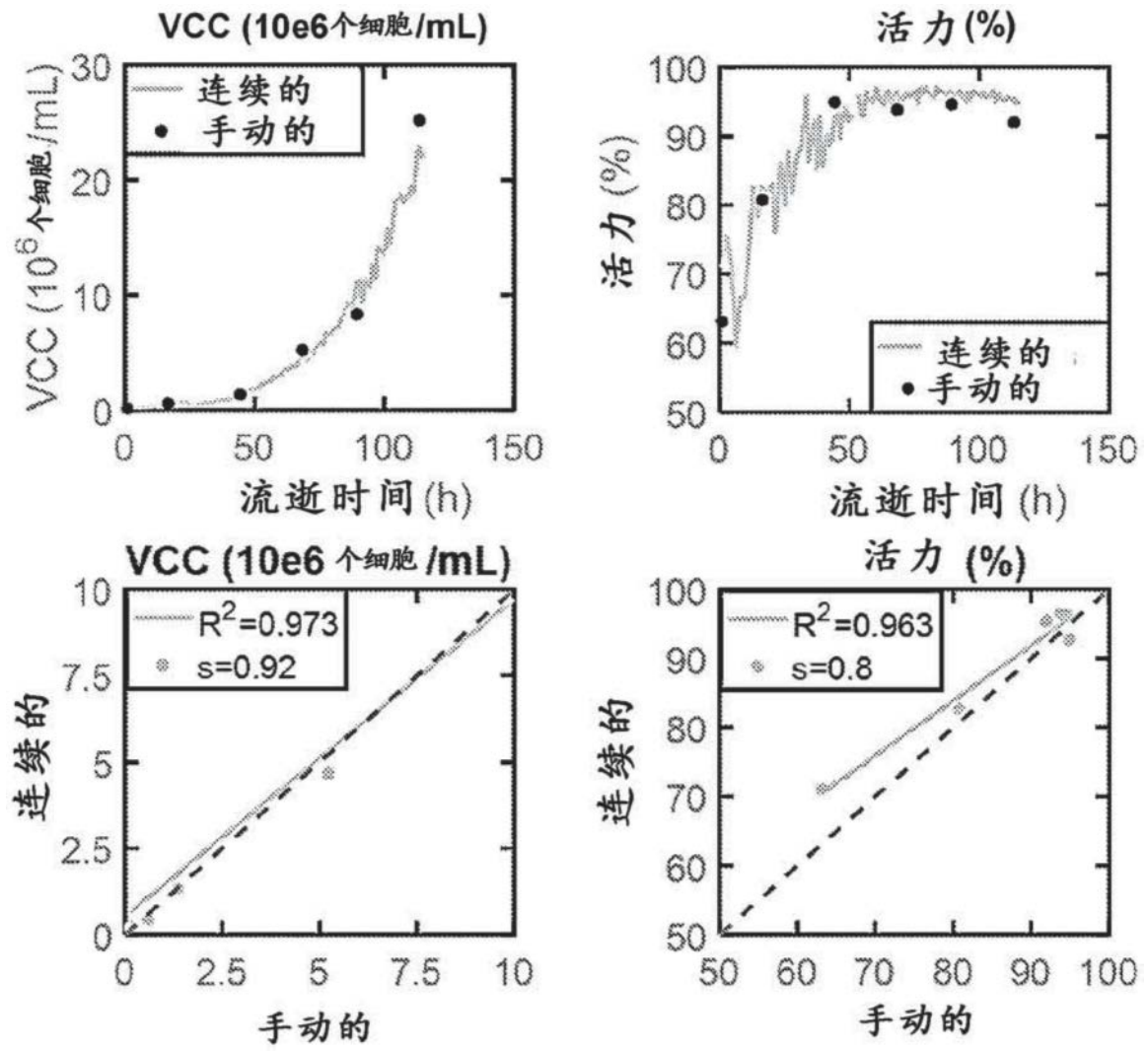


图4A

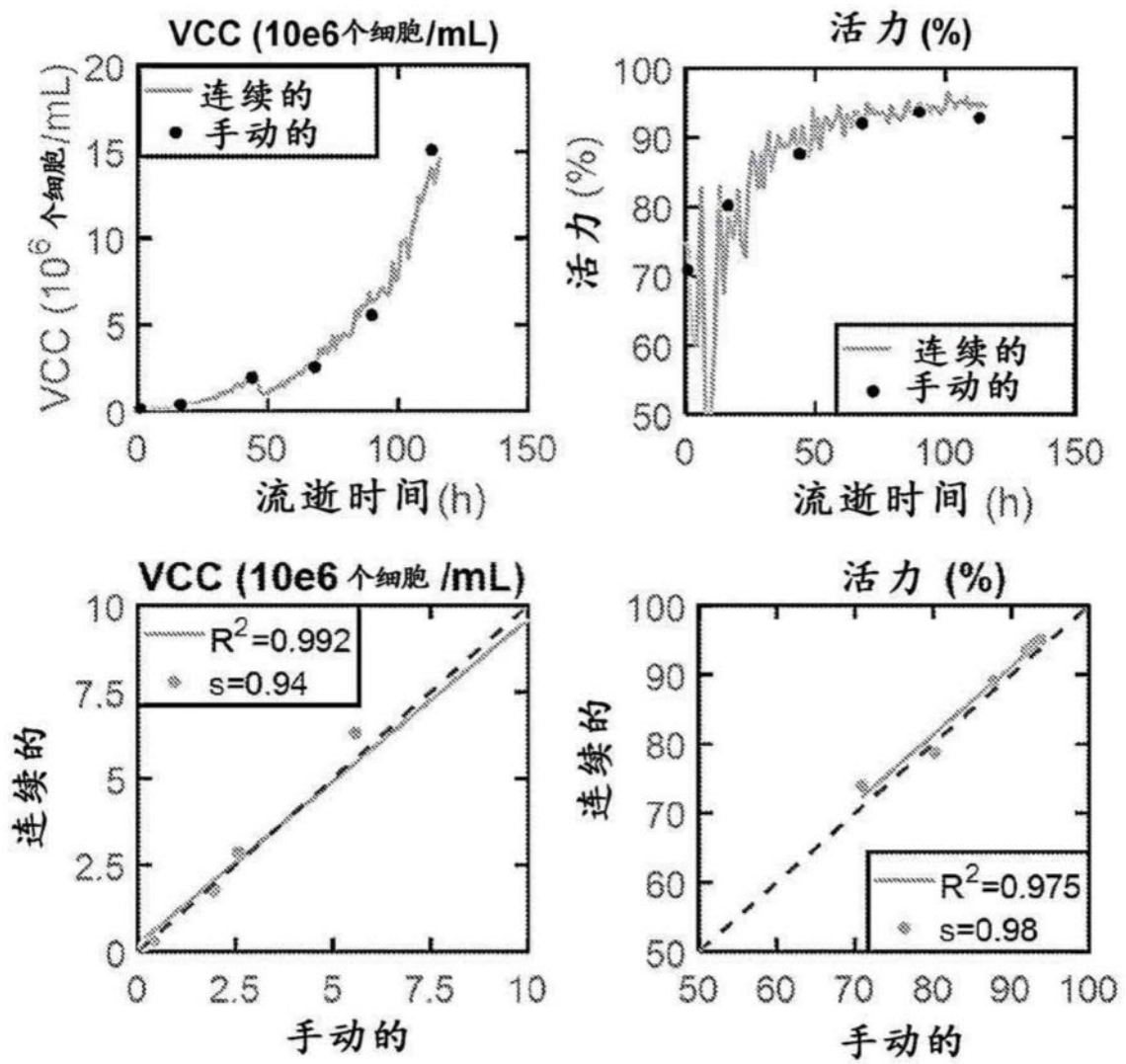


图4B

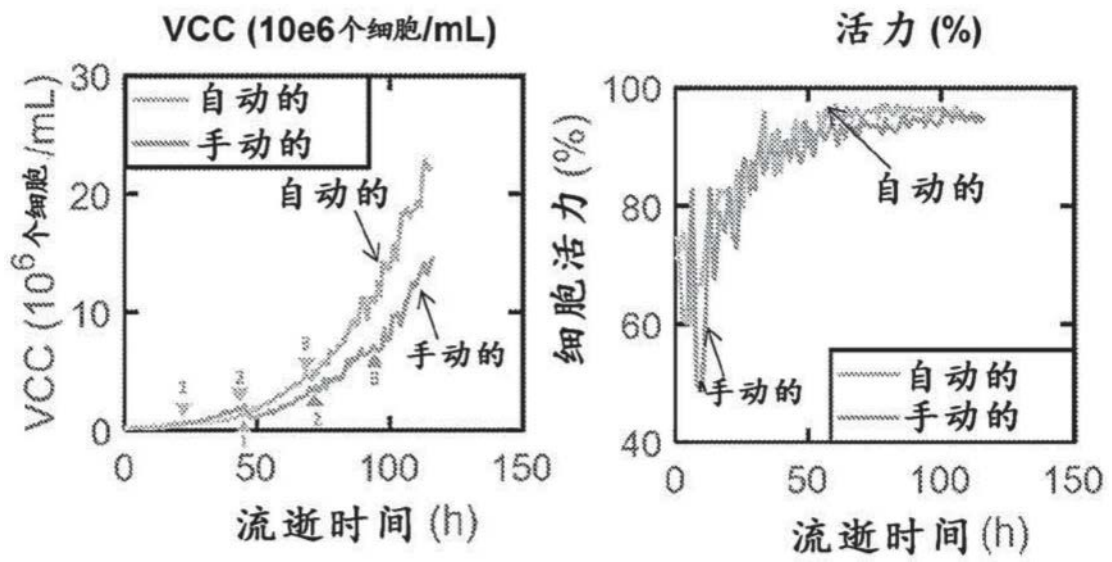


图5

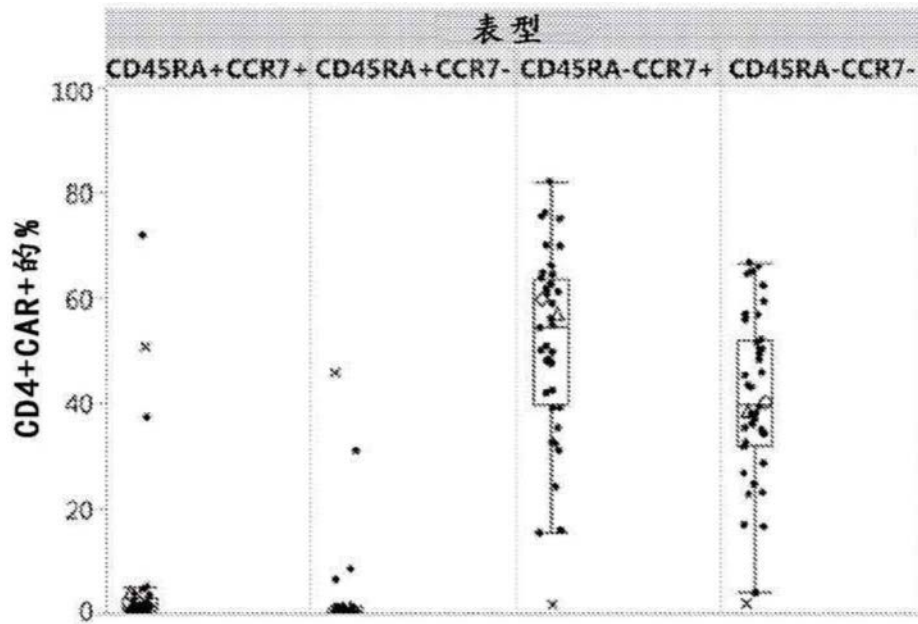


图6A

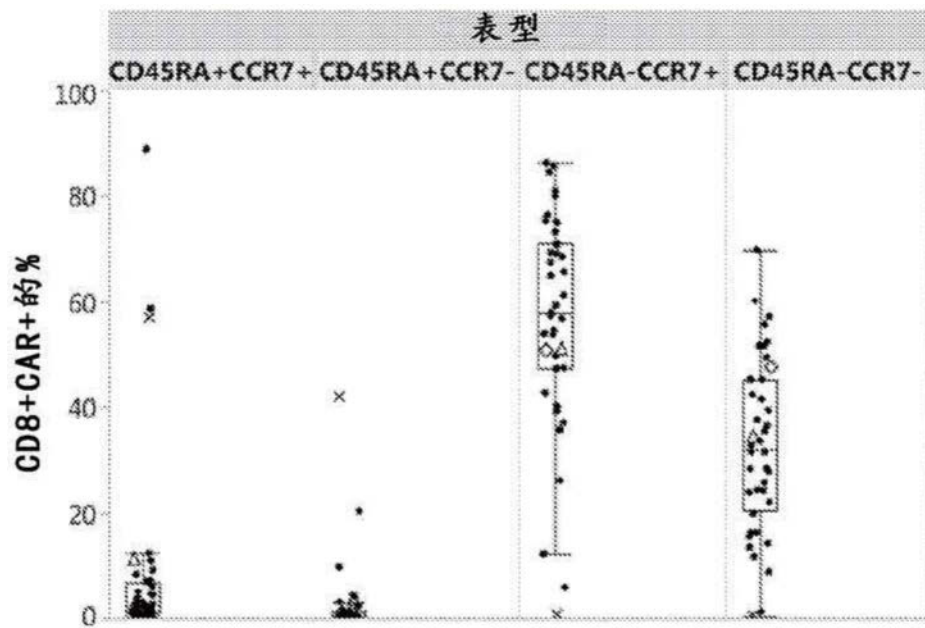


图6B

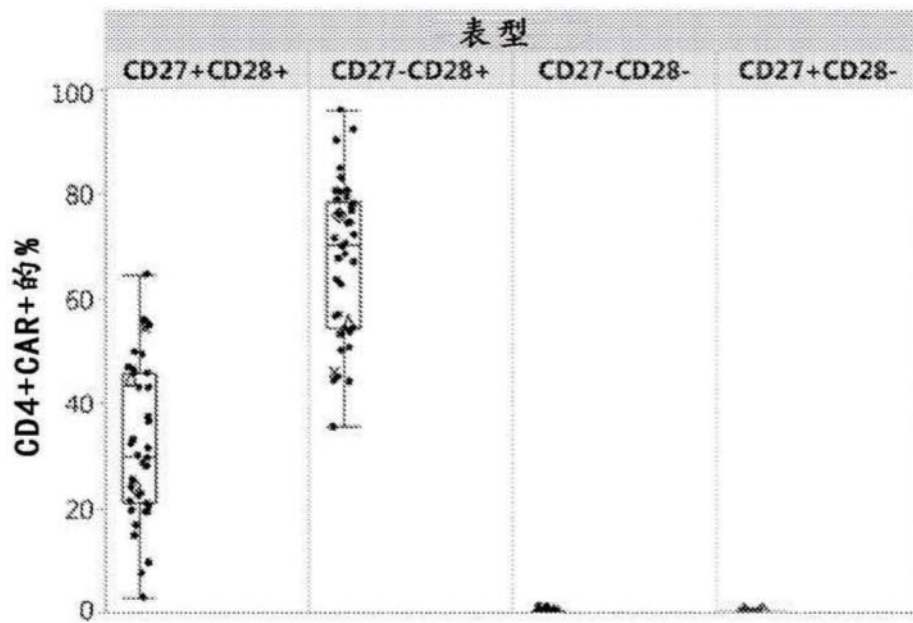


图6C

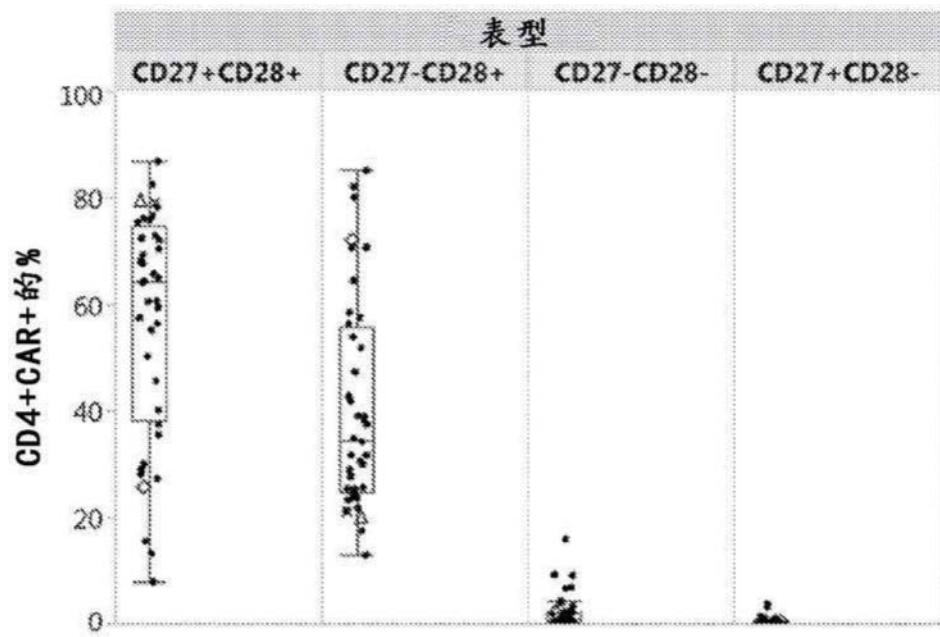


图6D