



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119013393 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 22

(21) 申请号 202380029504.3

(22) 申请日 2023.01.27

(30) 优先权数据

63/304,502 2022.01.28 US

63/438,764 2023.01.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/061510 2023.01.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/147515 EN 2023.08.03

(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 C·陈 林钦伟

(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 5/0783 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

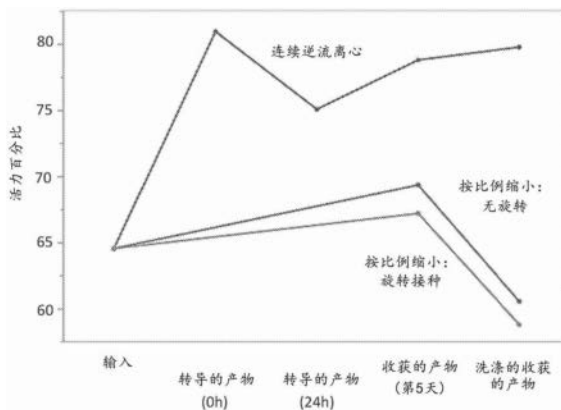
权利要求书9页 说明书132页  
序列表(电子公布) 附图21页

(54) 发明名称

制造细胞组合物的方法

(57) 摘要

提供了连续逆流离心的方法,所述方法用于制造细胞组合物,包括用于产生包括表达重组受体如嵌合抗原受体(CAR)的细胞的T细胞疗法。



1. 一种用于产生基因工程化T细胞的组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床;

(b) 将病毒载体颗粒装载至圆锥形流体外壳中,从而生成包含所述细胞组合物和所述病毒载体颗粒的输入组合物;以及

(c) 将第二离心力和第二流速施加至所述输入组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述病毒载体颗粒在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成基因工程化T细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病毒载体颗粒的所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分期间进行和/或在(c)中的所述施加的至少一部分期间进行。

3. 一种用于产生基因工程化T细胞的组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的输入组合物以产生细胞流化床,所述输入组合物包含(i)病毒载体颗粒和(ii)含有T细胞的细胞组合物;以及

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述圆锥形流体外壳中的所述输入组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述病毒载体颗粒在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成基因工程化T细胞。

4. 根据权利要求3所述的方法,所述方法进一步包括将所述细胞组合物和所述病毒载体颗粒装载至所述圆锥形流体外壳中,从而生成所述输入组合物,其中所述细胞组合物的装载在所述病毒载体颗粒的装载之前、期间和/或之后。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述细胞组合物的装载和/或所述病毒载体颗粒的装载在(a)中的所述施加之前和/或期间进行。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将第三离心力和第三流速施加至所述离心机系统的圆锥形流体外壳中的所述基因工程化T细胞,以产生包含所述基因工程化T细胞的输出组合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比,任选地大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%或大至少约25%。

9. 根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中所述输出组合物中至少或至少约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%或至少或至少约30%的所述T细胞被所述病毒载体颗粒转导。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间,任选地其中将所述第一离心力和所述第一流速施加至所述细胞组合物或所述输入组合物约15秒、约30秒、约45秒或约60秒。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述第一离心力(以G计)与所述第一流速(以mL/min计)的比率在约200与约400之间。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述第一离心力(以G计)与所述第一流速(以mL/min计)的比率是约300。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述第一离心力是约3,000G,并且所述第一流速是约10mL/min。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约20与约100之间、在约25与约85之间或在约30与约65之间。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率是约35。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述第二离心力是约1,000G,并且所述第二流速是约28.5mL/min。

18. 根据权利要求1-10和12-16中任一项所述的方法,其中(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约10mL/min与约100mL/min之间。

19. 根据权利要求1-15和18中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率是约62.5。

20. 根据权利要求1-10、12-15、18和19中任一项所述的方法,其中所述第二离心力是约625G,并且所述第二流速是约10mL/min。

21. 根据权利要求1-10、12-16和19中任一项所述的方法,其中(i)所述第二离心力在约100G与约2,000G之间;并且(ii)所述第二流速在约10mL/min与约100mL/min之间。

22. 根据权利要求1-15、18和21中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率是约30。

23. 根据权利要求1-10、12-15、21和22中任一项所述的方法,其中所述第二离心力是约300G,并且所述第二流速是约10mL/min。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中将所述第二离心力和所述第二流速施加至所述输入组合物至少约15分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约60分钟、至少约75分钟或至少约90分钟。

25. 根据权利要求7-24中任一项所述的方法,其中(i)所述第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且(ii)所述第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。

26. 根据权利要求7-25中任一项所述的方法,其中所述第三离心力(以G计)与所述第三流速(以mL/min计)的比率在约100与约150之间,任选地其中所述第三离心力(以G计)与所述第三流速(以mL/min计)的比率是约125。

27. 根据权利要求7-26中任一项所述的方法,其中所述第三离心力是约2,500G,并且所述第三流速是约20mL/min。

28. 根据权利要求7-27中任一项所述的方法,其中在施加所述第三离心力和所述第三流速之前,所述方法包括使所述基因工程化T细胞经受一个或多个洗涤步骤,任选地其中所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述方法包括在(a)中的所述施加之前将所述细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育和/或将所述细胞组合物的T细胞在(a)中

的所述施加之前在刺激条件下孵育。

30. 根据权利要求29所述的方法,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。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述刺激试剂包含(i)与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂,以及(ii)与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂,任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40和ICOS。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述一级药剂和所述二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。

33. 根据权利要求31或权利要求32所述的方法,其中所述一级药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且所述二级药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。

34. 根据权利要求31-33中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和所述二级药剂各自存在于固体支持物的表面上,任选地其中所述一级药剂和所述二级药剂各自存在于珠的表面上,进一步任选地存在于顺磁珠的表面上。

35. 根据权利要求31-33中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和所述二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素分子或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚体颗粒试剂的表面上。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述链霉亲和素分子或所述链霉亲和素突变蛋白分子结合或能够结合生物素或生物素类似物。

37. 根据权利要求31-36中任一项所述的方法,其中所述一级药剂包括抗CD3 Fab,并且所述二级药剂包括抗CD28 Fab。

38. 根据权利要求29-37中任一项所述的方法,其中所述刺激条件包括一种或多种重组细胞因子的存在。

39. 根据权利要求29-38中任一项所述的方法,其中所述刺激条件包括重组IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种的存在。

40. 根据权利要求7-39中任一项所述的方法,其中所述方法包括收集所述输出组合物和/或将所述输出组合物收集。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述方法包括孵育所收集的输出组合物的基因工程化T细胞和/或将所收集的输出组合物的基因工程化T细胞孵育。

42. 根据权利要求40或权利要求41所述的方法,其中将所收集的输出组合物的基因工程化T细胞在所述收集后立即孵育至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天或至少约20天。

43. 根据权利要求40-42中任一项所述的方法,其中在收集后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天的所收集的输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。

44. 根据权利要求40-43中任一项所述的方法,其中在收集后约1天的所收集的输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。

45. 根据权利要求40-44中任一项所述的方法,其中在收集后约5天的所收集的输出组合中活T细胞的百分比大于所述输入组合中活T细胞的百分比。

46. 根据权利要求40-45中任一项所述的方法,其中所述方法包括冷冻保存所收集的输出组合和/或将所收集的输出组合冷冻保存,从而生成冷冻保存的组合。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中将所述冷冻保存的组合解冻以产生解冻的组合,并且所述解冻的组合中活T细胞的百分比大于所述输入组合中活T细胞的百分比,任选地大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%、大至少约25%或大至少约30%。

48. 根据权利要求1-47中任一项所述的方法,其中所述输入组合包含具有如下平均直径的T细胞:大于或大于约6微米、大于或大于约6微米、大于或大于约7微米、大于或大于约8微米、大于或大于约9微米、大于或大于约10微米或大于或大于约11微米。

49. 根据权利要求1-48中任一项所述的方法,其中所述输入组合包含在约 $1 \times 10^6$ 个总T细胞与约 $2 \times 10^9$ 个总T细胞之间。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的方法,其中所述输入组合包含至少约 $1 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $2 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $3 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $4 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $5 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $6 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $7 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $8 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $7 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $8 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $9 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $1 \times 10^9$ 个总T细胞、至少约 $1.25 \times 10^9$ 个总T细胞、至少约 $1.50 \times 10^9$ 个总T细胞或至少约 $1.75 \times 10^9$ 个总T细胞。

51. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法,其中所述输入组合的体积在约5ml与约20,000ml之间、在约10mL与约2,000mL之间、在约15mL与约1,000mL之间、在约20mL与约500mL之间、在约25mL与约100mL之间或在约30mL与约60mL之间。

52. 根据权利要求1-51中任一项所述的方法,其中所述输入组合的体积在约30mL与约60mL之间。

53. 根据权利要求7-52中任一项所述的方法,其中所述输出组合的体积在约2.5mL与约60mL之间、在约5mL与约40mL之间或在约10mL与约20mL之间。

54. 根据权利要求7-53中任一项所述的方法,其中所述输出组合的体积是约5mL、约10mL、约15mL、约20mL、约25mL、约30mL、约35mL、约40mL、约45mL、约50mL、约55mL或约60mL。

55. 一种用于针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合包含活T细胞和非活T细胞,以及

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而从所述圆锥形流体外壳中淘洗出所述细胞组合的废物级分,所述废物级分具有比所述细胞组合中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比,并且在所述圆锥形流体外壳内产生具有比所述细胞组合中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中(i)所述第一离心力在约1,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。

57. 根据权利要求55或权利要求56所述的方法,其中所述第一离心力(以G计)与所述第

一流速(以mL/min计)的比率在约200与约500之间。

58.根据权利要求55-57中任一项所述的方法,其中所述第一离心力(以G计)与所述一流速(以mL/min计)的比率在约200与约400之间。

59.根据权利要求55-58中任一项所述的方法,其中将所述第一离心力和所述一流速施加至所述细胞组合物至少30秒。

60.根据权利要求55-59中任一项所述的方法,其中(i)所述第二离心力在约350G与约4,000G之间;并且(ii)所述第二流速在约5mL/min与约100mL/min之间。

61.根据权利要求55-60中任一项所述的方法,其中所述第二离心力在约350G与3,000G之间。

62.根据权利要求55-61中任一项所述的方法,其中所述第二离心力在约1,500G与约3,000G之间。

63.根据权利要求55-61中任一项所述的方法,其中所述第二离心力在约500G与约1,500G之间。

64.根据权利要求55-63中任一项所述的方法,其中所述第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间。

65.根据权利要求55-63中任一项所述的方法,其中所述第二流速在约10mL/min与约65mL/min之间。

66.根据权利要求55-63和65中任一项所述的方法,其中所述第二流速在约10mL/min与约35mL/min之间。

67.根据权利要求55-63、65和66中任一项所述的方法,其中所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

68.根据权利要求55-67中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约70之间。

69.根据权利要求55-68中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间。

70.根据权利要求1-69中任一项所述的方法,其中所述T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。

71.根据权利要求55-68和70中任一项所述的方法,其中所述T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径,并且所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约70之间。

72.根据权利要求1-69中任一项所述的方法,其中所述T细胞具有小于9 $\mu$ m的平均直径。

73.根据权利要求55-69和72中任一项所述的方法,其中所述T细胞具有小于9 $\mu$ m的平均直径,并且所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间。

74.一种针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)将第一离心力和一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述一流速在约5mL/min与约15mL/min之间;以及

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,其中(i)所述第二离心力在约1,500G与约3,000G之间;(ii)所述第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间;并且(iii)所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间;

其中所述T细胞具有小于9 $\mu$ m的平均直径。

75. 根据权利要求1-69和72-74中任一项所述的方法,其中所述T细胞具有约6 $\mu$ m至约9 $\mu$ m的平均直径。

76. 根据权利要求55-75中任一项所述的方法,其中所述方法包括收集所淘洗的废物级分。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中将所淘洗的废物级分收集在与所述圆锥形流体外壳的宽端流体连通的容器中。

78. 一种用于针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而从所述圆锥形流体外壳中淘洗出所述细胞组合物的废物级分,所述废物级分具有比所述细胞组合物中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比,并且在所述圆锥形流体外壳内生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,以及

(c) 在步骤(a)和(b)之后冷冻保存所述经富集的组合物中的细胞以产生冷冻保存的细胞组合物。

79. 根据权利要求78所述的方法,所述方法进一步包括(d)在步骤(c)之后将所述冷冻保存的细胞组合物解冻。

80. 根据权利要求78或权利要求79所述的方法,其中所述第二流速是30mL/min或更小。

81. 根据权利要求78-80中任一项所述的方法,其中所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

82. 一种针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间;以及

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,其中(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

83. 根据权利要求82所述的方法,其中所述T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。

84. 根据权利要求82或权利要求83所述的方法,其中所述方法包括在步骤(a)和(b)的应用之后将所述经富集的组合物中的细胞冷冻保存,以产生冷冻保存的细胞组合物。

85. 根据权利要求78-81和84中任一项所述的方法,其中所述冷冻保存包括将所述细胞悬浮在包含冷冻保护剂的培养基中并冷冻所述细胞,任选地其中所述冷冻在速率受控的冷冻器中进行。

86. 根据权利要求78-81、84和85中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将所述冷冻保存的细胞组合物解冻,任选地其中在所述冷冻保存的细胞组合物已经冷冻至少3天之后进行所述解冻。

87. 根据权利要求78-86中任一项所述的方法,其中所述第二离心力在约700G与约1,300G之间。

88. 根据权利要求78-87中任一项所述的方法,其中所述第二离心力在约800G与约1,200G之间。

89. 根据权利要求78-88中任一项所述的方法,其中所述第二离心力在约900G与约1,100G之间。

90. 根据权利要求78-89中任一项所述的方法,其中所述第二离心力是约1,000G。

91. 根据权利要求78-90中任一项所述的方法,其中所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间。

92. 根据权利要求55-91中任一项所述的方法,其中所述方法包括将所述细胞组合物装载至所述离心机系统中,其中所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分之前和/或期间进行。

93. 根据权利要求55-92中任一项所述的方法,其中所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

94. 根据权利要求55-93中任一项所述的方法,其中在(a)中的所述施加之前,所述方法包括使所述细胞组合物的T细胞与病毒载体颗粒接触,从而产生基因工程化T细胞,和/或所述细胞组合物的T细胞已经与病毒载体颗粒接触,从而产生基因工程化T细胞。

95. 根据权利要求55-94中任一项所述的方法,其中所述经富集的组合物中活T细胞的百分比比所述细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约10%、大至少约20%、大至少约30%、大至少约40%、大至少约50%或大至少约60%。

96. 根据权利要求55-95中任一项所述的方法,所述方法包括(c)将第三离心力和第三流速施加至所述离心机系统的圆锥形流体外壳中的所述经富集的组合物以收集所述经富集的组合物,其中(i)所述第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且(ii)所述第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。

97. 根据权利要求96所述的方法,其中在所述施加所述第三离心力和所述第三流速之前,所述方法包括使所述经富集的组合物经受一个或多个洗涤步骤,任选地其中所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。

98. 根据权利要求28-54和96中任一项所述的方法,其中所述一个或多个洗涤步骤在所述第二离心力和所述第二流速下进行。

99. 根据权利要求1-98中任一项所述的方法,其中所述细胞组合物包含激活的T细胞。

100. 根据权利要求55-99中任一项所述的方法,其中所述方法包括冷冻保存所收集的

经富集的组合物和/或将所收集的经富集的组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的经富集的组合物。

101. 根据权利要求100所述的方法,其中将所述冷冻保存的经富集的组合物解冻以产生解冻的经富集的组合物,并且所述解冻的经富集的组合物中活T细胞的百分比大于所述细胞组合物中活T细胞的百分比,任选地大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%、大至少约25%或大至少约30%。

102. 根据权利要求1-101中任一项所述的方法,其中所述方法的一个或多个步骤是自动化的,任选地其中所述方法的所述一个或多个步骤通过所述离心机系统或其组件自动化。

103. 根据权利要求1-54和94-102中任一项所述的方法,其中所述病毒载体颗粒包含编码重组分子的异源核酸。

104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述重组分子是趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、抗原受体或其组合。

105. 根据权利要求103或权利要求104所述的方法,其中所述重组分子是抗原受体。

106. 根据权利要求105所述的方法,其中所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。

107. 根据权利要求105所述的方法,其中所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

108. 根据权利要求107所述的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和含有免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的细胞内信号传导结构域。

109. 根据权利要求108所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3- $\zeta$  (CD3 $\zeta$ )链的细胞内结构域。

110. 根据权利要求108或权利要求109所述的方法,其中所述CAR进一步包含连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

111. 根据权利要求110所述的方法,其中所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。

112. 根据权利要求108-111中任一项所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域进一步包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。

113. 根据权利要求112所述的方法,其中所述T细胞共刺激分子选自CD28和4-1BB。

114. 根据权利要求1-54和94-113中任一项所述的方法,其中所述病毒载体颗粒是逆转录病毒载体颗粒。

115. 根据权利要求114所述的方法,其中所述逆转录病毒载体颗粒是 $\gamma$ 逆转录病毒载体。

116. 根据权利要求114所述的方法,其中所述逆转录病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。

117. 根据权利要求105-116中任一项所述的方法,其中所述抗原受体特异性结合与疾病或病症相关的抗原。

118. 根据权利要求117所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍和/或感染性疾病。

119. 根据权利要求117或权利要求118所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

120. 根据权利要求1-119中任一项所述的方法,其中所述T细胞是原代T细胞,任选地来自人受试者。

121. 一种组合物,所述组合物包含通过根据权利要求1-120中任一项所述的方法产生的基因工程化T细胞。

122. 根据权利要求121所述的组合物,其中所述组合物包含在约 $1.0 \times 10^6$ 个CAR表达T细胞与 $2.0 \times 10^9$ 个CAR表达T细胞之间。

123. 根据权利要求121或权利要求122所述的组合物,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。

124. 根据权利要求121或权利要求122所述的组合物,所述组合物进一步包含冷冻保护剂。

125. 一种治疗患有疾病或障碍的受试者的方法,所述方法包括将根据权利要求121-123中任一项所述的组合物施用于所述受试者。

126. 根据权利要求125所述的方法,其中所述基因工程化T细胞表达特异性结合与所述疾病或障碍相关的抗原的抗原受体。

## 制造细胞组合物的方法

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年1月28日提交的美国临时申请号63/304,502和2023年1月12日提交的美国临时申请号63/438,764的优先权,出于所有目的将其每一个的内容通过引用以其整体特此并入。

### 通过引用并入序列列表

[0002] 本申请是与电子格式的序列列表一起提交的。序列列表以2023年1月23日创建的名为735042021040SeqList.xml的文件提供,其大小为35,102字节。将电子格式的序列列表的信息通过引用以其整体并入。

### 技术领域

[0003] 在一些方面,本公开文本涉及在细胞组合物(包括工程化细胞组合物)的处理和制造中的连续逆流离心方法。在一些方面,连续逆流离心方法针对活细胞(如活T细胞)富集细胞组合物。还提供了所得的细胞组合物,如包含经基因工程化以表达抗原受体的T细胞的那些细胞组合物。在一些方面,通过连续逆流离心进行细胞组合物(如包含淋巴细胞群的组合物)的转导。在一些方面,本公开文本提供了用于转导细胞群的方法,所述方法涉及淋巴细胞和病毒载体颗粒的连续逆流离心,从而产生含有转导细胞的组合物。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物能够用于过继细胞疗法的方法中。

### 背景技术

[0004] 有多种策略可用于体外富集和/或转导T细胞群,包括用于体外富集和转导抗原特异性T细胞以用于过继细胞免疫疗法或癌症疗法。体外富集和/或转导细胞群需要改进的策略,包括用于大规模研究、诊断和治疗目的。提供了满足此类需求的方法和相关组合物。

### 发明内容

[0005] 本文提供了一种用于产生基因工程化T细胞的组合物的方法,所述方法包括(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床;(b)将病毒载体颗粒装载至所述圆锥形流体外壳中,从而生成包含所述细胞组合物和所述病毒载体颗粒的输入组合物;以及(c)将第二离心力和第二流速施加至所述输入组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述病毒载体颗粒在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成基因工程化T细胞。在一些实施方案中,所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

[0006] 在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒的装载在(a)中的施加的至少一部分期间进行。在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒的装载在(c)中的施加的至少一部分期间进行。

[0007] 本文还提供了一种用于产生基因工程化T细胞的组合物的方法,所述方法包括(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的输入组合物,以产生细

胞流化床,所述输入组合物包含(i)病毒载体颗粒和(ii)含有T细胞的细胞组合物;以及(b)将第二离心力和第二流速施加至所述圆锥形流体外壳中的输入组合物,其中所述第二离心力和第二流速使所述病毒载体颗粒在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成基因工程化T细胞。在一些实施方案中,所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

[0008] 在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞组合物和所述病毒载体颗粒装载至所述圆锥形流体外壳中,从而生成所述输入组合物。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在所述病毒载体颗粒的装载之前、期间和/或之后。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在所述病毒载体颗粒的装载之前。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在所述病毒载体颗粒的装载期间。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在所述病毒载体颗粒的装载之后。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载和/或所述病毒载体颗粒的装载在(a)中的施加之前和/或期间进行。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在(a)中的所述施加之前和/或期间进行。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在(a)中的所述施加之前进行。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在(a)中的所述施加期间进行。在一些实施方案中,所述细胞组合物的装载在(a)中的所述施加之前和期间进行。在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒的装载在(a)中的所述施加之前进行。在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒的装载在(a)中的所述施加期间进行。在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒的装载在(a)中的所述施加之前和期间进行。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法包括将第三离心力和第三流速施加至所述离心机系统的圆锥形流体外壳中的基因工程化T细胞,以产生包含所述基因工程化T细胞的输出组合物。

[0010] 在一些实施方案中,所述输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,所述输出组合物中活T细胞的百分比比所述输入组合物中活T细胞的百分比大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%或大至少约25%。在一些实施方案中,所述输出组合物中活T细胞的百分比比所述输入组合物中活T细胞的百分比高约5%。在一些实施方案中,所述输出组合物中活T细胞的百分比比所述输入组合物中活T细胞的百分比高约10%。在一些实施方案中,所述输出组合物中活T细胞的百分比比所述输入组合物中活T细胞的百分比高约15%。

[0011] 在一些实施方案中,所述输出组合物中至少或至少约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%的T细胞被所述病毒载体颗粒转导。在一些实施方案中,所述输出组合物中至少约20%的T细胞被所述病毒载体颗粒转导。在一些实施方案中,所述输出组合物中至少约25%的T细胞被所述病毒载体颗粒转导。在一些实施方案中,所述输出组合物中至少约30%的T细胞被所述病毒载体颗粒转导。在一些实施方案中,所述输出组合物中至少约35%的T细胞被所述病毒载体颗粒转导。在一些实施方案中,所述输出组合物中至少约40%的T细胞被所述病毒载体颗粒转导。

[0012] 在一些实施方案中,所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间。在一些实施方案中,所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。在一些实施方案中,将所述第一离心力和所述第一流速施加至所述细胞组合物或所述输入组合物约15秒、约30秒、约45秒或约60秒。在一些实施方案中,将所述第一离心力和所述第一流速施加至所述细胞组合物或所述输入组合物约30秒。

[0013] 在一些实施方案中,所述第二离心力在约500G与约1,500G之间。在一些实施方案中,所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中,将所述第二离心力和所述第二流速施加至输入组合物至少约15分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约60分钟、至少约75分钟或至少约90分钟。在一些实施方案中,将所述第二离心力和所述第二流速施加至所述输入组合物约30分钟。

[0014] 在一些实施方案中,所述第二离心力在约500G与约1,500G之间。在一些实施方案中,所述第二流速在约10mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中,将所述第二离心力和所述第二流速施加至输入组合物至少约15分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约60分钟、至少约75分钟或至少约90分钟。在一些实施方案中,将所述第二离心力和所述第二流速施加至所述输入组合物约30分钟。

[0015] 在一些实施方案中,所述第二离心力在约100G与约2,000G之间。在一些实施方案中,所述第二流速在约10mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中,将所述第二离心力和所述第二流速施加至输入组合物至少约15分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约60分钟、至少约75分钟或至少约90分钟。在一些实施方案中,将所述第二离心力和所述第二流速施加至所述输入组合物约30分钟。

[0016] 在一些实施方案中,所述第一离心力与所述第一流速的比率在约200与约400之间。在一些实施方案中,所述第一离心力与所述第一流速的比率是约300。在一些实施方案中,所述第一离心力是约3,000G并且所述第一流速是约10mL/min。在一些实施方案中,所述第二离心力与所述第二流速的比率在约20与约100之间、在约25与约85之间或在约30与约65之间。在一些实施方案中,所述第二离心力与所述第二流速的比率是约35。在一些实施方案中,所述第二离心力是约1,000G并且所述第二流速是约28.5mL/min。在一些实施方案中,所述第二离心力与所述第二流速的比率是约62.5。

[0017] 在一些实施方案中,所述第二离心力是约625G并且所述第二流速是约10mL/min。

[0018] 在一些实施方案中,所述第二离心力与所述第二流速的比率是约30。在一些实施方案中,所述第二离心力是约300G并且所述第二流速是约10mL/min。

[0019] 在一些实施方案中,所述第三离心力在约2,000G与约3,000G之间。在一些实施方案中,所述第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。在一些实施方案中,所述第三离心力与所述第三流速的比率在约100与约150之间。在一些实施方案中,所述第三离心力与所述第三流速的比率是约125。在一些实施方案中,所述第三离心力是约2,500G并且所述第三流速是约20mL/min。

[0020] 在一些实施方案中,在施加所述第三离心力和所述第三流速之前,所述方法包括使所述基因工程化T细胞经受一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤在所述第二离心力和所述第二流速下进行。

[0021] 在一些实施方案中,所述方法包括在(a)中的所述施加之前在刺激条件下孵育所述细胞组合物的T细胞。在一些实施方案中,在(a)中的所述施加之前在刺激条件下孵育所述细胞组合物的T细胞。在一些实施方案中,所述细胞组合物包含激活的细胞。在一些实施方案中,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以及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。在一些实施方案中,所述刺激试剂包含(i)与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂,以及(ii)与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂。在一些实施方案中,所述一级药剂与CD3特异性结合。在一些实施方案中,所述二级药剂与选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40和ICOS的共刺激分子特异性结合。在一些实施方案中,所述二级药剂与CD28特异性结合。

[0022] 在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂各自包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述二级药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且所述二级药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂各自存在于或附着于固体支持物的表面上。在一些实施方案中,所述固体支持物是或包括珠。在一些实施方案中,所述固体支持物是表面附着有抗CD3和抗CD28抗体的顺磁珠。在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素分子或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚体颗粒试剂的表面上。在一些实施方案中,所述链霉亲和素分子或所述链霉亲和素突变蛋白分子结合至或能够结合至生物素、抗生物素蛋白、生物素类似物或生物素突变蛋白、抗生物素蛋白类似物或抗生物素蛋白突变蛋白和/或其生物活性片段。在一些实施方案中,所述一级药剂包括抗CD3 Fab,并且所述二级药剂包括抗CD28 Fab。

[0023] 在一些实施方案中,所述刺激条件包括一种或多种重组细胞因子的存在。在一些实施方案中,所述刺激条件包括重组IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种的存在。

[0024] 在一些实施方案中,所述方法包括收集所述输出组合物。在一些实施方案中,收集所述输出组合物。

[0025] 在一些实施方案中,所述方法包括孵育所收集的输出组合物的基因工程化T细胞。在一些实施方案中,孵育所收集的输出组合物的基因工程化T细胞。在一些实施方案中,在所述收集后立即孵育所收集的输出组合物的基因工程化T细胞至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天或至少约20天。

[0026] 在一些实施方案中,在收集后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天的所收集的输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,在收集后约1天的所收集的输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,在收集后约5天的所收集的输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。

[0027] 在一些实施方案中,所述方法包括冷冻保存所收集的输出组合物和/或将所收集的输出组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的组合物。在一些实施方案中,所述方法包括将所收集的输出组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的组合物。在一些实施方案中,将所收集的输出组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的组合物。在一些实施方案中,将冷冻保存的组合物解冻以产生解冻的组合物,并且所述解冻的组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,所述解冻的组合物中活T细胞的百分比比

所述输入组合物中活T细胞的百分比大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%、大至少约25%或大至少约30%。

[0028] 在一些实施方案中,所述输入组合物包含平均直径大于或大于约6微米、大于或大于约6微米、大于或大于约7微米、大于或大于约8微米、大于或大于约9微米、大于或大于约10微米或者大于或大于约11微米的T细胞。

[0029] 在一些实施方案中,所述输入组合物包含在约 $1 \times 10^6$ 个总T细胞与约 $2 \times 10^9$ 个总T细胞之间。在一些实施方案中,所述输入组合物包含至少约 $1 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $2 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $3 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $4 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $5 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $6 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $7 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $8 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $7 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $8 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $9 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $1 \times 10^9$ 个总T细胞、至少约 $1.25 \times 10^9$ 个总T细胞、至少约 $1.50 \times 10^9$ 个总T细胞或至少约 $1.75 \times 10^9$ 个总T细胞。在一些实施方案中,所述输入组合物的体积在约5ml与约20,000ml之间、在约10mL与约2,000mL之间、在约15mL与约1,000mL之间、在约20mL与约500mL之间、在约25mL与约100mL之间或在约30mL与约60mL之间。在一些实施方案中,所述输入组合物的体积在约30mL与约60mL之间。在一些实施方案中,所述输入组合物的体积是约30mL。在一些实施方案中,所述输入组合物的体积是约60mL。

[0030] 在一些实施方案中,所述输出组合物的体积在约2.5mL与约60mL之间、在约5mL与约40mL之间或在约10mL与约20mL之间。在一些实施方案中,所述输出组合物的体积是约5mL、约10mL、约15mL、约20mL、约25mL、约30mL、约35mL、约40mL、约45mL、约50mL、约55mL或约60mL。

[0031] 在一些实施方案中,所述方法的一个或多个步骤是自动化的。在一些实施方案中,所述方法的一个或多个步骤通过离心机系统或其组件自动化。

[0032] 在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒包含编码重组分子的异源核酸。在一些实施方案中,所述重组分子是趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、抗原受体(例如,CAR或TCR)或其组合。在一些实施方案中,所述重组分子是抗原受体。在一些实施方案中,所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,是嵌合抗原受体(CAR)。

[0033] 在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体(CAR)包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含CD3- $\zeta$  (CD3 $\zeta$ )链的细胞内结构域。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域进一步包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述T细胞共刺激分子选自CD28和4-1BB。在一些实施方案中,所述CAR被重组表达。在一些实施方案中,所述CAR由载体表达。在一些实施方案中,所述CAR由 $\gamma$ 逆转录病毒载体或慢病毒载体表达。在一些实施方案中,所述CAR由慢病毒载体表达。

[0034] 在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒是逆转录病毒载体颗粒。在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体颗粒是 $\gamma$ 逆转录病毒载体。在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。

[0035] 在一些实施方案中,所述抗原受体特异性结合与疾病或病症相关的抗原。在一些

实施方案中,所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍、和/或感染性疾病。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,所述T细胞是原代T细胞,任选地来自人受试者。

[0036] 本文还提供了一种用于针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,以及(b)将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而从所述圆锥形流体外壳中淘洗出所述细胞组合物的废物级分,所述废物级分具有比所述细胞组合物中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比,并且在所述圆锥形流体外壳内产生具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物。在一些实施方案中,所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

[0037] 在一些实施方案中,(i)所述第一离心力在约1,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。

[0038] 在一些实施方案中,所述第一离心力(以G计)与所述第一流速(以mL/min计)的比率在约200与约500之间。在一些实施方案中,所述第一离心力(以G计)与所述第一流速(以mL/min计)的比率在约200与约400之间。

[0039] 在一些实施方案中,将所述第一离心力和所述第一流速施加至所述细胞组合物至少30秒。

[0040] 在一些实施方案中,所述第二离心力在约350G与约4,000G之间;并且(ii)所述第二流速在约5mL/min与约100mL/min之间。

[0041] 在一些实施方案中,所述第二离心力在约350G与3,000G之间。在一些实施方案中,所述第二离心力在约1,500G与约3,000G之间。在一些实施方案中,所述第二离心力在约500G与约1,500G之间。

[0042] 在一些实施方案中,所述第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间。

[0043] 在一些实施方案中,所述第二流速在约10mL/min与约65mL/min之间。在一些实施方案中,所述第二流速在约10mL/min与约35mL/min之间。

[0044] 在一些实施方案中,所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

[0045] 在一些实施方案中,所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约70之间。在一些实施方案中,所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间。

[0046] 在一些实施方案中,所述T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述T细胞具有小于9 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述T细胞具有约6 $\mu$ m至约9 $\mu$ m的平均直径。

[0047] 在一些实施方案中,所述T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径,并且所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约70之间。

[0048] 在一些实施方案中,所述T细胞具有约10 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述T细胞具有约12 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,所述T细胞具有约14 $\mu$ m

至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0049] 在一些实施方案中,所述T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径,并且所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间。

[0050] 本文还提供了一种针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间;以及(b)将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,其中(i)所述第二离心力在约1,500G与约3,000G之间;(ii)所述第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间;并且(iii)所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间;其中所述T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0051] 在一些实施方案中,所述方法包括收集所淘洗的废物级分。在一些实施方案中,将所淘洗的废物级分收集在与所述圆锥形流体外壳的宽端流体连通的容器中。

[0052] 本文还提供了一种用于针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,以及(b)将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而从所述圆锥形流体外壳中淘洗出所述细胞组合物的废物级分,所述废物级分具有比所述细胞组合物中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比,并且在所述圆锥形流体外壳内生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,其中所述细胞组合物包含被冷冻保存并在应用所述方法之前被解冻的T细胞。在一些实施方案中,所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

[0053] 本文还提供了一种用于针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,(b)将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而从所述圆锥形流体外壳中淘洗出所述细胞组合物的废物级分,所述废物级分具有比所述细胞组合物中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比,并且在所述圆锥形流体外壳内生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,以及(c)在步骤(a)和(b)之后将所述经富集的组合物中的细胞冷冻保存,以产生冷冻保存的细胞组合物。在一些实施方案中,所述方法包括(d)在步骤(c)之后将所述冷冻保存的细胞组合物解冻。在一些实施方案中,所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

[0054] 本文还提供了一种针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,以及(b)将第二离心力和

第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物。在一些实施方案中,所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

[0055] 在一些实施方案中,所述方法包括收集所淘洗的废物级分。在一些实施方案中,将所淘洗的废物级分收集在与所述圆锥形流体外壳的宽端流体连通的容器中。

[0056] 在一些实施方案中,所述第二流速是30mL/min或更小。在一些实施方案中,所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

[0057] 本文还提供了一种针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间;以及(b)将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述细胞组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,其中(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

[0058] 在一些实施方案中,所述细胞组合物包含冷冻保存并在应用所述方法之前解冻的T细胞。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将冷冻保存的细胞组合物解冻以产生包含T细胞的细胞组合物。

[0059] 在一些实施方案中,所述第二离心力在约700G与约1,300G之间。在一些实施方案中,所述第二离心力在约800G与约1,200G之间。在一些实施方案中,所述第二离心力在约900G与约1,100G之间。在一些实施方案中,所述第二离心力是约1,000G。

[0060] 在一些实施方案中,所述第二离心力(以G计)与所述第二流速(以mL/min计)的比率在约30与约40之间。

[0061] 在一些实施方案中,(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。在一些实施方案中,(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中,所述方法包括将所述细胞组合物装载至所述离心机系统中。在一些实施方案中,所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分之前和/或期间进行。在一些实施方案中,所述装载在(a)中的所述施加之前进行。在一些实施方案中,所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分期间进行。在一些实施方案中,所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分之前和期间进行。

[0062] 在一些实施方案中,在(a)中的所述施加之前,所述方法包括使所述细胞组合物的T细胞与病毒载体颗粒接触,从而产生基因工程化T细胞。在一些实施方案中,所述细胞组合物的T细胞已经与病毒载体颗粒接触,从而产生基因工程化T细胞。在一些实施方案中,所述细胞组合物的T细胞是基因工程化T细胞。

[0063] 在一些实施方案中,所述经富集的组合物中活T细胞的百分比比所述细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约10%、大至少约20%、大至少约30%、大至少约40%、大至少约

50%或大至少约60%。

[0064] 在一些实施方案中,所述方法包括(c)将第三离心力和第三流速施加至所述离心机系统的圆锥形流体外壳中的经富集的组合物,以收集所述经富集的组合物。在一些实施方案中,(i)所述第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且(ii)所述第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。在一些实施方案中,在施加所述第三离心力和所述第三流速之前,所述方法包括使所述经富集的组合物经受一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤在所述第二离心力和所述第二流速下进行。

[0065] 在一些实施方案中,在收集后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天的所收集的经富集的组合物中活T细胞的百分比大于所述细胞组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,在收集后约1天的所收集的经富集的组合物中活T细胞的百分比大于所述细胞组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,在收集后约5天的所收集的经富集的组合物中活T细胞的百分比大于所述细胞组合物中活T细胞的百分比。

[0066] 在一些实施方案中,所述方法包括在(a)中的所述施加之前在刺激条件下孵育所述细胞组合物的T细胞。在一些实施方案中,在(a)中的所述施加之前在刺激条件下孵育所述细胞组合物的T细胞。在一些实施方案中,所述细胞组合物包含激活的细胞。在一些实施方案中,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以及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。在一些实施方案中,所述刺激试剂包含(i)与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂,以及(ii)与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂。在一些实施方案中,所述一级药剂与CD3特异性结合。在一些实施方案中,所述二级药剂与选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40和ICOS的共刺激分子特异性结合。在一些实施方案中,所述二级药剂与CD28特异性结合。

[0067] 在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂各自包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述二级药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且所述二级药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂各自存在于或附着于固体支持物的表面上。在一些实施方案中,所述固体支持物是或包括珠。在一些实施方案中,所述固体支持物是表面附着有抗CD3和抗CD28抗体的顺磁珠。在一些实施方案中,所述一级药剂和所述二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素分子或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚体颗粒试剂的表面上。在一些实施方案中,所述链霉亲和素分子或所述链霉亲和素突变蛋白分子结合至或能够结合至生物素、抗生物素蛋白、生物素类似物或生物素突变蛋白、抗生物素蛋白类似物或抗生物素蛋白突变蛋白和/或其生物活性片段。在一些实施方案中,所述一级药剂包括抗CD3 Fab,并且所述二级药剂包括抗CD28 Fab。

[0068] 在一些实施方案中,所述刺激条件包括一种或多种重组细胞因子的存在。在一些实施方案中,所述刺激条件包括重组IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种的存在。在一些实

施方案中,所述细胞组合物包含激活的T细胞。

[0069] 在一些实施方案中,所述方法包括将所收集的经富集的组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的经富集的组合物。在一些实施方案中,将所收集的经富集的组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的经富集的组合物。在一些实施方案中,将冷冻保存的经富集的组合物解冻以产生解冻的经富集的组合物,并且所述解冻的经富集的组合物中活T细胞的百分比大于所述细胞组合物中活T细胞的百分比。在一些实施方案中,所述解冻的经富集的组合物中活T细胞的百分比比所述细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%、大至少约25%或大至少约30%。

[0070] 在一些实施方案中,所述方法包括在步骤(a)和(b)的应用之后将所述经富集的组合物细胞冷冻保存,以产生冷冻保存的细胞组合物。在一些实施方案中,所述冷冻保存包括将所述细胞悬浮在包含冷冻保护剂的培养基中并冷冻所述细胞。在一些实施方案中,所述冷冻在速率受控的冷冻器中进行。

[0071] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括将所述冷冻保存的细胞组合物解冻。在一些实施方案中,在所述冷冻保存的细胞组合物已冷冻至少3天后进行所述解冻。

[0072] 在一些实施方案中,所述方法的一个或多个步骤是自动化的。在一些实施方案中,所述方法的一个或多个步骤通过离心机系统或其组件自动化。

[0073] 在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒包含编码重组分子的异源核酸。在一些实施方案中,所述重组分子是趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、抗原受体(例如,CAR或TCR)或其组合。在一些实施方案中,所述重组分子是抗原受体。在一些实施方案中,所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,是嵌合抗原受体(CAR)。

[0074] 在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体(CAR)包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含CD3- $\zeta$ (CD3 $\zeta$ )链的细胞内结构域。在一些实施方案中,所述CAR进一步包含连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些实施方案中,所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导结构域进一步包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述T细胞共刺激分子选自CD28和4-1BB。在一些实施方案中,所述CAR被重组表达。在一些实施方案中,所述CAR由载体表达。在一些实施方案中,所述CAR由 $\gamma$ 逆转录病毒载体或慢病毒载体表达。在一些实施方案中,所述CAR由慢病毒载体表达。

[0075] 在一些实施方案中,所述病毒载体颗粒是逆转录病毒载体颗粒。在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体颗粒是 $\gamma$ 逆转录病毒载体。在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体颗粒是慢病毒载体颗粒。

[0076] 在一些实施方案中,所述抗原受体特异性结合与疾病或病症相关的抗原。在一些实施方案中,所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍、和/或感染性疾病。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,所述T细胞是原代T细胞,任选地来自人受试者。

[0077] 本文提供了通过本文所提供的任何方法产生的包含基因工程化T细胞的组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含在约 $1.0 \times 10^6$ 个CAR表达T细胞与 $2.0 \times 10^9$ 个CAR表达T细胞之间。在一些实施方案中,所述组合物包含药学上可接受的载体。在一些实施方案中,

所述组合物包含冷冻保护剂。

[0078] 本文提供了一种治疗患有疾病或障碍的受试者的方法,所述方法包括将本文所提供的任何组合物施用于所述受试者。本文提供了本文所提供的任何组合物用于治疗受试者的疾病或障碍的用途。本文提供了用于治疗受试者的疾病或障碍的本文所提供的任何组合物。在一些实施方案中,所述基因工程化细胞被工程化以表达特异性结合与疾病或障碍相关的抗原的抗原受体。

## 附图说明

[0079] 图1A和图1B显示经由连续逆流离心(运行1-3)针对活细胞富集输入细胞组合物的三个不同实验的结果。图1A显示输入组合物的总活细胞和总死细胞的数量,以及连续逆流离心后的产物和废物级分。图1B显示通过连续逆流离心进行富集后活细胞的百分比的增加。

[0080] 图2A和图2B分别显示在通过病毒载体转导(通过基于连续逆流离心的方法或按比例缩小的旋转接种方法进行)后,转导的产物级分中的转导效率以及输入组合物和各种产物级分中活细胞的百分比。作为对照,通过按比例缩小的方法将细胞与病毒载体一起孵育,但经受任何离心(“无旋转”)。

[0081] 图3显示在通过病毒载体转导(通过基于连续逆流离心的方法或按比例缩小的旋转接种方法进行)后,输入组合物和各种产物级分中活细胞的百分比。经受基于连续逆流离心的转导方法的输入组合物包含30mL或60mL的总体积。

[0082] 图4A显示在基于连续逆流淘洗(CCE)的富集方法和缓冲液交换(“洗涤”)或者死端离心和缓冲液交换的替代方法后,由11名不同的人供体生成的输入组合物和洗涤的产物级分中活细胞的百分比。

[0083] 图4B显示使用基于CCE的方法或替代方法得到的洗涤前产物(“收获的产物”;HP)级分、洗涤的产物(WP)级分、配制的药物产品(FDP)级分和冷冻保存的药物产品(CDP)级分中活细胞的百分比。

[0084] 图4C显示相对于洗涤前产物(HP)级分的活力,洗涤的产物(WP)级分、配制的药物产品(FDP)级分和冷冻保存的药物产品(CDP)级分中细胞的活力。

[0085] 图4D显示洗涤前产物(HP)级分、洗涤的产物(WP)级分和洗涤的废物级分中的总活细胞和非活细胞。

[0086] 图4E显示在各种离心力下,解冻的冷冻保存的药物产品(CDP)级分与洗涤前产物(HP)级分的活力比率。

[0087] 图4F显示使用修改的基于CCE的方法或替代方法得到的最终产物产量。

[0088] 图4G显示在低、中或高细胞负荷的情况下使用修改的基于CCE的方法(Mod CCE)或替代(A1t)方法得到的解冻的冷冻保存的药物产品(CDP)级分的平均活力。

[0089] 图4H、图4I和图4J显示与替代方法相比,通过修改的基于CCE的方法产生的CDP的细胞活力的预测的改善,包括洗涤前产物(HP)级分展现出更低活力的供体(图4H)和使用替代方法展现出低活力的供体(图4J)。

[0090] 图4K显示随着修改的基于CCE的方法的洗涤体积的增加,在进入培养基中杂质的理论和测量浓度以及在离开培养基中相同杂质的理论浓度。

[0091] 图5A显示在连续逆流离心富集方法后,输入组合物以及产物和废物级分中总活细胞和非活细胞的数量。富集方法的洗涤步骤以62.5或33.3的离心力与流速比率(G/FR)进行。

[0092] 图5B显示在以62.5或33.3的离心力与流速比率(G/FR)进行的洗涤步骤后,输入组合物和洗涤的产物级分中活细胞的百分比。

[0093] 图5C显示用于活力富集的输入组合物中活(V)细胞和非活(NV)细胞的大小,所述输入组合物已经被刺激96小时(顶部图)或在开始激活后在培养物中扩增15天(底部图)。

[0094] 图6A显示在不同离心力和流速下进行基于连续逆流离心的用病毒载体转导的方法后CD3+CAR+细胞的百分比。为了比较,在按比例缩小的旋转接种转导方法后评估CD3+CAR+细胞的百分比(图6B)。

[0095] 图6C显示在3000G离心力和30mL/min流速的条件下进行基于连续逆流离心的用病毒载体转导的方法后CD3+CAR+细胞的百分比。图6D显示在基于连续逆流离心的用病毒载体转导的方法后CD3+CAR+细胞的百分比,所述方法在离心力和流速条件在整个孵育期间周期性变化的条件下进行。为了比较,使用按比例缩小的旋转接种方法(693G)用病毒载体转导细胞。

[0096] 图7A显示在基于连续逆流离心的细胞转导(采用每百万个细胞1.11 $\mu$ L或3.33 $\mu$ L的载体颗粒)后活CD45+细胞中CD3+CAR+细胞的百分比。

[0097] 图7B显示在基于连续逆流离心的细胞转导(采用每百万个细胞6 $\mu$ L的载体颗粒)后CD3+CAR+细胞的百分比。为了比较,使用按比例缩小的旋转接种方法(693G)用病毒载体转导细胞。

[0098] 图8A显示在基于连续逆流离心的转导方法后对CD3+CAR+细胞的流式细胞术分析,其中输入组合物包含30mL或60mL的总体积。结果在图8B中量化。

[0099] 图9A显示在基于连续逆流离心的转导方法后对CD3+CAR+细胞的流式细胞术分析,其中输入组合物包含600x 10<sup>6</sup>个总细胞或200x 10<sup>6</sup>个总细胞。作为对照,使15x 10<sup>6</sup>个总细胞经受按比例缩小的旋转接种转导方法。结果在图9B中量化。

[0100] 图10A显示在基于连续逆流离心的原代T细胞转导期间用取自反向离心机系统的病毒载体上清液转导后CAR+Jurkat细胞的百分比。

[0101] 图10B显示在反向离心机系统中基于连续逆流离心的转导进行30分钟或90分钟后CD3+CAR+原代T细胞的百分比。

[0102] 图11显示在基于连续逆流离心的转导方法期间连续逆流离心机系统中的病毒载体浓度和分布。

## 具体实施方式

[0103] 本文提供了通过使靶细胞(如包含在细胞组合物中的靶细胞)和病毒载体颗粒经受离心来转导细胞的方法。在一些实施方案中,所述离心方法基于连续逆流淘洗(CCE)。在一些实施方案中,所述方法涉及在如下条件下的基于CCE的离心:在离心机的外壳(例如,圆锥形外壳)中靶细胞与病毒载体颗粒多次接触,从而生成包含用病毒载体转导的多个靶细胞的组合物。在一些实施方案中,所述基于离心的转导方法还富集活的靶细胞、去除杂质或两者。还提供了含有转导的细胞群(如通过与所提供的公开文本一致的方法产生)的相关组

合物。

[0104] 还提供了将病毒载体转移至细胞(例如,T细胞)中的方法,所述方法涉及通过离心转导细胞,如免疫细胞,例如T细胞。在一些实施方案中,所提供的方法涉及使细胞(如免疫细胞(例如,T细胞))和病毒载体颗粒(如慢病毒载体)经受离心。在一些实施方案中,离心方法是或基于连续逆流淘洗(CCE)离心方法,如在反向离心机系统(例如,逆流离心机系统)中进行。在一些实施方案中,离心机系统是WO 2018/204992和WO 2019/140491中描述的那些中的任一种,将这些专利中的每一个通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中,所提供的方法涉及使细胞(如免疫细胞(例如,T细胞))和病毒载体颗粒(如慢病毒载体)在反向离心系统(例如,逆流离心系统)中经受离心,其中病毒载体颗粒循环通过系统以反复接触细胞。

[0105] 还提供了通过离心富集细胞组合物(如转导的细胞组合物)中的活细胞的方法。在一些实施方案中,细胞组合物是T细胞组合物,例如,转导的T细胞组合物。在一些实施方案中,离心方法是或基于CCE离心方法,如在反向离心机系统(例如,逆流离心系统)中进行。还提供了含有富集活细胞的细胞群(如通过根据所提供的公开文本的方法产生的)的相关组合物。

[0106] 还提供了通过离心从细胞组合物(例如,T细胞组合物)去除珠(去珠)的方法。在一些实施方案中,离心方法是或基于CCE离心方法,如在反向离心机系统(例如,逆流离心系统)中进行。还提供了含有去珠的细胞群(如通过根据所提供的公开文本的方法产生的)的相关组合物。

[0107] 反向流(也称为“逆流”)离心是这样的技术,其中在离心加速下流体中颗粒的沉降速率被支持培养基的流动抵消。颗粒由此作为流化床悬浮。反向流离心足够温和,使得可以培养细胞,使其在流化床状态下扩增。还可以减少细胞聚集。此外,由于不同的密度和形态特征,该技术能够从活细胞分离死细胞。在离心加速下将流体流径向向内输送至细胞或颗粒从而产生逆流情形。每个颗粒经历的离心加速与该颗粒距旋转中心的径向距离成比例。为了产生流化颗粒床,需要针对每个旋转半径调节抵消流速。在任一个所提供的实施方案中,由蠕动泵提供流速。这通过使室塑造为某种形状(通常塑造为圆锥体)来实现,其中圆锥体的尖端径向指向外部。逆向流体流通过圆锥体尖端输入。流体流以相对较高的速度进入圆锥体的尖端,并且由于圆锥体的横截面增大,流体流的速度随着其径向向内行进而逐渐减小。从历史上看,已经对用于反向流离心的室形状和特定锥体几何体进行了研究,如R.J.Sanderson,K.E.Bird,N.F.Palmer和J.Brenman的文章:“Design Principles for a Counter Flow Centrifugation Cell Separation Chamber”Analytical Biochemistry 71,615-622(1976)中所记录。

[0108] 在一些实施方案中,所提供的方法用于将此类细胞用异源分子进行基因工程化,所述异源分子编码重组抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR)。所得的基因工程化细胞可以用于过继免疫疗法。在一些此类实施方案中,所提供的方法可以用于制备用于过继疗法的免疫细胞(如T细胞),而不需要基于旋转接种的转导方法。在一些方面,所提供的方法针对活细胞富集细胞组合物、细胞和病毒载体颗粒组合物和/或转导的细胞群。在一些方面,活细胞的富集在具有低起始活力的组合物中更显著。在一些方面,与替代方法(例如,死端离心方法)相比,所提供的方法富集了活细胞,同时维持可比较的最终细

胞产率。

[0109] 通常,基于旋转接种的方法可以用于用病毒载体颗粒转导细胞,如免疫细胞(例如,T细胞)。然而,此类方法可能存在低数量的活细胞和/或低数量的活的转导细胞的问题,因为基于旋转接种的转导方法本身并不针对活细胞富集细胞组合物。因此,利用现有的基于旋转接种的方法,可能不总是能够转导具有维持的活力的大量细胞以供下游用途(例如,用于细胞疗法中)。

[0110] 此外,与替代方法和系统相比,借助于以连续指数速率稀释杂质的连续逆流离心系统,改善了细胞组合物中杂质的清除。在一些方面,杂质可以包括蛋白质、DNA、细胞碎片、制造中使用的一种或多种试剂或其任何组合。

[0111] 此外,用于离心的替代方法和系统不一定是自动化的和/或集成至其他系统中。相比之下,本文提供的方法的不同步骤可以使用连续逆流离心系统(例如,CTS Rotea™逆流离心系统)自动化。此外,此类系统是相容的并且可以与其他仪器和系统集成。

[0112] 所提供的方法基于以下观察结果:基于连续逆流淘洗的离心方法(如在反向离心机系统(例如,CTS Rotea™逆流离心系统)中进行)可以实现对从受试者获得的原代细胞的充分转导,并且可以针对活细胞富集细胞组合物。

[0113] 在一些实施方案中,所述方法能够实现至少特定数量或百分比的活细胞。例如,在一些实施方案中,通过所述方法产生的组合物中至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%或至少80%的细胞是活的。在一些实施方案中,所述方法产生比输入组合物具有更大百分比(例如,比输入组合物大5%、10%、15%或20%)的活细胞的输出组合物。

[0114] 在一些此类实施方案中,可以通过测量指示细胞活力或其缺乏的标记物的表达水平来监测和/或观察活细胞的数量或百分比。可以使用许多熟知的用于评估细胞活力的方法,如检测细胞死亡标记物,如染色质凝聚、膜联蛋白V、半胱天冬酶、碘化丙啶(PI)和/或磷脂酰丝氨酸(PS),例如在细胞表面蛋白的情况下如通过流式细胞术或细胞染色(例如,免疫组织化学)来检测。在一些例子中,通过检测由细胞产生的分子如乳酸脱氢酶(LDH)或三磷酸腺苷(ATP)的水平来测量表达。

[0115] 在一些实施方案中,所述方法可以用于转导T细胞群,在该T细胞群中至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的T细胞是活T细胞,如缺乏细胞死亡标记物(如表面标记物或分泌的分子或其他标记物)的T细胞。

[0116] 在一些实施方案中,所述方法产生输出组合物,其中输出组合物中至少25%、至少30%、至少40%、至少50%或至少75%的总细胞(或特定靶细胞类型,如T细胞)是活的和/或不表达细胞死亡标记物,如表面标记物或分泌的分子或其他标记物。

[0117] 在一些实施方案中,所提供的方法导致免疫细胞(例如,T细胞)的相对较高活力。在一些实施方案中,根据所提供的方法,细胞群(例如,输出组合物)中至少5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的细胞(如T细胞)是活的。

[0118] 在一些实施方案中,输出组合物中不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、

40%、45%、50%、55%或60%的T细胞是非活细胞,表达选自膜联蛋白V、半胱天冬酶、碘化丙啶(PI)和/或磷脂酰丝氨酸(PS);和/或分泌相对较高水平的LDH和/或相对较低水平的ATP。例如,在一些方面,输入组合物和/或输出组合物的细胞群是这样的细胞群,其中至少40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%对膜联蛋白V、半胱天冬酶、碘化丙啶(PI)和/或磷脂酰丝氨酸(PS)呈表面阴性。

[0119] 用于评估细胞活力的方法和技术是本领域已知的。用于检测此类标记物的抗体和试剂是本领域熟知的,并且容易获得。

[0120] 在一些实施方案中,所述方法能够在某些条件下实现至少特定的转导效率。例如,在一些实施方案中,在输入组合物按以下比率包含病毒和细胞的情况下:从或从约每个细胞1个感染单位(IU)至每个细胞10个IU,如至少或为或约每个细胞1个感染单位(IU),或至少或为或约每个细胞2个IU,至少或为或约每个细胞5个IU,或至少或为或约每个细胞10个IU,方法能够产生这样的输出组合物,其中通过所述方法产生的组合物中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%或至少75%的细胞例如已经用病毒载体转导。

[0121] 在一些此类实施方案中,可以在将病毒载体转导或以其他方式转移至细胞(如活宿主细胞如活T细胞,或其细胞群)中后,通过测量由病毒载体的基因组中所含的核酸编码的重组分子或重组蛋白(如异源抗原受体)的表达水平监测和/或观察用病毒载体颗粒转导细胞的效率。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,通过检测转导标记物和/或报告物构建体来测量表达。在一些实施方案中,编码截短的表面蛋白的核酸包含在载体内并用作其表达和/或增强的标记物。

[0122] 在一些实施方案中,所提供的方法可以包括在用病毒颗粒孵育(例如,转导)细胞之前或之后的冷冻保存步骤。在一些实施方案中,所提供的方法可以包括在用病毒颗粒孵育(例如,转导)细胞之前的冷冻保存步骤。在一些实施方案中,这个步骤可以在过程中提供中断步骤,以允许运送材料,对材料取样或在患者的病症期间“保持”治疗。在一些实施方案中,通过所提供的方法实现的细胞活力的富集在冷冻保存的药物产品或先前冷冻保存的解冻的药物产品中维持。在一些实施方案中,通过所提供的方法实现的细胞活力的富集在冷冻保存的药物产品中维持。在一些实施方案中,通过所提供的方法实现的细胞活力的富集在先前冷冻保存的解冻的药物产品中维持。

[0123] 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和不需要使用无菌室或无菌柜的情况下进行。在这种过程的一些实施方案中,将细胞针对活力进行富集和/或转导,所有这些都发生在封闭系统内。在一些实施方案中,封闭系统是或包括反向离心机系统的圆锥形外壳。在一些实施方案中,以自动化方式进行所述方法或其任何部分。在一些实施方案中,整个方法是以自动化方式进行的。

[0124] 在一些实施方案中,所提供的方法提供了优化或改进的过程,其中在不存在旋转接种的情况下,将细胞转导和/或针对细胞活力进行富集,从而改进下游处理和产物。在一些方面,所提供的方法还可以产生用于向受试者施用具有更好或更期望的表型的转导细胞,例如更多活细胞。

[0125] 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施用于受试者以治疗疾病或病症。

[0126] 在一些实施方案中,所提供的方法包括向受试者施用次最佳剂量的细胞。在一些实施方案中,细胞的所述剂量比用于治疗疾病或病症的细胞的治疗有效剂量低小于或小于约1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在这种例子中,扩增细胞以产生治疗有效量的细胞可以在将细胞施用于受试者之后在体内发生。

[0127] 在一些实施方案中,所提供的方法包括细胞的体内扩增。在一些方面,细胞的体内扩增可以通过所施用细胞的转基因特异性激活或刺激在体内发生。在一些实施方案中,抗原受体(例如,CAR)在识别抗原后被刺激,例如被激活或扩增。在一些实施方案中,向受试者施用一种或多种药剂以加强、扩大或增加受试者体内细胞的刺激、激活或扩增。

[0128] 在一些实施方案中,所提供的方法产生基因工程化T细胞,在将其施用于受试者时,展现出增加的持久性和/或扩增。在一些实施方案中,具有增加的持久性和/或扩增的基因工程化细胞在施用其的受试者中展现出更好的效力。在一些实施方案中,所提供的病毒载体颗粒和方法降低了过继免疫治疗方法中治疗结果的变异性,例如,通过最小化和/或减少施用于受试者之前对T细胞的离体操作。在一些实施方案中,通过减少离体操作所需的时间和试剂,在转导之前或与转导并行进行的针对活T细胞的富集改进了产生或制备用于过继免疫疗法的基因工程化T细胞的过程。在一些实施方案中,针对转导或工程化细胞的选择是在基因工程化之后进行。

[0129] 所提供的实施方案还包括通过本文提供的任何方法产生的基因工程化细胞,如表达重组抗原受体(例如,TCR或CAR)的细胞,以及此类基因工程化细胞用于过继免疫疗法的方法和用途。

[0130] 将在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,其并入程度如同将每个单独出版物通过引用单独并入一般。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。

[0131] 本文所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。

#### I. 转导细胞的方法

[0132] 提供了用于在离心机系统中产生基因工程化T细胞的组合物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在离心机系统中用病毒载体颗粒转导包含细胞组合物的输入组合物。在一些实施方案中,离心机系统是连续逆流淘洗(“CCE”)离心机系统,也称为反向离心机系统。在一些实施方案中,产生的细胞用于细胞疗法中,如制备用于自体或同种异体转移(例如,在过继细胞疗法中)的原代细胞。所述方法可以包括另外的细胞处理步骤,如细胞洗涤、分离、分开、收集、配制或与产生细胞组合物相关的其他步骤。

[0133] 在一些实施方案中,所提供的方法用于将病毒载体颗粒(如逆转录病毒载体颗粒)引入细胞(如T细胞)中。在一些实施方案中,病毒载体颗粒含有编码抗原受体(如嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR))的异源多核苷酸。因此,在一些实施方案中,所提供的方法可以用于在细胞(例如,T细胞)中表达基因工程化抗原受体,如转基因TCR或CAR。还提供了由此类颗粒转导的细胞以及含有此类细胞的方法和组合物,以及使用它们的方法。

[0134] 在一些实施方案中,所述方法包括导致转导细胞和/或其某些群体或亚群的活力

增加(这是对于在过继免疫疗法中使用所期望的)的特征。在一些实施方案中,所提供的方法富集了活细胞,包括活的基因工程化细胞。因此,在一些实施方案中,与转导之前相比,由所提供的方法产生的细胞组合物在转导后展现出增加的活力。在一些实施方案中,增加的活力在转导后立即被观察到和/或在转导后维持一段时间(例如,数小时或数天)。

#### A. 输入组合物

[0135] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及通过以下方式将T细胞基因工程化:使包含T细胞的细胞组合物与含有编码抗原受体的异源多核苷酸的病毒载体颗粒(共同称为“输入组合物”)在离心机系统中接触。在一些实施方案中,所述方法涉及将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床。在一些实施方案中,所述方法包括在施加第一离心力和第一流速之前将细胞组合物装载至圆锥形流体外壳中。

[0136] 在一些实施方案中,离心机系统包括在圆锥形流体外壳内的套管。在一些实施方案中,套管沿着圆锥形流体外壳的长度延伸。在一些实施方案中,套管的一端在圆锥形流体外壳的尖端处或附近。在一些实施方案中,套管的另一端在圆锥形流体外壳的宽端处或附近,如在宽端的中心处或附近。

[0137] 在一些实施方案中,将细胞组合物经由套管装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将细胞组合物在圆锥形流体外壳的尖端处或附近装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,通过以下方式将细胞组合物装载至圆锥形流体外壳中:在圆锥形流体外壳的宽端处或附近进入套管的末端并且在圆锥形流体外壳的尖端处或附近离开套管的末端。

[0138] 在一些实施方案中,所述方法包括将病毒载体颗粒装载至离心机系统的圆锥形流体外壳中,其中包含细胞组合物和病毒载体颗粒的所得组合物是输入组合物。在一些实施方案中,与施加第一离心力和第一流速并行进行或在其期间进行病毒载体颗粒的装载。

[0139] 在一些实施方案中,将病毒载体颗粒经由套管装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将病毒载体颗粒在圆锥形流体外壳的尖端处或附近装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,通过以下方式将病毒载体颗粒装载至圆锥形流体外壳中:在圆锥形流体外壳的宽端处或附近进入套管的末端并且在圆锥形流体外壳的尖端处或附近离开套管的末端。

[0140] 在一些实施方案中,所述方法包括向输入组合物施加第二离心力和第二流速。在一些实施方案中,第二离心力和第二流速使病毒载体颗粒在离心机系统的流体路径中再循环。因此,在一些实施方案中,病毒载体颗粒在通过离心机系统再循环期间反复接触细胞流化床。在一些实施方案中,所述方法产生表达抗原受体的基因工程化T细胞。

[0141] 在一些实施方案中,施加第二离心力和第二流速从而将细胞组合物的废物级分从圆锥形流体外壳淘洗出。在一些实施方案中,淘洗的废物级分具有比细胞组合物中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比。

[0142] 在一些实施方案中,淘洗的细胞经由圆锥形流体外壳的宽端处的开口离开圆锥形流体外壳。在一些实施方案中,开口在圆锥形流体外壳的宽端处或附近至少部分地围绕套管的末端。在一些实施方案中,开口在圆锥形流体外壳的宽端处或附近围绕套管的末端。

[0143] 在一些实施方案中,所述方法涉及收集所淘洗的废物级分。在一些实施方案中,将

所淘洗的废物级分收集在容器中。在一些实施方案中,容器与圆锥形流体外壳的宽端流体连通。

[0144] 在一些实施方案中,施加第二离心力和第二流速从而在圆锥形流体外壳内产生经富集的组合物,所述经富集的组合物具有比细胞组合物中的活T细胞百分比更高的活T细胞百分比。

[0145] 在一些实施方案中,与施加第二离心力和第二流速并行进行或在其期间进行病毒载体颗粒的装载。在一些实施方案中,在施加第二离心力和第二流速的至少一部分期间,病毒载体颗粒存在于离心机系统中。

[0146] 在一些实施方案中,所述方法包括(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床;(b)将含有编码抗原受体的异源多核苷酸的病毒载体颗粒装载至圆锥形流体外壳中,从而生成包含细胞组合物和病毒载体颗粒的输入组合物;以及(c)将第二离心力和第二流速施加至输入组合物,其中第二离心力和第二流速使病毒载体颗粒在离心机系统的流体路径中再循环,使得病毒载体颗粒反复接触细胞流化床,从而生成基因工程化T细胞。

[0147] 在一些实施方案中,所述方法涉及向包含含有编码抗原受体的异源多核苷酸的病毒载体颗粒和含有T细胞的细胞组合物的输入组合物施加第一离心力和第一流速。在一些实施方案中,当施加第一离心力和第一流速时,病毒载体颗粒和细胞组合物二者都存在于离心机系统的圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,施加第一离心力和第一流速产生了细胞流化床。在一些实施方案中,所述方法包括在施加第一离心力和第一流速之前将细胞组合物和病毒载体颗粒装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,细胞组合物的装载在病毒载体颗粒的装载之前、期间和/或之后。在一些实施方案中,所述方法包括在施加第一离心力和第一流速之前将输入组合物装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,在施加第一离心力和第一流速之前或期间,将细胞组合物和/或病毒载体颗粒装载至圆锥形流体外壳中。

[0148] 在一些实施方案中,第一离心力在约625G与约3,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力在约625G与约3,000G之间、在约625G与约2,500G之间、在约625G与约2,000G之间、在约625G与约1,500G之间、在约625G与约1,000G之间、在约1,000G与约3,000G之间、在约1,000G与约2,500G之间、在约1,000G与约2,000G之间、在约1,000G与约1,500G之间、在约1,500G与约3,000G之间、在约1,500G与约2,500G之间、在约1,500G与约2,000G之间、在约2,000G与约3,000G之间、在约2,000G与约2,500G之间或在约2,500G与约3,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力在约2,000G与约4,000G之间。

[0149] 在一些实施方案中,第一离心力在约1,000G与约5,000G之间、在约1,500G与约4,500G之间、在约2,000G与约4,000G之间、在约1,500G与约3,500G之间或在约2,000G与约3,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力是约1,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约1,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约2,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约2,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约3,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约3,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约4,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约4,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约5,000G。

[0150] 在一些实施方案中,第一流速是径向向内的。在一些实施方案中,第一流速被引导

远离圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第一离心力被第一流速抵消。在一些实施方案中,第一流速是逆流流速。

[0151] 在一些实施方案中,第一流速受通过套管的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过套管的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开套管以在其尖端处进入圆锥形流体外壳。

[0152] 在一些实施方案中,第一流速在约1mL/min与约20mL/min之间、在约3mL/min与约18mL/min之间、在约5mL/min与约15mL/min之间或在约8mL/min与约12mL/min之间。在一些实施方案中,第一流速是约1mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约3mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约5mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约8mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约9mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约10mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约11mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约12mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约15mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约18mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约20mL/min。

[0153] 在一些实施方案中,第一流速在约1mL/min与约50mL/min之间、在约1mL/min与约40mL/min之间、在约1mL/min与约30mL/min之间、在约1mL/min与约20mL/min之间、在约1mL/min与约10mL/min之间、在约10mL/min与约50mL/min之间、在约10mL/min与约40mL/min之间、在约10mL/min与约30mL/min之间、在约10mL/min与约20mL/min之间、在约20mL/min与约50mL/min之间、在约20mL/min与约40mL/min之间、在约20mL/min与约30mL/min之间、在约30mL/min与约50mL/min之间、在约30mL/min与约40mL/min或在约40mL/min与约50mL/min之间。在一些实施方案中,第一流速在约10mL/min与约40mL/min之间。

[0154] 在一些实施方案中,第一流速在约10mL/min与约50mL/min之间、在约20mL/min与约50mL/min之间、在约30mL/min与约50mL/min之间或在约35mL/min与约45mL/min之间。在一些实施方案中,第一流速是约40mL/min。

[0155] 在一些实施方案中,第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii) 第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。

[0156] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约200与约400之间。除非另有说明,否则本文中的离心力与流速比率是以G计的离心力与以mL/min计的流速的比率。

[0157] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约200与约400之间、在约225与约375之间、在约250与约350之间或在约275与约325之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约200。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约200。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约225。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约250。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约275。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约300。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约325。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约350。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约375。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约400。在一些实施方案中,第一离心力是约3,000G并且第一流速是约10mL/min。

[0158] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约20与200之间、在约20与

180之间、在约20与160之间、在约20与140之间、在约20与120之间、在约20与100之间、在约20与80之间、在约20与60之间、在约20与40之间、在约40与200之间、在约40与180之间、在约40与160之间、在约40与140之间、在约40与120之间、在约40与100之间、在约40与80之间、在约40与60之间、在约60与200之间、在约60与180之间、在约60与160之间、在约60与140之间、在约60与120之间、在约60与100之间、在约60与80之间、在约80与200之间、在约80与180之间、在约80与160之间、在约80与140之间、在约80与120之间、在约80与100之间、在约100与200之间、在约100与180之间、在约100与160之间、在约100与140之间、在约100与120之间、在约120与200之间、在约120与180之间、在约120与160之间、在约120与140之间、在约140与200之间、在约140与180之间、在约140与160之间、在约160与200之间、在约160与180或在约180与200之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约40与200之间、在约40与180之间、在约40与160之间、在约40与140之间、在约40与120之间、在约40与100之间、在约40与80之间或在约50与60之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约62.5。

[0159] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约62.5与300之间、在约62.5与250之间、在约62.5与200之间、在约62.5与150之间或在约62.5与100之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约62.5。

[0160] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约62.5与300之间、在约100与300之间、在约150与300之间、在约200与300之间以及在约250与300之间。

[0161] 在一些实施方案中,第一离心力是约2500G并且第一流速是约40mL/min。

[0162] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约15秒、约30秒、约45秒、约60秒、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约10分钟或约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约15秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约30秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约45秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约60秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在约1分钟与约15分钟之间、在约3分钟与约12分钟之间或在约5分钟与约10分钟之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约1分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约2分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约3分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约4分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约5分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约6分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约7分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约8分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约9分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约10分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约11分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约12分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约13分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约14分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,至

少持续直至建立细胞流化床。

[0163] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约15秒、至少约30秒、至少约45秒、至少约60秒、至少约2分钟、至少约3分钟,至少约4分钟、至少约5分钟、至少约10分钟或至少约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约15秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约20秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约25秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约30秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约45秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约60秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约2分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约3分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约4分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约5分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约10分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约15分钟。

[0164] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约15秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约25秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约30秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约15秒与2分钟之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约25秒与2分钟之间。

[0165] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,直至预定数量的细胞被装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,直至预定数量的细胞成为细胞流化床的一部分。在一些实施方案中,预定数量的细胞是预定数量的T细胞。在一些实施方案中,预定数量的细胞(例如,T细胞)是如下数量的细胞(例如,T细胞):在约1000万与1亿之间、在约1000万与9000万之间、在约1000万与8000万之间、在约1000万与7000万之间、在约1000万与6000万之间、在约1000万与5000万之间、在约1000万与4000万之间、在约1000万与3000万之间、在约1000万与2000万之间、在约2000万与1亿之间、在约2000万与9000万之间、在约2000万与8000万之间、在约2000万与7000万之间、在约2000万与6000万之间、在约2000万与5000万之间、在约2000万与4000万之间、在约2000万与3000万之间、在约3000万与1亿之间、在约3000万与9000万之间、在约3000万与8000万之间、在约3000万与7000万之间、在约3000万与6000万之间、在约3000万与5000万之间、在约3000万与4000万之间、在约4000万与1亿之间、在约4000万与9000万之间、在约4000万与8000万之间、在约4000万与7000万之间、在约4000万与6000万之间、在约4000万与5000万之间、在约5000万与1亿之间、在约5000万与9000万之间、在约5000万与8000万之间、在约5000万与7000万之间、在约5000万与6000万之间、在约6000万与1亿之间、在约6000万与9000万之间、在约6000万与8000万之间、在约6000万与7000万之间、在约7000万与1亿之间、在约7000万与9000万之间、在约7000万与8000万之间、在约8000万与1亿之间、在约8000万与9000万之间或在约9000万与1亿之间。在一些实施方案中,预定数量的细胞(例如,T细胞)是约5000万个细胞(例如,T细胞)。

[0166] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约15秒、约30秒、约45秒、约60秒、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约10分钟或约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约15秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约30秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约45秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约60秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,持续在约1分钟与约15分钟之间、在约3分钟与约12分钟之间或在约5分钟与约10分钟之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约1分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约2分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约3分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约4分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约5分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约6分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约7分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约8分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约9分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约10分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约11分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约12分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约13分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约14分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,至少持续直至建立细胞流化床。

[0167] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约15秒、至少约30秒、至少约45秒、至少约60秒、至少约2分钟、至少约3分钟,至少约4分钟、至少约5分钟、至少约10分钟或至少约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约15秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约20秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约25秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约30秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约45秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约60秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约2分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约3分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约4分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约5分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约10分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物至少约15分钟。

[0168] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,持续在或在约15秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,持续在或在约25秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,持续在或在约30秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,持续在或在约15秒与2分钟之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施

加至输入组合物,持续在或在约25秒与2分钟之间。

[0169] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,直至预定数量的细胞被装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至输入组合物,直至预定数量的细胞成为细胞流化床的一部分。在一些实施方案中,预定数量的细胞是预定数量的T细胞。在一些实施方案中,预定数量的细胞(例如,T细胞)是如下数量的细胞(例如,T细胞):在约1000万与1亿之间、在约1000万与9000万之间、在约1000万与8000万之间、在约1000万与7000万之间、在约1000万与6000万之间、在约1000万与5000万之间、在约1000万与4000万之间、在约1000万与3000万之间、在约1000万与2000万之间、在约2000万与1亿之间、在约2000万与9000万之间、在约2000万与8000万之间、在约2000万与7000万之间、在约2000万与6000万之间、在约2000万与5000万之间、在约2000万与4000万之间、在约2000万与3000万之间、在约3000万与1亿之间、在约3000万与9000万之间、在约3000万与8000万之间、在约3000万与7000万之间、在约3000万与6000万之间、在约3000万与5000万之间、在约3000万与4000万之间、在约4000万与1亿之间、在约4000万与9000万之间、在约4000万与8000万之间、在约4000万与7000万之间、在约4000万与6000万之间、在约4000万与5000万之间、在约5000万与1亿之间、在约5000万与9000万之间、在约5000万与8000万之间、在约5000万与7000万之间、在约5000万与6000万之间、在约6000万与1亿之间、在约6000万与9000万之间、在约6000万与8000万之间、在约6000万与7000万之间、在约7000万与1亿之间、在约7000万与9000万之间或在约9000万与1亿之间。在一些实施方案中,预定数量的细胞(例如,T细胞)是约5000万个细胞(例如,T细胞)。

[0170] 在一些实施方案中,第二流速是径向向内的。在一些实施方案中,第二流速被引导远离圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第二离心力被第二流速抵消。在一些实施方案中,第二流速是逆流流速。

[0171] 在一些实施方案中,第二流速受通过套管的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过套管的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开套管以在其尖端处进入圆锥形流体外壳。

[0172] 在其他实施方案中,第二流速是径向向外的。在一些实施方案中,第二流速被引导朝向圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第二离心力和第二流速在相同或基本相同的方向上。

[0173] 在一些实施方案中,第二流速受通过圆锥形流体外壳的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过圆锥形流体外壳的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开圆锥形流体外壳的尖端进入套管。

[0174] 在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约2,000G之间、在约200G与约1800G之间、在约500G与约1,500G或在约750G与约1,250G之间。在一些实施方案中,第二离心力是约250G。在一些实施方案中,第二离心力是约500G。在一些实施方案中,第二离心力是约600G。在一些实施方案中,第二离心力是约700G。在一些实施方案中,第二离心力是约800G。在一些实施方案中,第二离心力是约900G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,000G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,100G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,200G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,300G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,400G。在一些

实施方案中,第二离心力是约1,500G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,300G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,750G。在一些实施方案中,第二离心力是约2,000G。

[0175] 在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约4,000G之间、在约100G与约3,750G之间、在约100G与约3,500G之间、在约100G与约3,250G之间、在约100G与约3,000G之间、在约100G与约2,750G之间、在约100G与约2,500G之间、在约100G与约2,250G之间、在约100G与约2,000G之间、在约100G与约1,750G之间、在约100G与约1,500G之间、在约100G与约1,250G之间、在约100G与约1,000G之间、在约100G与约750G之间、在约100G与约500G之间、在约100G与约250G之间、在约250G与约4,000G之间、在约250G与约3,750G之间、在约250G与约3,500G之间、在约250G与约3,250G之间、在约250G与约3,000G之间、在约250G与约2,750G之间、在约250G与约2,500G之间、在约250G与约2,250G之间、在约250G与约2,000G之间、在约250G与约1,750G之间、在约250G与约1,500G之间、在约250G与约1,250G之间、在约250G与约1,000G之间、在约250G与约750G之间、在约250G与约500G之间、在约500G与约4,000G之间、在约500G与约3,750G之间、在约500G与约3,500G之间、在约500G与约3,250G之间、在约500G与约3,000G之间、在约500G与约2,750G之间、在约500G与约2,500G之间、在约500G与约2,250G之间、在约500G与约2,000G之间、在约500G与约1,750G之间、在约500G与约1,500G之间、在约500G与约1,250G之间、在约500G与约1,000G之间、在约500G与约750G之间、在约750G与约4,000G之间、在约750G与约3,750G之间、在约750G与约3,500G之间、在约750G与约3,250G之间、在约750G与约3,000G之间、在约750G与约2,750G之间、在约750G与约2,500G之间、在约750G与约2,250G之间、在约750G与约2,000G之间、在约750G与约1,750G之间、在约750G与约1,500G之间、在约750G与约1,250G之间、在约750G与约1,000G之间、在约1,000G与约4,000G之间、在约1,000G与约3,750G之间、在约1,000G与约3,500G之间、在约1,000G与约3,250G之间、在约1,000G与约3,000G之间、在约1,000G与约2,750G之间、在约1,000G与约2,500G之间、在约1,000G与约2,250G之间、在约1,000G与约2,000G之间、在约1,000G与约1,750G之间、在约1,000G与约1,500G之间、在约1,000G与约1,250G之间、在约1,250G与约4,000G之间、在约1,250G与约3,750G之间、在约1,250G与约3,500G之间、在约1,250G与约3,250G之间、在约1,250G与约3,000G之间、在约1,250G与约2,750G之间、在约1,250G与约2,500G之间、在约1,250G与约2,250G之间、在约1,250G与约2,000G之间、在约1,250G与约1,750G之间、在约1,250G与约1,500G之间、在约1,500G与约4,000G之间、在约1,500G与约3,750G之间、在约1,500G与约3,500G之间、在约1,500G与约3,250G之间、在约1,500G与约3,000G之间、在约1,500G与约2,750G之间、在约1,500G与约2,500G之间、在约1,500G与约2,250G之间、在约1,500G与约2,000G之间、在约1,500G与约1,750G之间、在约1,750G与约4,000G之间、在约1,750G与约3,750G之间、在约1,750G与约3,500G之间、在约1,750G与约3,250G之间、在约1,750G与约3,000G之间、在约1,750G与约2,750G之间、在约1,750G与约2,500G之间、在约1,750G与约2,250G之间、在约1,750G与约2,000G之间、在约2,000G与约4,000G之间、在约2,000G与约3,750G之间、在约2,000G与约3,500G之间、在约2,000G与约3,250G之间、在约2,000G与约3,000G之间、在约2,000G与约2,750G之间、在约2,000G与约2,500G之间、在约2,000G与约2,250G之间、在约2,250G与约4,000G之间、在约2,250G与约3,750G之间、在约2,250G与约3,500G之间、在约2,250G与约3,250G之间、在约2,250G与约3,000G之间、在约2,250G与约2,750G之间、在约2,250G与约2,500G之间、在约2,500G与约4,

000G之间、在约2,500G与约3,750G之间、在约2,500G与约3,500G之间、在约2,500G与约3,250G之间、在约2,500G与约3,000G之间、在约2,500G与约2,750G之间、在约2,750G与约4,000G之间、在约2,750G与约3,750G之间、在约2,750G与约3,500G之间、在约2,750G与约3,250G之间、在约2,750G与约3,000G之间、在约3,000G与约4,000G之间、在约3,000G与约3,750G之间、在约3,000G与约3,500G之间、在约3,000G与约3,250G之间、在约3,250G与约4,000G之间、在约3,250G与约3,750G之间、在约3,250G与约3,500G之间、在约3,500G与约4,000G之间、在约3,500G与约3,750G或在约3,750G与约4,000G之间。

[0176] 在一些实施方案中,第二离心力在约500G与约1,500G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约500G与约1,500G之间、在约500G与约1,400G之间、在约500G与约1,300G之间、在约500G与约1,200G之间、在约500G与约1,100G之间、在约500G与约1,000G之间、在约500G与约900G之间、在约500G与约800G之间或在约500G与约700G之间。在一些实施方案中,第二离心力是约625G。

[0177] 在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约2,000G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约2,000G之间、在约100G与约1,900G之间、在约100G与约1,800G之间、在约100G与约1,700G之间、在约100G与约1,600G之间、在约100G与约1,500G之间、在约100G与约1,400G之间、在约100G与约1,300G之间、在约100G与约1,200G之间、在约100G与约1,100G之间、在约100G与约1,000G之间、在约100G与约900G之间、在约100G与约800G之间、在约100G与约700G之间、在约100G与约600G之间、在约100G与约500G之间或在约100G与约400G之间。在一些实施方案中,第二离心力是约300G。

[0178] 在一些实施方案中,第二流速在约10与约100mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第二离心力在约100G与约2,000G之间;并且(ii) 第二流速在约10mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii) 第二流速在约10mL/min与约100mL/min之间。

[0179] 在一些实施方案中,第二流速在约10与约100mL/min之间、在约15与约90mL/min之间、在约20与约80mL/min之间、在约25与约70mL/min之间、在约30与约60mL/min之间或在约35与约50mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速是约20mL/min、约21mL/min、约22mL/min、约23mL/min、约24mL/min、约25mL/min、约25.5mL/min、约26mL/min、约26.5mL/min、约27mL/min、约27.5mL/min、约28mL/min、约28.5mL/min、约29mL/min、约29.5mL/min、约30mL/min、约31mL/min、约32mL/min、约33mL/min、约34mL/min或约35mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约25mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约25.5mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约26mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约26.5mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约27mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约27.5mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约28mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约28.5mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约29mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约29.5mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约30mL/min。

[0180] 在一些实施方案中,第二流速在约5与约100mL/min之间、在约5与约90mL/min之间、在约5与约80mL/min之间、在约5与约70mL/min之间、在约5与约60mL/min之间、在约5与约50mL/min之间、在约5与约40mL/min之间、在约5与约30mL/min之间、在约5与约25mL/min之间、在约5与约20mL/min之间、在约5与约15mL/min之间、在约5与约10mL/min之间、在约10

与约100mL/min之间、在约10与约90mL/min之间、在约10与约80mL/min之间、在约10与约70mL/min之间、在约10与约60mL/min之间、在约10与约50mL/min之间、在约10与约40mL/min之间、在约10与约30mL/min之间、在约10与约25mL/min之间、在约10与约20mL/min之间、在约10与约15mL/min之间、在约15与约100mL/min之间、在约15与约90mL/min之间、在约15与约80mL/min之间、在约15与约70mL/min之间、在约15与约60mL/min之间、在约15与约50mL/min之间、在约15与约40mL/min之间、在约15与约30mL/min之间、在约15与约25mL/min之间、在约15与约20mL/min之间、在约20与约100mL/min之间、在约20与约90mL/min之间、在约20与约80mL/min之间、在约20与约70mL/min之间、在约20与约60mL/min之间、在约20与约50mL/min之间、在约20与约40mL/min之间、在约20与约30mL/min之间、在约20与约25mL/min之间、在约25与约100mL/min之间、在约25与约90mL/min之间、在约25与约80mL/min之间、在约25与约70mL/min之间、在约25与约60mL/min之间、在约25与约50mL/min之间、在约25与约40mL/min之间、在约25与约30mL/min之间、在约30与约100mL/min之间、在约30与约90mL/min之间、在约30与约80mL/min之间、在约30与约70mL/min之间、在约30与约60mL/min之间、在约30与约50mL/min之间、在约30与约40mL/min之间、在约40与约100mL/min之间、在约40与约90mL/min之间、在约40与约80mL/min之间、在约40与约70mL/min之间、在约40与约60mL/min之间、在约40与约50mL/min之间、在约50与约100mL/min之间、在约50与约90mL/min之间、在约50与约80mL/min之间、在约50与约70mL/min之间、在约50与约60mL/min之间、在约60与约100mL/min之间、在约60与约90mL/min之间、在约60与约80mL/min之间、在约60与约70mL/min之间、在约70与约100mL/min之间、在约70与约90mL/min之间、在约70与约80mL/min之间、在约80与约100mL/min之间、在约80与约90mL/min或在约90与约100mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速在约10mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

[0181] 在一些实施方案中,(i)第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

[0182] 在一些实施方案中,第二流速在约5与约40mL/min之间、在约5与约35mL/min之间、在约5与约30mL/min之间、在约5与约25mL/min之间、在约5与约20mL/min之间或在约5与约15mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速是约10mL/min。

[0183] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约20与约100之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约25与约85之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约30与约65之间。

[0184] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约20与约100之间、在约25与约80之间或在约30与约60之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约20。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约25。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约30。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约35。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约40。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约45。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约50。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约55。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约60。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约65。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约70。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的

比率是约75。在一些实施方案中,第二离心力是约1,000G并且第二流速是约28.5mL/min。

[0185] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约20与200之间、在约20与180之间、在约20与160之间、在约20与140之间、在约20与120之间、在约20与100之间、在约20与80之间、在约20与60之间、在约20与40之间、在约40与200之间、在约40与180之间、在约40与160之间、在约40与140之间、在约40与120之间、在约40与100之间、在约40与80之间、在约40与60之间、在约60与200之间、在约60与180之间、在约60与160之间、在约60与140之间、在约60与120之间、在约60与100之间、在约60与80之间、在约80与200之间、在约80与180之间、在约80与160之间、在约80与140之间、在约80与120之间、在约80与100之间、在约100与200之间、在约100与180之间、在约100与160之间、在约100与140之间、在约100与120之间、在约120与200之间、在约120与180之间、在约120与160之间、在约120与140之间、在约140与200之间、在约140与180之间、在约140与160之间、在约160与200之间、在约160与180或在约180与200之间。

[0186] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约20与100之间、在约20与80之间、在约20与60之间或在约20与40之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约30。在一些实施方案中,第二离心力是约300G并且第二流速是约10mL/min。

[0187] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约40与200之间、在约40与180之间、在约40与160之间、在约40与140之间、在约40与120之间、在约40与100之间、在约40与80之间或在约50与60之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约62.5。在一些实施方案中,第二离心力是约625G并且第二流速是约10mL/min。

[0188] 在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物,持续在约5分钟与约100分钟之间、在约10分钟与约90分钟之间、在约15分钟与约80分钟之间、在约20分钟与约70分钟之间、在约25分钟与约60分钟之间、在约30分钟与约50分钟之间或在约35分钟与约40分钟之间。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约5分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约10分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约15分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约20分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约25分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约30分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约45分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约60分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约75分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物约90分钟。

[0189] 在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物至少约15分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物至少约30分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物至少约45分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物至少约60分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物至少约75分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物至少约90分钟。

[0190] 在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速连续施加至输入组合物。

[0191] 在其他实施方案中,将第二离心力和第二流速非连续地施加至输入组合物。在一

些实施方案中,将第二离心力和第二流速间歇地施加至输入组合物。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速以规律发生的间隔施加至输入组合物。

[0192] 在任一个前述实施方案中,向输入组合物施加第二离心力和第二流速的时间量可以是非连续地施加第二离心力和第二流速的总时间量。例如,在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速非连续地施加至输入组合物,在30分钟的时间段期间持续总共在约5分钟与约25分钟之间。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至输入组合物,在30分钟的时间段期间持续总共约15分钟。

[0193] 在一些实施方案中,在第一时间段中将第二离心力和第二流速施加至输入组合物,随后是第二时间段,其中未将第二离心力和第二流速施加至输入组合物。在一些实施方案中,分别将不同于第二离心力和第二流速的离心力和流速施加至输入组合物。在一些实施方案中,在第二时间段期间施加的离心力和流速是本文所述的任何离心力和流速,例如任何所述第二离心力和第二流速,如以本文所述的任何第二离心力与第二流速的比率。

[0194] 在一些实施方案中,第一时间段和第二时间段的长度大约相等。

[0195] 在其他实施方案中,第一时间段和第二时间段的长度不同。

[0196] 在一些实施方案中,第一时间段和第二时间段重复预定次数。在一些实施方案中,第一时间段和第二时间段重复直至已经过去预定的时间量。在一些实施方案中,预定的时间量在约5分钟与约100分钟之间、在约10分钟与约90分钟之间、在约15分钟与约80分钟之间、在约20分钟与约70分钟之间、在约25分钟与约60分钟之间、在约30分钟与约50分钟之间或在约35分钟与约40分钟之间。

[0197] 在一些实施方案中,第一时间段在约1分钟与约10分钟之间、在约1分钟与约9分钟之间、在约1分钟与约8分钟之间、在约1分钟与约7分钟之间、在约1分钟与约6分钟之间、在约1分钟与约5分钟之间、在约1分钟与约4分钟之间、在约1分钟与约3分钟之间、在约1分钟与约2分钟之间、在约2分钟与约10分钟之间、在约2分钟与约9分钟之间、在约2分钟与约8分钟之间、在约2分钟与约7分钟之间、在约2分钟与约6分钟之间、在约2分钟与约5分钟之间、在约2分钟与约4分钟之间、在约2分钟与约3分钟之间、在约3分钟与约10分钟之间、在约3分钟与约9分钟之间、在约3分钟与约8分钟之间、在约3分钟与约7分钟之间、在约3分钟与约6分钟之间、在约3分钟与约5分钟之间、在约3分钟与约4分钟之间、在约4分钟与约10分钟之间、在约4分钟与约9分钟之间、在约4分钟与约8分钟之间、在约4分钟与约7分钟之间、在约4分钟与约6分钟之间、在约4分钟与约5分钟之间、在约5分钟与约10分钟之间、在约5分钟与约9分钟之间、在约5分钟与约8分钟之间、在约5分钟与约7分钟之间、在约5分钟与约6分钟之间、在约6分钟与约10分钟之间、在约6分钟与约9分钟之间、在约6分钟与约8分钟之间、在约6分钟与约7分钟之间、在约7分钟与约10分钟之间、在约7分钟与约9分钟之间、在约7分钟与约8分钟之间、在约8分钟与约10分钟之间、在约8分钟与约9分钟之间或在约9分钟与约10分钟之间。在一些实施方案中,第一时间段在约1分钟与约10分钟之间、在约1分钟与约9分钟之间、在约1分钟与约8分钟之间、在约1分钟与约7分钟之间、在约1分钟与约6分钟之间、在约1分钟与约5分钟之间、在约1分钟与约4分钟之间、在约1分钟与约3分钟之间或在约1分钟与约2分钟之间。在一些实施方案中,第一时间段是约1分钟。

[0198] 在一些实施方案中,第二时间段在约1分钟与约10分钟之间、在约1分钟与约9分钟之间、在约1分钟与约8分钟之间、在约1分钟与约7分钟之间、在约1分钟与约6分钟之间、在

约1分钟与约5分钟之间、在约1分钟与约4分钟之间、在约1分钟与约3分钟之间、在约1分钟与约2分钟之间、在约2分钟与约10分钟之间、在约2分钟与约9分钟之间、在约2分钟与约8分钟之间、在约2分钟与约7分钟之间、在约2分钟与约6分钟之间、在约2分钟与约5分钟之间、在约2分钟与约4分钟之间、在约2分钟与约3分钟之间、在约3分钟与约10分钟之间、在约3分钟与约9分钟之间、在约3分钟与约8分钟之间、在约3分钟与约7分钟之间、在约3分钟与约6分钟之间、在约3分钟与约5分钟之间、在约3分钟与约4分钟之间、在约4分钟与约10分钟之间、在约4分钟与约9分钟之间、在约4分钟与约8分钟之间、在约4分钟与约7分钟之间、在约4分钟与约6分钟之间、在约4分钟与约5分钟之间、在约5分钟与约10分钟之间、在约5分钟与约9分钟之间、在约5分钟与约8分钟之间、在约5分钟与约7分钟之间、在约5分钟与约6分钟之间、在约6分钟与约10分钟之间、在约6分钟与约9分钟之间、在约6分钟与约8分钟之间、在约6分钟与约7分钟之间、在约7分钟与约10分钟之间、在约7分钟与约9分钟之间、在约7分钟与约8分钟之间、在约8分钟与约10分钟之间、在约8分钟与约9分钟之间或在约9分钟与约10分钟之间。在一些实施方案中,第二时间段在约1分钟与约10分钟之间、在约1分钟与约9分钟之间、在约1分钟与约8分钟之间、在约1分钟与约7分钟之间、在约1分钟与约6分钟之间、在约1分钟与约5分钟之间、在约1分钟与约4分钟之间、在约1分钟与约3分钟之间或在约1分钟与约2分钟之间。在另一个实施方案中,第二时间段是约1分钟。

[0199] 在一些实施方案中,第二离心力是约1,500G,第二流速是约10mL/min,并且将第二离心力和第二流速施加至输入组合物,持续约1分钟的第一时间段,之后将约300G的离心力和约10mL/min的流速施加至输入组合物,持续约1分钟的第二时间段。在一些实施方案中,重复第一时间段和第二时间段,直至已经过去约30分钟。

[0200] 在一些实施方案中,输入组合物的体积包含在约5ml与约20,000ml之间、在约10mL与约2,000mL之间、在约15mL与约1,000mL之间、在约20mL与约500mL之间、在约25mL与约100mL之间或在约30mL与约60mL之间。在一些实施方案中,输入组合物的体积在约30mL与约60mL之间。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约5ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约10ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约15ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约20ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约25ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约30ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约35ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约40ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约45ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约50ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约55ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约60ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约65ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约70ml。在一些实施方案中,输入组合物的体积是约75ml。

[0201] 术语“G”或“相对离心力”(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(如细胞、样品或沉淀物和/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)。

[0202] 在一些实施方案中,由所提供的方法产生的细胞(下文也称为“基因工程化T细胞”或“输出组合物”)包括用病毒载体(如含有编码异源蛋白(如重组受体,例如CAR)的多核苷酸的病毒载体)转导的细胞。在此上下文中,异源是指通常不从病毒表达和/或不由病毒基

基因组编码的蛋白质。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,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,如通过流式细胞术进行。在一些例子中,通过检测转导标记物和/或报告物构建体来测量表达。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/或增强的标记物。

#### i. 细胞组合物

[0203] 在一些实施方案中,如根据所述方法,用病毒载体颗粒转导包含T细胞的细胞组合物。在一些实施方案中,输入组合物的细胞浓度是从或从约 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL至 $1.0 \times 10^8$ 个细胞/mL,如至少或约至少或约 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $5 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL、 $5 \times 10^6$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL、 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL或 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $1.25 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $1.75 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $2.25 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $2.75 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL。

[0204] 在一些实施方案中,细胞组合物的体积包含在约20mL与约300mL之间、在约25mL与约250mL之间、在约30mL与约200mL之间、在约35mL与约150mL之间或在约40mL与约100mL之间。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约20mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约25mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约30mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约35mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约40mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约45mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约50mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约55mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约60mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约70mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约80mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约100mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约125mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约150mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约175mL。在一些实施方案中,细胞组合物的体积是约200mL。

[0205] 在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $1 \times 10^8$ 个总细胞、约 $2 \times 10^8$ 个总细胞、约 $3 \times 10^8$ 个总细胞、约 $4 \times 10^8$ 个总细胞、约 $5 \times 10^8$ 个总细胞、约 $6 \times 10^8$ 个总细胞、约 $7 \times 10^8$ 个总细胞、约 $8 \times 10^8$ 个总细胞、约 $9 \times 10^8$ 个总细胞或约 $1 \times 10^9$ 个总细胞。

[0206] 在一些实施方案中,T细胞具有如下平均直径:约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $15 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $10 \mu\text{m}$ 、约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 、约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 、约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $15 \mu\text{m}$ 、约 $15 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 、约 $15 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 或约 $20 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,T细胞具有约 $9 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。

[0207] 在一些实施方案中,T细胞具有约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约 $12 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约 $14 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。

[0208] 在一些实施方案中,T细胞具有小于 $9 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具

有约3 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约4 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约7 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 或约8 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0209] 在一些实施方案中，细胞组合物含有冷冻保存并在应用所述方法之前解冻的T细胞。在一些实施方案中，所述方法涉及将冷冻保存的细胞组合物解冻以产生包含T细胞的细胞组合物。

[0210] 在一些实施方案中，细胞组合物含有在应用所述方法之前未冷冻保存或解冻的T细胞。

[0211] 在一些实施方案中，在根据所提供的方法转导之前孵育和/或培养细胞。孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中，所述方法包括在施加第一离心力和第一流速之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。此类条件包括设计为诱导群体中细胞的增殖、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）的那些。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））。

[0212] 在一些实施方案中，在施加第一离心力和第一流速之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。在一些实施方案中，所述方法包括在将细胞组合物装载至离心机系统之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。在一些实施方案中，在将细胞组合物装载至离心机系统之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。在一些实施方案中，细胞组合物包含激活的T细胞。在一些实施方案中，细胞组合物包含表达HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L、4-1BB或其组合的T细胞。

[0213] 在一些实施方案中，刺激条件包括刺激试剂的存在。在一些实施方案中，刺激试剂能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面，药剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支持物（如珠）的抗体，如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些抗体（例如抗CD3、抗CD28）；和/或一种或多种细胞因子。在一些实施方案中，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。在一些实施方案中，刺激试剂包含（i）与TCR复合物的成员特异性结合的一级药剂；和（ii）与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂。在一些实施方案中，一级药剂与CD3特异性结合。在一些实施方案中，共刺激分子选自CD28、CD137（4-1-BB）、OX40或ICOS。在一些实施方案中，一级药剂和二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，一级药剂是或包含抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，二级药剂是或包含抗CD28抗体或其抗原结合片段。任选地，扩增方法可以进一步包括向培养基中（例如，以至少约0.5ng/ml的浓度）添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。

[0214] 在一些实施方案中，刺激剂包括IL-2和/或IL-15，例如，IL-2浓度为至少约10单位/mL。在一些方面，孵育是根据多种技术来进行，如以下文献中所述的那些技术：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。

[0215] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或在约37摄氏度。任选地,孵育可以进一步包括添加非分裂的EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围内的 $\gamma$ 射线辐照LCL。在一些方面,LCL饲养细胞以任何合适的量来提供,如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1。

[0216] 在实施方案中,通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞获得抗原特异性T细胞,如抗原特异性CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞。例如,可以通过从受感染的受试者中分离T细胞并用相同的抗原在体外刺激细胞,针对巨细胞病毒抗原产生抗原特异性T细胞系或克隆。

[0217] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的病毒载体颗粒。在一些此类情形中,可以在激活之前和或在不存在激活的情况下选择和/或转导细胞。

[0218] 在一些实施方案中,细胞组合物中的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的细胞(例如,T细胞)被激活,如在一些情况下,对于HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和/或4-1BB中的一种或多种呈表面阳性。在一些实施方案中,在开始施加第一离心力和第一流速之前,例如在建立流化床之前和/或在开始转导之前,如在存在抗CD3/抗CD28的情况下,用激活剂激活细胞。在不存在外源生长因子或存在少量外源生长因子的情况下体外扩增T细胞群的方法是本领域已知的(参见例如,美国专利6,352,694B1和欧洲专利EP 0 700 430B1)。通常,此类方法采用大于1 $\mu$ M的固相表面,其中各种结合剂(例如,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)被固定至所述固相表面上。例如,Dynabeads®CD3/CD28(Invitrogen)是用于T细胞扩增的可商购试剂,其是用针对人T细胞上的CD3和CD28细胞表面分子的亲和纯化的单克隆抗体的混合物包被的均匀的4.5 $\mu$ m超顺磁性、无菌、无热原聚苯乙烯珠。在一些实施方案中,激活剂(例如,抗CD3和/或抗CD28)可以固定在珠(如磁珠)上。

[0219] 在一些实施方案中,细胞激活也在存在IL-2(例如,从或从约50IU/mL至200IU/mL,如或约100IU/mL)的情况下进行。在一些实施方案中,激活进行如下时间: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,如至少或约至少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,激活在如下温度下进行:大于或大于约25°C,如通常大于或大于约32°C、35°C或37°C,例如为或约37°C $\pm$ 2°C,如为或约37°C的温度。

[0220] 在一些实施方案中,在开始接触之前,例如在开始转导之前,如在存在抗CD3/抗CD28的情况下,细胞未用激活剂激活。在一些实施方案中,细胞组合物包含多个静息细胞。在一些实施方案中,群体中至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的T细胞是静息T细胞,如缺乏T细胞激活标记物(如表面标记物或细胞内细胞因子或其他标记物)的T细胞和/或处于细胞周期的G0或G1期的T细胞。

[0221] 在特定方面,所提供的方法允许在T细胞中发生转导,而无需在接触和/或孵育之前激活。在一些实施方案中,所述方法包括用病毒载体转导含有静息或幼稚T细胞的T细胞群,而不首先(例如,在转导之前)激活和/或刺激T细胞。在一些此类实施方案中,所提供的方法可以用于制备用于过继疗法的细胞,如T细胞,所述方法不包括激活和/或刺激T细胞的步骤。

[0222] 在一些实施方案中,细胞通常是真核细胞,如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,或者是免疫系统的细胞,如先天

免疫或适应性免疫的细胞,例如髓系或淋巴样细胞(包括淋巴细胞,通常是T细胞和/或NK细胞)。其他示例性细胞包括干细胞,如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。细胞通常是原代细胞如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些原代细胞。在一些实施方案中,细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人受试者的原代T细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如整个T细胞群、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞及其亚群,如由以下各项所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记物或细胞因子分泌特征和/或分化程度。在一些实施方案中,细胞包含CD3<sup>+</sup> T细胞或针对CD3<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞包含CD4<sup>+</sup> T细胞或针对CD4<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞包含CD8<sup>+</sup> T细胞或针对CD8<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞包含CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞。关于待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体的。所述方法包括现成的方法。在一些方面,如对于现有技术,细胞是多能的和/或多潜能的,如干细胞,如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者分离细胞,对其进行制备、处理、培养和/或工程化,如本文所述,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者体内。

[0223] T细胞和/或CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞的亚型和亚群包括幼稚T (TN) 细胞、效应T细胞(TEFF)、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T(TSCM)、中枢记忆T(TCM)、效应记忆T(TEM)或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞(如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助细胞T细胞)、 $\alpha/\beta$  T细胞和 $\delta/\gamma$  T细胞。

[0224] 在一些实施方案中,细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,细胞是单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0225] 在一些实施方案中,细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。细胞可以从样品(如生物样品,例如获得自或源自受试者的生物样品)分离。在一些实施方案中,从其分离出细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中细胞被分离、处理和/或工程化)的人。

[0226] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个处理步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过处理的样品。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,包括源自其的处理的样品。

[0227] 在一些方面,衍生出或分离细胞的样品是血液或源自血液的样品,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、外周血单个核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检物、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、黏膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自其的细胞。在一些实施方案中,细胞是PBMC。在细胞疗法(例如,过

继细胞疗法)的情况下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0228] 在一些实施方案中,细胞源自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,所述细胞获得自异种来源,例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物或猪。

[0229] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备步骤和/或非基于亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在存在一种或多种试剂的情况下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、富集所需组分、溶解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,细胞基于一种或多种特性来分离,所述特性如密度、粘附特性、大小、对特定组分的敏感性和/或耐药性。

[0230] 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。

[0231] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的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培养基中以用于后续的处理步骤。在一些实施方案中,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书,通过半自动“流通式”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将所述细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并且将细胞直接重悬于培养基中。

[0232] 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梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0233] 在一些实施方案中,在进行所提供的方法之前不必富集或选择细胞。

[0234] 在一些实施方案中,分离方法包括基于一种或多种特定分子(如表面标记物(例如,表面蛋白)、细胞内标记物或核酸)在细胞中的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的用于基于此类标记物进行分离的方法。分离方法可以包括本文公开的那些方法中的任一种,包括使用可逆试剂系统(例如,如本文所述的药剂(如受体结合剂或选择剂)和试剂)的方法。

[0235] 在一些实施方案中,分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,分离包括基于细胞的一种或多种标记物(通常为细胞表面标记物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过与特异性结合此类标记物的抗体或结合配偶体一起孵育,然后通常进行洗涤步骤以及将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。

[0236] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记物进行分离的情况下,阴性选择可能特别有用。

[0237] 分离无需导致特定细胞群或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如,对特定类型的细胞(如表达标记物的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百

分比,但不需要使不表达所述标记物的细胞完全不存在。同样,对特定类型的细胞(如表达标记物的那些)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,但不需要使所有此类细胞完全去除。

[0238] 在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD3<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD3<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD4<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD8<sup>+</sup>T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0239] 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,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记物的细胞,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物具有特异性)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,可以同时多个细胞类型进行阳性选择。

[0240] 例如,在一些方面,通过阳性或阴性选择技术来分离T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记物呈阳性或表达高水平的表面标记物的细胞,例如CD28<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD127<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和/或CD45RO<sup>+</sup> T细胞。

[0241] 例如,可以使用CD3/CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS<sup>®</sup>M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)对CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup> T细胞进行阳性选择。

[0242] 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,阳性或阴性选择通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育来完成,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(标记物+)或以相对更高水平表达(标记物高)的一种或多种表面标记物特异性结合。

[0243] 在一些实施方案中,通过非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记物如CD14的阴性选择,将T细胞从PBMC样品分离。在一些方面,CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>选择步骤用于分离CD4<sup>+</sup>辅助T细胞和CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞。此类CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>群体可以通过针对在一种或多种幼稚T细胞、记忆T细胞和/或效应T细胞亚群上表达或表达至相对较高程度的标记物进行阳性或阴性选择来进一步分选为亚群。

[0244] 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,进一步富集或耗尽CD8<sup>+</sup>细胞中的幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(TCM)细胞进行富集以增加功效,如以改善施用后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见Terakuraet等人(2012) Blood. 1:72-82;Wang等人(2012) JImmunother. 35(9):689-701。在一些实施方案中,组合富

含TCM的CD8<sup>+</sup> T细胞与CD4<sup>+</sup> T细胞进一步增强功效。

[0245] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8<sup>+</sup>外周血淋巴细胞的CD62L<sup>+</sup>和CD62L<sup>-</sup>两个子集中。可以如使用抗CD8和抗CD62L抗体将PBMC针对CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>和/或CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>级分进行富集或耗尽。

[0246] 在一些实施方案中,中枢记忆T (TCM) 细胞的富集是基于CD45R0、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过表达CD4、CD14、CD45RA的细胞的耗尽和表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8<sup>+</sup>群体的分离。在一方面,中枢记忆T (TCM) 细胞的富集从基于CD4表达所选择阴性细胞级分开始进行,所述阴性细胞级分经受基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择以及基于CD62L的阳性选择。此类选择在一些方面是同时进行的,而在其他方面按任何顺序依序进行。在一些方面,将用于制备CD8<sup>+</sup>细胞群或亚群的基于CD4表达的相同选择步骤也用于生成CD4<sup>+</sup>细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分二者都被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在—个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0247] 在特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品进行CD4<sup>+</sup>细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。然后基于CD14和CD45RA或CD19的表达对阴性级分进行阴性选择,并基于中枢记忆T细胞(如CD62L或CCR7)的标记物特征进行阳性选择,其中以任何顺序进行阳性和阴性选择。

[0248] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4<sup>+</sup> T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4<sup>+</sup>淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,幼稚CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞是CD45R0<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4<sup>+</sup>细胞呈CD62L<sup>+</sup>和CD45R0<sup>-</sup>。在一些实施方案中,效应CD4<sup>+</sup>细胞是CD62L<sup>-</sup>和CD45R0<sup>-</sup>。

[0249] 在一个例子中,为了通过阴性选择富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物通常包含针对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),以允许分离细胞用于阳性和/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)分离技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于以下文献中: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.Schumacher编辑©Humana Press Inc.,Totowa,NJ)。

[0250] 在一些方面,将要分离的细胞的样品或组合物与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,如Dynalbeads或MACS珠))一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记物)特异性结合。

[0251] 在一些实施方案中,磁性颗粒或珠含有与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在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的美国专利号4,795,698;和Liberti等人的美国专利号5,200,084中所述的那些)是其他的例子。

[0252] 孵育通常在这样的条件下进行,由此附着于磁性颗粒或珠的抗体或结合配偶体或者与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。

[0253] 在一些方面,将样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;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和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步处理或经历另外的分离步骤。

[0254] 用于从细胞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、与可切割接头缀合的可磁化颗粒或抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0255] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是通过磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本)进行的。磁激活细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以如下模式操作,其中在施加外部磁场之后依序洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附接至磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附接的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,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,非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0256] 在某些实施方案中,使用如下系统、装置或设备进行分离或分开,所述系统、装置或设备进行所述方法的分离、细胞制备、分开、处理、孵育、培养和/或制备步骤中的一个或多个。在一些方面,系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,系统是如国际专利申请公开号WO 2009/072003或US20110003380 A1中所述的系统。

[0257] 在一些实施方案中,所述系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动化或可编程方式进行分离、处理和/或配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面,系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结局和/或调整。

[0258] 在一些方面,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤,例如用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上进行细胞的自动化分离。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。在一些方面中,该CliniMACS Prodigy系统配备有细胞处理单元,其允许自动洗涤和通过离心来分级分离细胞。

[0259] 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,其中流体流中携带针对多种细胞表面标记物染色的细胞。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)本文所述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140;Cho等人(2010)Lab Chip 10,1567-1573;以及Godin等人(2008)J Biophoton.1(5):355-376。在两种情况下,可以用多种标记物来标记物细胞,从而允许以高纯度分离明确定义的T细胞子集。

[0260] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或基因工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)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,例如在洗涤步骤之后将所述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。一个例子包括使用含有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。然后用培养基将其1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将所述细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储罐的气相中。

#### ii. 病毒载体颗粒

[0261] 在一些实施方案中,将包含T细胞的细胞组合物通过本文提供的任何方法用病毒载体颗粒(如章节IV中描述的那些中的任一种)转导。

[0262] 在一些实施方案中,将慢病毒载体以组合物的形式装载至离心机中。在一些实施方案中,包含慢病毒载体颗粒的组合物的体积是约1mL、约2mL、约3mL、约4mL、约5mL、约6mL、约7mL、约8mL、约9mL、约10mL、约11mL、约12mL、约13mL、约14mL、约15mL、约16mL、约17mL、约18mL、约19mL或约20mL。在一些实施方案中,包含慢病毒载体的组合物的体积是约5mL。在一些实施方案中,包含慢病毒载体的组合物的体积是约10mL。在一些实施方案中,包含慢病毒载体的组合物的体积是约15mL。在一些实施方案中,包含慢病毒载体的组合物的体积是约20mL。

[0263] 在一些实施方案中,以病毒载体颗粒拷贝或其感染单位(IU)与输入组合物中的细胞总数或待转导的细胞总数的某一比率(IU/细胞)来提供病毒载体颗粒。例如,在一些实施方案中,病毒颗粒在接触期间以为或约或至少为或至少约0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50或60IU的病毒载体颗粒/细胞存在。

[0264] 在一些实施方案中,可以按小于100(如通常小于60、50、40、30、20、10、5或更小)的感染复数(MOI)来实现转导。

#### B. 输出组合物

[0265] 在一些实施方案中,所述方法包括将第三离心力和第三流速施加至基因工程化T细胞以产生包含基因工程化T细胞的输出组合物。在一些实施方案中,收集或收获输出组合物,如以用于细胞疗法中的下游用途。在一些实施方案中,将第三离心力和第三流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的基因工程化T细胞。在一些实施方案中,将第三离心力和第三流速施加至基因工程化细胞允许收集或收获输出组合物。

[0266] 在一些实施方案中,经由套管收集输出组合物。在一些实施方案中,输出组合物在圆锥形流体外壳的尖端处或附近进入套管的末端,并且在圆锥形流体外壳的宽端处或附近离开套管的末端。

[0267] 在一些实施方案中,所述方法涉及冷冻保存输出组合物。在一些实施方案中,输出组合物中的活细胞水平在冷冻保存的输出组合物中维持。在一些实施方案中,所述方法涉及将冷冻保存的输出组合物解冻。在一些实施方案中,输出组合物中的活细胞水平在解冻的输出组合物中维持。

[0268] 在一些实施方案中,第三离心力在约2,000G与约3,000G之间。

[0269] 在一些实施方案中,第三离心力在约2,000G与约3,000G、在约2,200G与约2,800G之间或在约2,400G与约2,600G之间。在一些实施方案中,第三离心力是约2,000G。在一些实

实施方案中,第三离心力是约2,100G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,200G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,300G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,400G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,500G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,600G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,700G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,800G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,900G。在一些实施方案中,第三离心力是约3,000G。

[0270] 在一些实施方案中,第三流速是径向向外的。在一些实施方案中,第三流速被引导朝向圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第三离心力和第三流速在相同或基本相同的方向上。

[0271] 在一些实施方案中,第三流速受通过圆锥形流体外壳的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过圆锥形流体外壳的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开圆锥形流体外壳的尖端进入套管。

[0272] 在一些实施方案中,第三流速在约10mL/min与约30mL/min之间、在约12mL/min与约28mL/min之间、在约15mL/min与约25mL/min之间或在约18mL/min与约22mL/min之间。在一些实施方案中,第三流速是约15mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约16mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约17mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约18mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约19mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约20mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约21mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约22mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约23mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约24mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约15mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约25mL/min。

[0273] 在一些实施方案中,第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且(ii) 第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。

[0274] 在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率在约100与约150之间、在约110与140之间或在约120与130之间。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约100。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约105。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约110。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约115。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约120。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约125。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约130。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约135。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约140。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约145。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约150。在一些实施方案中,所述第三离心力是约2,500G并且所述第三流速是约20mL/min。

[0275] 在一些实施方案中,所述第三离心力与所述第三流速的比率在约100与约150之间。

[0276] 在一些实施方案中,所述方法包括冷冻保存输出组合物的细胞以产生冷冻保存的组合物。在一些实施方案中,冷冻保存包括将细胞悬浮在包含冷冻保护剂的培养基中并冷冻细胞。在一些实施方案中,冷冻在速率受控的冷冻器中进行。在一些实施方案中,所述方法涉及将冷冻保存的细胞组合物解冻。在一些实施方案中,所述方法包括配制解冻的细胞以制备用于作为药物产品施用的细胞组合物。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合

物已冷冻至少1天后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已冷冻至少2天后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已冷冻至少3天后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已经冷冻至少1周、10天、2周或1个月之后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已经冷冻长达10天、2周、1个月、2个月、3个月或6个月之后进行解冻。

### C. 其他处理步骤

[0277] 在一些实施方案中,用于转导(例如与细胞工程化结合)的处理步骤可以另外包括细胞的洗涤、培养、培育、刺激、激活、繁殖和/或配制。在一些实施方案中,在收集作为输出组合物之前,使基因工程化细胞经受一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,将所收集的输出组合物在存在刺激条件或刺激剂的情况下孵育。此类条件包括设计用于诱导群体中的细胞的增殖、扩增、激活和/或存活和/或模拟抗原暴露的条件。刺激可以在施用于受试者后离体或在体内进行。

#### i. 洗涤

[0278] 在一些实施方案中,在将第三离心力和第三流速施加至基因工程化细胞之前,所述方法包括使基因工程化细胞经受一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤去除非活细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤去除杂质(例如,蛋白质、DNA、细胞碎片、试剂)。

[0279] 在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括施加在约500G与约3,000G之间的离心力。在一些实施方案中,离心力是约500G。在一些实施方案中,离心力是约1,000G。在一些实施方案中,离心力是约1,500G。在一些实施方案中,离心力是约2,000G。在一些实施方案中,离心力是约2,500G。在一些实施方案中,离心力是约3,000G。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括施加在约20mL/min与约100mL/min之间的流速。在一些实施方案中,流速是约20mL/min、约30mL/min、约40mL/min、约50mL/min、约60mL/min、约70mL/min、约80mL/min、约90mL/min或约100mL/min。在一些实施方案中,流速是约30mL/min。在一些实施方案中,流速是约35mL/min。在一些实施方案中,流速是约40mL/min。在一些实施方案中,流速是约45mL/min。在一些实施方案中,流速是约50mL/min。在一些实施方案中,流速是约55mL/min。在一些实施方案中,流速是约60mL/min。在一些实施方案中,流速是约65mL/min。在一些实施方案中,流速是约70mL/min。在一些实施方案中,流速是约75mL/min。在一些实施方案中,流速是约80mL/min。在一些实施方案中,流速是约85mL/min。在一些实施方案中,流速是约90mL/min。

[0280] 在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括以在约20G/FR与约80G/FR之间的比率施加离心力(G)和流速(FR)。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括施加大约20、约25、约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70或约75的G/F比率。在一些实施方案中。在一些实施方案中,G/FR比率是约62.5G/FR。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括施加约2,500G的离心力和约40mL/min的流速。在一些实施方案中,G/FR比率是约33.3G/FR。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括施加约2,500G的离心力和约75mL/min的流速。在一些实施方案中,G/FR比率是约35G/FR。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括施加约1,000G的离心力和约28.5mL/min的流速。

[0281] 在一些实施方案中,在所述一个或多个洗涤步骤之前,将基因工程化细胞悬浮在

离心机中的培养基中。在一些实施方案中,所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。因此,在一些方面,在所述一个或多个洗涤步骤期间将培养基更换为不同的溶液。在一些实施方案中,在所述一个或多个洗涤步骤期间淘洗非活细胞。在一些实施方案中,在所述一个或多个洗涤步骤期间收集非活细胞作为废物级分。在一些实施方案中,在所述一个或多个洗涤步骤期间转导细胞组合物的细胞。因此,在一些实施方案中,细胞组合物的细胞被同时转导和洗涤。

ii. 细胞的转导后激活和/或扩增

[0282] 在一些实施方案中,结合基因工程化,将细胞(例如,所收集的输出组合物)进一步孵育和/或进一步培养。孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些此类实施方案中,进一步孵育是在一定条件下实现,以使病毒载体整合至一个或多个细胞的宿主基因组中。孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,所述培养容器是如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。在一些实施方案中,在存在刺激条件或刺激剂的情况下孵育所述组合物或细胞。此类条件包括设计为诱导群体中细胞的增殖、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)的那些。

[0283] 在一些实施方案中,进一步孵育是在高于室温的温度下进行,所述温度为如高于或高于约25°C,如通常高于或高于约32°C、35°C或37°C。在一些实施方案中,进一步孵育是在为或约37°C±2°C的温度下,如在为或约37°C的温度下实现。

[0284] 在一些实施方案中,进一步孵育是在用于刺激和/或激活细胞的条件下进行,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经设计以激活细胞的药剂))。

[0285] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激剂包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种药剂(例如刺激性和/或辅助性药剂),例如配体。在一些方面,药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联,如适于递送初级信号以例如启动ITAM诱导的信号(如对TCR组分具有特异性的那些)的激活的药剂,和/或促进共刺激信号(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CD3、抗CD28或抗41-BB(例如,其任选地结合至固体支持物如珠)和/或一种或多种细胞因子。刺激剂包括抗CD3/抗CD28珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增器和/或ExpACT®珠)。任选地,扩增方法可以进一步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IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0286] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激剂包括能够激活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)。在一些方面,药剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支持物(如珠)的抗体,如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些抗体(例如抗CD3、抗CD28);和/或一种或多种细胞因子。任选地,扩增方法可以进一步包括向培养基中添加抗CD3和/或抗CD28抗体(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度为至少约10单位/mL、至少约50单位/mL、至少约100单位/mL或至少约200单位/mL。

[0287] 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))。

[0288] 在一些方面,孵育是根据多种技术来进行,如以下文献中所述的那些技术: 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。

[0289] 在一些实施方案中,在离心机中进行进一步孵育。在一些实施方案中,在没有旋转或离心的情况下进行进一步孵育,这通常在收集输出组合物之后进行。在一些实施方案中,进一步孵育是在固定相之外进行,如在色谱基质之外,例如在溶液中进行。

[0290] 在一些实施方案中,在与发生接触的容器或设备不同的容器或设备中进行进一步孵育,如通过在离心后将细胞(例如,所收集的输出组合物)转移(例如,自动转移)至不同的容器或设备中。

[0291] 在一些实施方案中,通过以下方式扩增基因工程化T细胞:向培养起始组合物中添加饲养细胞(如非分裂外周血单个核细胞(PBMC))(例如,使得对于要扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多个PBMC饲养细胞);以及孵育培养物(例如,持续足以扩增所述T细胞数量的时间)。在一些方面,非分裂饲养细胞可以包含 $\gamma$ 辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用约3000至3600拉德范围内的 $\gamma$ 射线辐照PBMC以防止细胞分裂。在一些方面,在添加基因工程化T细胞群之前将饲养细胞添加至培养基。

[0292] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或在约37摄氏度。任选地,孵育可以进一步包括添加非分裂的病毒转化的成淋巴细胞样细胞(LCL)作为饲养细胞,例如,病毒可以是EBV、CMV或流感,并且任选地在MHC情况下,所转化的LCL在其表面上呈递病毒源抗原。在一些实施方案中,T细胞表达识别病毒抗原的TCR。在一些实施方案中,病毒抗原可以来自EBV、CMV或流感。可以用约6000至10,000拉德范围内的 $\gamma$ 射线辐照LCL。在一些方面,LCL饲养细胞以任何合适的量来提供,如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1。

[0293] 在一些实施方案中,进一步培养或孵育例如以促进离体扩增进行大于或大于约24小时、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15天。在一些实施方案中,进一步培养或孵育进行不超过6天、不超过5天、不超过4天、不超过3天、不超过2天或不超过24小时。

[0294] 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,如至少或约至少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,进一步孵育进行如下时间:在或在约1小时与48小时、4小时与36小时、8小时与30小时或12小时与24小时之间,包含端值。

[0295] 在一些实施方案中,本文所提供的方法不包括进一步培养或孵育,例如,不包括离体扩增步骤,或者包括显著更短的离体扩增步骤。

[0296] 在一些实施方案中,使细胞工程化的整个过程(例如选择和/或富集、孵育与转导相结合和/或进一步培养或培育)是在从受试者获得样品后的以下时间段内进行:超过9天、

不超过8天、不超过7天、不超过6天、不超过5天、不超过4天、不超过3天、不超过2天或不超过1天。应理解,这种定时不包括使细胞经历冷冻保存的任何时间段。

[0297] 在本文所提供的方法的一些实施方案中,将工程化细胞(例如,输出组合物或配制组合物)在转导后在不进行显著的离体扩增的情况下立即或不久施用于受试者。在一些实施方案中,工程化细胞可以在转导步骤后立即施用。在一些实施方案中,工程化细胞可以在转导步骤后不久在例如与常规方法(这可能需要显著的体外激活、扩增和/或富集)相比不进行显著的离体扩增或进行显著更短的离体扩增的情况下施用。例如,在本文所提供的方法的一些实施方案中,工程化细胞可以在转导的三天、两天或一天内施用。在一些实施方案中,工程化细胞可以在转导步骤的48小时、36小时、24小时、20小时、16小时、12小时、8小时、4小时、2小时、1小时或更短时间内施用。在一些实施方案中,与常规方法相比,使工程化细胞经历显著更短的体外扩增,例如48小时、36小时、24小时、20小时、16小时、12小时、8小时、4小时、2小时、1小时或更短时间。

[0298] 在任何此类实施方案中,细胞的扩增和/或激活可以在暴露于抗原后在体内进行,例如,在施用细胞后在受试者体内进行工程化细胞的扩增。在一些实施方案中,体内扩增的范围、程度或量值可以通过多种方法来扩大、加强或增强,所述方法能够调节(例如增加)所施用细胞(例如表达重组受体的细胞)的扩增、增殖、存活和/或功效。

[0299] 在一些实施方案中,此类方法包括涉及施用工程化细胞的那些方法,将所述细胞用药剂(例如,核酸)进一步修饰,以改变(例如,增加或减少)分子的表达或活性,其中这种改变的表达或活性扩大、加强或增强所施用细胞的扩增、增殖、存活和/或功效。在一些实施方案中,药剂(例如,核酸)的表达例如通过施用诱导物或其他调节分子是可诱导的、可抑制的、可调节的和/或用户控制的。

[0300] 在一些实施方案中,此类方法包括涉及与药物或药剂的组合施用(例如,同时或依次施用)的方法,所述药物或药剂能够扩大、加强或增强所施用细胞(例如,表达重组受体的细胞)的扩增、增殖、存活和/或功效。

### iii. 配制

[0301] 在一些实施方案中,在进一步孵育之后,制备细胞的过程可以进一步包括配制细胞。因此,处理步骤中可包括配制此类组合物。

[0302] 还提供了用于此类方法中的药物组合物或配制品,其在一些实施方案中结合所提供的处理方法一起配制,例如在进行其他处理步骤的封闭系统中进行,例如以自动化或部分自动化方式进行。

[0303] 在一些实施方案中,将细胞和组合物以药物组合物或配制品的形式(例如包含细胞或细胞群和药学上可接受的载体或赋形剂的组合物)施用于受试者。

[0304] 术语“药物配制品”是指这样的制剂,其处于使得其中所含活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对施用配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0305] 在一些实施方案中,药物组合物另外包含其他药学活性药剂或药物,例如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、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,所述药剂是以盐形式例如药学上可接受的盐施用。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸)和有机酸(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)的那些盐。

[0306] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了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剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0307] 在一些方面,载体的选择部分取决于特定细胞和/或施用方法。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。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。该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)。药学上可接受的载体在所用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、海藻糖或山梨糖醇;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)。

[0308] 在一些方面,在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、磷酸钾以及各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。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。用于制备可施用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。

[0309] 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以组合形式适当地存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物进一步包含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。

[0310] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)的细胞。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。所需剂量可以通过细胞的单次推注施用、通过细胞的多次推注施用或通过细胞的连续输注施用来递送。

[0311] 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、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方案中,将细胞群肠胃外施用。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,通过静脉内、腹膜内或皮下注射施用外周全身递送将细胞施用于受试者。

[0312] 在一些实施方案中,组合物作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、混悬剂、乳剂、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以缓冲至所选pH。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更易于制备。另外,液体组合物稍微更方便施用,特别是通过注射。

另一方面,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制,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,其含有例如水、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。

[0313] 无菌可注射溶液可以通过在溶剂中掺入细胞来制备,所述溶剂如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。组合物可以含有辅助物质,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,这取决于施用途径和所需的制剂。在一些方面,可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0314] 可以添加各种增强组合物的稳定性和无菌性的添加剂,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)来确保防止微生物的作用。通过使用延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0315] 用于体内施用的配制品通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌性。

#### D. 输出组合物的示例性特征

[0316] 在一些实施方案中,输出组合物(例如,所收集的输出组合物)的体积包含在约1ml与约20,000ml之间、在约5mL与约2,000mL之间、在约10mL与约1,000mL之间、在约15mL与约500mL之间或在约20mL与约100mL之间。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约1mL、约5mL、约10mL、约15mL、约20mL、约25mL、约30mL、约35mL、约40mL、约45mL、约50mL、约55mL、约60mL、约65mL、约70mL、约75mL、约80mL、约85mL、约90mL、约95mL或约100mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约1mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约5mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约10mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约15mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约20mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约25mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约30mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约35mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约40mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约45mL。在一些实施方案中,输出组合物的体积是约50mL。

[0317] 在一些实施方案中,输出组合物比细胞组合物或输入组合物包含更大百分比的活T细胞。在一些实施方案中,输出组合物比细胞组合物包含更大百分比的活T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%或至少约25%。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约5%。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约10%。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约15%。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约20%。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约25%。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约30%。

[0318] 在一些实施方案中,输出组合物比输入组合物包含更大百分比的活T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中活T细胞的百分比比输入组合物中活T细胞的百分比大至少约

5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%或大至少约25%。在一些实施方案中,输出组合物中活T输入的百分比比输入组合物中活T输入的百分比高约5%。在一些实施方案中,输出组合物中活T输入的百分比比输入组合物中活T输入的百分比高约10%。在一些实施方案中,输出组合物中活T输入的百分比比输入组合物中活T输入的百分比高约15%。在一些实施方案中,输出组合物中活T输入的百分比比输入组合物中活T输入的百分比高约20%。在一些实施方案中,输出组合物中活T输入的百分比比输入组合物中活T输入的百分比高约25%。在一些实施方案中,输出组合物中活T输入的百分比比输入组合物中活T输入的百分比高约30%。

[0319] 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T细胞。

[0320] 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/或频率的对凋亡标记物呈阳性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中小于为或约40%、小于为或约35%、小于为或约30%、小于为或约25%、小于为或约20%、小于为或约15%、小于为或约10%、小于为或约5%或小于为或约1%的细胞表达、含有细胞凋亡标记物和/或对细胞凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,输出组合物中小于为或约25%的细胞表达、含有细胞凋亡标记物和/或对细胞凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,输出组合物中小于为或约小于为或约10%的细胞表达、含有细胞凋亡标记物和/或对细胞凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,输出组合物中小于为或约小于为或约5%的细胞表达、含有细胞凋亡标记物和/或对细胞凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,输出组合物中小于为或约小于为或约1%的细胞表达、含有细胞凋亡标记物和/或对细胞凋亡标记物呈阳性。

[0321] 在特定实施方案中,输出组合物是富含CD3<sup>+</sup> T细胞的细胞组合物。在一些实施方案中,输出组合物中至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约98.5%、至少或约99%、至少或约99.5%、至少或约99.9%、100%或约100%的总细胞是CD3<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中至少或约86%、至少或约86.5%、至少或约87%、至少或约87.5%、至少或约88%、至少或约88.5%、至少或约89%、至少或约89.5%、至少或约90%、至少或约90.5%、至少或约91%、至少或约91.5%、至少或约92%、至少或约92.5%、至少或约93%、至少或约93.5%、至少或约94%、至少或约94.5%、至少或约95%、至少或约95.5%、至少或约96%、至少或约96.5%、至少或约97%、至少或约97.5%、至少或约98%或至少或约98.5%的总细胞是CD3<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中在约80%与约100%之间、在约85%与约98%之间、在约88%与约96%之间或在约90%与约94%之间的总细胞是CD3<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,输出组合物基本上由CD3<sup>+</sup> T细胞组成。在一些实施方案中,输出组合物中至少或约90%的总细胞是CD3<sup>+</sup> T细胞,并且输出组合物中至少或约40%的总细胞表达重组受体(例如,CAR)。

[0322] 在某些实施方案中,输出组合物是富含CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞的细胞组合物。在特定实施方案中,CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞占输出组合物中总细胞的至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约98.5%、至少或约99%、至少或约99.5%、至少或约99.9%、100%或约100%。在一些实施方案中,CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞占输出组合物中总细胞的至少或约86%、至少或约86.5%、至少或约87%、至少或约87.5%、至少或约88%、至少或约88.5%、至少或约89%、至少或约89.5%、至少或约90%、至少或约90.5%、至少或约91%、至少或约91.5%、至少或约92%、至少或约92.5%、至少或约93%、至少或约93.5%、至少或约94%、至少或约94.5%、至少或约95%、至少或约95.5%、至少或约96%、至少或约96.5%、至少或约97%、至少或约97.5%、至少或约98%或至少或约98.5%。在一些实施方案中,CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞占输出组合物中总细胞的在约80%与约100%之间、在约85%与约98%之间、在约88%与约96%之间或在约90%与约94%之间。在一些实施方案中,输出组合物基本上由CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞组成。

[0323] 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%之间或约50%或50%的CD4<sup>+</sup> 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%之间或约50%或50%的CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T细胞,以及为或约在为或约35%与为或约65%之间的CD8<sup>+</sup> T细胞。在特定实施方案中,输出组合

物含有比率在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<sup>+</sup> T细胞与CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物具有比率为或为约3:1、为或为约2.8:1、为或为约2.5:1、为或为约2.25:1、为或为约2:1、为或为约1.8:1、为或为约1.7:1、为或为约1.6:1、为或为约1.5:1、为或为约1.4:1、为或为约1.3:1、为或为约1.2:1、为或为约1.1:1、为或为约1:1、为或为约1:1.1、为或为约1:1.2、为或为约1:1.3、为或为约1:1.4、为或为约1:1.5、为或为约1:1.6、为或为约1:1.7、为或为约1:1.8、为或为约1:2、为或为约1:2.25、为或为约1:2.5、为或为约1:2.8或者为或为约1:3的CD4<sup>+</sup> T细胞与CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0324] 在一些实施方案中,输出组合物含有比率在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<sup>+</sup> T细胞与表达重组受体(例如CAR)的CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中表达重组受体(例如,CAR)的CD4<sup>+</sup> T细胞与表达重组受体(例如,CAR)的CD8<sup>+</sup> T细胞的比率为或为约3:1、为或为约2.8:1、为或为约2.5:1、为或为约2.25:1、为或为约2:1、为或为约1.8:1、为或为约1.7:1、为或为约1.6:1、为或为约1.5:1、为或为约1.4:1、为或为约1.3:1、为或为约1.2:1、为或为约1.1:1、为或为约1:1、为或为约1:1.1、为或为约1:1.2、为或为约1:1.3、为或为约1:1.4、为或为约1:1.5、为或为约1:1.6、为或为约1:1.7、为或为约1:1.8、为或为约1:2、为或为约1:2.25、为或为约1:2.5、为或为约1:2.8或者为或为约1:3。

[0325] 在一些实施方案中,与所提供的方法结合生成或产生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具有定位于细胞膜和/或细胞表面的一种或多种重组受体蛋白,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物的mRNA或蛋白质。

[0326] 在一些实施方案中,输出组合物中至少或约5%、至少或约10%、至少或约20%、至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的细胞表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中至少或约50%的细胞表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中至少或约5%、至少或约10%、至少或约20%、至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的CD3<sup>+</sup> T细胞表达重组受体。在一些实施方案中,输出组合物中至少或约50%的CD3<sup>+</sup> T细胞表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中至少或约5%、至少或约10%、至少或约20%、至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的细胞是表达重组受体的CD3<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,输出组合物中至少或约50%的细胞是表达重组受体的CD3<sup>+</sup> T细胞。

[0327] 在特定实施方案中,输出组合物中至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的CD4+ T细胞表达重组受体。在特定实施方案中,输出组合物中至少或约50%的CD4+ T细胞表达重组受体。在一些实施方案中,输出组合物中至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的CD8+ T细胞表达重组受体。在某些实施方案中,输出组合物中至少或约50%的CD8+ T细胞表达重组受体。

[0328] 在特定实施方案中,输出组合物中至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,输出组合物中至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中至少或至少约90%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。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,呈凋亡标记物(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,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,输出组合物中至少或至少约90%的CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在一些实施方案中,输出组合物中至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+)CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,输出组合物中至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的重组受体表达(例如,CAR+)CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,输出组合物中至少或至少约90%的重组受体表达(例如,CAR+)CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。

[0329] 在特定实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合物中平均至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天

冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在一些实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少或至少约90%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少或至少约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,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少或至少约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,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少或至少约90%的CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在一些实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+) CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少85%、至少90%或至少95%的重组受体表达(例如,CAR+) CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开方法产生的多种输出组合中平均至少90%的重组受体表达(例如,CAR+) CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。

[0330] 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,所述多种输出组合中的每一种都源自许多不同供体之一,所述供体例如约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。

[0331] 在特定实施方案中,输出组合的大多数细胞是幼稚或幼稚样细胞、中枢记忆细胞和/或效应记忆细胞。在特定实施方案中,输出组合的大多数细胞是幼稚样或中枢记忆细胞。在一些实施方案中,输出组合中的大多数细胞是中枢记忆细胞。在一些方面,分化程度较低的细胞(例如,中枢记忆细胞)不再存活,并且消耗较慢,从而增加持久性和耐久性。在一些方面,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。

[0332] 在某些实施方案中,输出组合的细胞具有高份额和/或频率的幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞。在某些实施方案中,输出组合的细胞中幼稚样细胞的份额和/或频率大于从替代过程(如涉及扩增的过程(例如包括扩增单元操

作和/或包括旨在引起细胞扩增的步骤的过程))产生的输出组合物。在某些实施方案中,幼稚样T细胞可以包括处于不同分化状态的细胞,并且特征可以是某些细胞标记物的阳性或高表达(例如,表面表达或细胞内表达)和/或其他细胞标记物的阴性或低表达(例如,表面表达或细胞内表达)。在一些方面,幼稚样T细胞的特征为CCR7、CD45RA、CD28和/或CD27的阳性或高表达。在一些方面,幼稚样T细胞的特征为CD25、CD45R0、CD56、CD62L和/或KLRG1的阴性表达。在一些方面,幼稚样T细胞的特征为CD95的低表达。在某些实施方案中,幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞是CCR7+CD45RA+,其中所述细胞是CD27+或CD27-。在某些实施方案中,幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞是CD27+CCR7+,其中所述细胞是CD45RA+或CD45RA-。在某些实施方案中,幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞是CD62L-CCR7+。

## II. 富集活细胞的方法

[0333] 提供了用于在离心机系统中针对活细胞富集细胞组合物(例如,工程化细胞组合物)的方法。在一些实施方案中,离心机系统是连续逆流淘洗(“CCE”)离心机系统,也称为反向离心机系统。在一些实施方案中,产生的细胞用于细胞疗法中,如制备用于自体或同种异体转移(例如,在过继细胞疗法中)的原代细胞。所述方法可以包括另外的细胞处理步骤,如细胞洗涤、分离、分开、收集、配制或与产生细胞组合物相关的其他步骤。

[0334] 本文还提供了一种针对活细胞富集细胞组合物(例如,工程化细胞组合物)的方法,所述方法包括:(a)将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,以及(b)将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物,其中第二离心力和第二流速使输入组合物的细胞在离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物。在一些实施方案中,所述方法包括将细胞组合物(例如,工程化细胞组合物)装载至离心机系统中,其中所述装载在(a)中的施加的至少一部分之前和/或期间进行。

[0335] 在一些实施方案中,离心机系统包括在圆锥形流体外壳内的套管。在一些实施方案中,套管沿着圆锥形流体外壳的长度延伸。在一些实施方案中,套管的一端在圆锥形流体外壳的尖端处或附近。在一些实施方案中,套管的另一端在圆锥形流体外壳的宽端处或附近,如在宽端的中心处或附近。

[0336] 在一些实施方案中,将细胞组合物经由套管装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将细胞组合物在圆锥形流体外壳的尖端处或附近装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,通过以下方式将细胞组合物装载至圆锥形流体外壳中:在圆锥形流体外壳的宽端处或附近进入套管的末端并且在圆锥形流体外壳的尖端处或附近离开套管的末端。

[0337] 在一些实施方案中,施加第二离心力和第二流速从而将细胞组合物的废物级分从圆锥形流体外壳淘洗出。在一些实施方案中,淘洗的废物级分具有比细胞组合物中非活T细胞百分比更高的非活T细胞百分比。

[0338] 在一些实施方案中,淘洗的细胞经由圆锥形流体外壳的宽端处的开口离开圆锥形流体外壳。在一些实施方案中,开口在圆锥形流体外壳的宽端处或附近至少部分地围绕套管的末端。在一些实施方案中,开口在圆锥形流体外壳的宽端处或附近围绕套管的末端。

[0339] 在一些实施方案中,所述方法涉及收集所淘洗的废物级分。在一些实施方案中,将

所淘洗的废物级分收集在容器中。在一些实施方案中,容器与圆锥形流体外壳的宽端流体连通。

[0340] 在一些实施方案中,施加第二离心力和第二流速从而在圆锥形流体外壳内产生经富集的组合物,所述经富集的组合物具有比细胞组合物中的活T细胞百分比更高的活T细胞百分比。

[0341] 在一些实施方案中,所提供的方法用于针对活细胞(如T细胞(例如,工程化T细胞))进行富集。在一些实施方案中,先前已向细胞中引入了编码抗原受体(如嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR))的异源多核苷酸。在一些实施方案中,先前已通过病毒载体颗粒向细胞中引入了异源核酸。在一些实施方案中,将细胞先前已用含有编码抗原受体的异源多核苷酸的病毒载体颗粒转导。在一些实施方案中,基因工程化包括使细胞组合物的T细胞与含有编码抗原受体的异源多核苷酸的病毒载体颗粒接触。在一些实施方案中,细胞表达抗原受体。在一些实施方案中,在(a)中的施加之前,所述方法包括将细胞组合物的T细胞进行基因工程化以表达抗原受体和/或细胞组合物的T细胞已经被基因工程化以表达抗原受体。因此,在一些实施方案中,所提供的方法可以用于富集先前已被工程化以表达抗原受体(如转基因TCR或CAR)的活T细胞。

[0342] 在一些实施方案中,细胞组合物含有冷冻保存并在应用所述方法之前解冻的T细胞。在一些实施方案中,所述方法涉及将冷冻保存的细胞组合物解冻以产生包含T细胞的细胞组合物。

[0343] 在一些实施方案中,所述方法包括冷冻保存经富集的组合物的细胞以产生冷冻保存的组合物。在一些实施方案中,冷冻保存包括将细胞悬浮在包含冷冻保护剂的培养基中并冷冻细胞。在一些实施方案中,冷冻在速率受控的冷冻器中进行。在一些实施方案中,所述方法涉及将冷冻保存的细胞组合物解冻。在一些实施方案中,所述方法包括配制解冻的细胞以制备用于作为药物产品施用的细胞组合物。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已冷冻至少1天后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已冷冻至少2天后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已冷冻至少3天后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已经冷冻至少1周、10天、2周或1个月之后进行解冻。在一些实施方案中,在冷冻保存的细胞组合物已经冷冻长达10天、2周、1个月、2个月、3个月或6个月之后进行解冻。

[0344] 在一些实施方案中,细胞组合物含有在应用所述方法之前未冷冻保存或解冻的T细胞。

[0345] 还提供了通过此类方法产生的细胞群及其使用方法。

[0346] 因此,在一些实施方案中,与离心之前相比,由所提供的方法产生的细胞组合物在离心之后展现出增加的活力。在一些实施方案中,增加的活力在离心后立即被观察到和/或在离心后维持一段时间(例如,数小时或数天)。

[0347] 在一些实施方案中,第一离心力在约500G与约5,000G之间、在约500G与约4,500G之间、在约500G与约4,000G之间、在约500G与约3,500G之间、在约500G与约3,000G之间、在约500G与约2,500G之间、在约500G与约2,000G之间、在约500G与约1,500G之间、在约500G与约1,000G之间、在约1,000G与约5,000G之间、在约1,000G与约4,500G之间、在约1,000G与约4,000G之间、在约1,000G与约3,500G之间、在约1,000G与约3,000G之间、在约1,000G与约2,

500G之间、在约1,000G与约2,000G之间、在约1,000G与约1,500G之间、在约1,500G与约5,000G之间、在约1,500G与约4,500G之间、在约1,500G与约4,000G之间、在约1,500G与约3,500G之间、在约1,500G与约3,000G之间、在约1,500G与约2,500G之间、在约1,500G与约2,000G之间、在约2,000G与约5,000G之间、在约2,000G与约4,500G之间、在约2,000G与约4,000G之间、在约2,000G与约3,500G之间、在约2,000G与约3,000G之间、在约2,000G与约2,500G之间、在约2,500G与约5,000G之间、在约2,500G与约4,500G之间、在约2,500G与约4,000G之间、在约2,500G与约3,500G之间、在约2,500G与约3,000G之间、在约3,000G与约5,000G之间、在约3,000G与约4,500G之间、在约3,000G与约4,000G之间、在约3,000G与约3,500G之间、在约3,500G与约5,000G之间、在约3,500G与约4,500G之间、在约3,500G与约4,000G之间、在约4,000G与约5,000G之间、在约4,000G与约4,500G之间或在或在约4,500G与约5,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力在约1,000G与约4,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力在约2,000G与约4,000G之间。

[0348] 在一些实施方案中,第一离心力在约1,000G与约5,000G之间、在约1,500G与约4,500G之间、在约2,000G与约4,000G之间、在约1,500G与约3,500G之间或在约2,000G与约3,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力是约1,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约1,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约2,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约2,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约3,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约3,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约4,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约4,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约5,000G。

[0349] 在一些实施方案中,第一流速是径向向内的。在一些实施方案中,第一流速被引导远离圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第一离心力被第一流速抵消。在一些实施方案中,第一流速是逆流流速。

[0350] 在一些实施方案中,第一流速受通过套管的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过套管的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开套管以在其尖端处进入圆锥形流体外壳。

[0351] 在一些实施方案中,第一流速在约1mL/min与约20mL/min之间、在约3mL/min与约18mL/min之间、在约5mL/min与约15mL/min之间或在约8mL/min与约12mL/min之间。在一些实施方案中,第一流速是约1mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约3mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约5mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约8mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约9mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约10mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约11mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约12mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约15mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约18mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约20mL/min。

[0352] 在一些实施方案中,第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第一离心力在约1,000G与约4,000G之间;并且(ii) 第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii) 第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。

[0353] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约100与约600之间、在约100与约500之间、在约100与约400之间、在约100与约300之间、在约100与约200之间、在约200

与约600之间、在约200与约500之间、在约200与约400之间、在约200与约300之间、在约300与约600之间、在约300与约500之间、在约300与约400之间、在约400与约600之间、在约400与约500或在约500与约600之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约200与约500之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约200与约400之间。除非另有说明,否则本文中的离心力与流速比率是以G计的离心力与以mL/min计的流速的比率。

[0354] 在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率在约200与约400之间、在约225与约375之间、在约250与约350之间或在约275与约325之间。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约200。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约200。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约225。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约250。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约275。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约300。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约325。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约350。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约375。在一些实施方案中,第一离心力与第一流速的比率是约400。

[0355] 在一些实施方案中,第一离心力在约2,000G与约4,000G之间,并且第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间。在一些实施方案中,第一离心力是约3,000G并且第一流速是约10ml/min。

[0356] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物(例如,工程化细胞组合物)约15秒、约30秒、约45秒、约60秒、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约10分钟或约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约15秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约30秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约45秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物约60秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,至少持续直至建立细胞流化床。

[0357] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约15秒、至少约30秒、至少约45秒、至少约60秒、至少约2分钟、至少约3分钟,至少约4分钟、至少约5分钟、至少约10分钟或至少约15分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约15秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约20秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约25秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约30秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约45秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约60秒。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约2分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约3分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约4分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约5分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约10分钟。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物至少约15分钟。

[0358] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约

15秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约25秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约30秒与60秒之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约15秒与2分钟之间。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,持续在或在约25秒与2分钟之间。

[0359] 在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,直至预定数量的细胞被装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物,直至预定数量的细胞成为细胞流化床的一部分。在一些实施方案中,预定数量的细胞是预定数量的T细胞。在一些实施方案中,预定数量的细胞(例如,T细胞)是如下数量的细胞(例如,T细胞):在约1000万与1亿之间、在约1000万与9000万之间、在约1000万与8000万之间、在约1000万与7000万之间、在约1000万与6000万之间、在约1000万与5000万之间、在约1000万与4000万之间、在约1000万与3000万之间、在约1000万与2000万之间、在约2000万与1亿之间、在约2000万与9000万之间、在约2000万与8000万之间、在约2000万与7000万之间、在约2000万与6000万之间、在约2000万与5000万之间、在约2000万与4000万之间、在约2000万与3000万之间、在约3000万与1亿之间、在约3000万与9000万之间、在约3000万与8000万之间、在约3000万与7000万之间、在约3000万与6000万之间、在约3000万与5000万之间、在约3000万与4000万之间、在约4000万与1亿之间、在约4000万与9000万之间、在约4000万与8000万之间、在约4000万与7000万之间、在约4000万与6000万之间、在约4000万与5000万之间、在约5000万与1亿之间、在约5000万与9000万之间、在约5000万与8000万之间、在约5000万与7000万之间、在约5000万与6000万之间、在约6000万与1亿之间、在约6000万与9000万之间、在约6000万与8000万之间、在约6000万与7000万之间、在约7000万与1亿之间、在约7000万与9000万之间、在约7000万与8000万之间、在约8000万与1亿之间、在约8000万与9000万之间或在约9000万与1亿之间。在一些实施方案中,预定数量的细胞(例如,T细胞)是约5000万个细胞(例如,T细胞)。

[0360] 在一些实施方案中,第二流速是径向向内的。在一些实施方案中,第二流速被引导远离圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第二离心力被第二流速抵消。在一些实施方案中,第二流速是逆流流速。

[0361] 在一些实施方案中,第二流速受通过套管的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过套管的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开套管以在其尖端处进入圆锥形流体外壳。

[0362] 在其他实施方案中,第二流速是径向向外的。在一些实施方案中,第二流速被引导朝向圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第二离心力和第二流速在相同或基本相同的方向上。

[0363] 在一些实施方案中,第二流速受通过圆锥形流体外壳的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过圆锥形流体外壳的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开圆锥形流体外壳的尖端进入套管。

[0364] 在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约4,000G之间、在约100G与约3,500G之间、在约100G与约3,000G之间、在约100G与约2,500G之间、在约100G与约2,000G之间、在约100G与约1,500G之间、在约100G与约1,000G之间、在约100G与约500G之间、在约100G与约

350G之间、在约350G与约4,000G之间、在约350G与约3,500G之间、在约350G与约3,000G之间、在约350G与约2,500G之间、在约350G与约2,000G之间、在约350G与约1,500G之间、在约350G与约1,000G之间、在约350G与约500G之间、在约500G与约4,000G之间、在约500G与约3,500G之间、在约500G与约3,000G之间、在约500G与约2,500G之间、在约500G与约2,000G之间、在约500G与约1,500G之间、在约500G与约1,000G之间、在约1,000G与约4,000G之间、在约1,000G与约3,500G之间、在约1,000G与约3,000G之间、在约1,000G与约2,500G之间、在约1,000G与约2,000G之间、在约1,000G与约1,500G之间、在约1,500G与约4,000G之间、在约1,500G与约3,500G之间、在约1,500G与约3,000G之间、在约1,500G与约2,500G之间、在约1,500G与约2,000G之间、在约2,000G与约4,000G之间、在约2,000G与约3,500G之间、在约2,000G与约3,000G之间、在约2,000G与约2,500G之间、在约2,500G与约4,000G之间、在约2,500G与约3,500G之间、在约2,500G与约3,000G之间、在约3,000G与约4,000G之间、在约3,000G与约3,500G之间或在约3,500G与约4,000G之间。

[0365] 在一些实施方案中,第二离心力在约350G与约4,000G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约350G与3,000G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约1,500G与约3,000G之间。在一些实施方案中,T细胞是激活的T细胞。在一些实施方案中,T细胞(例如,激活的T细胞)具有如下平均直径:约5 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约15 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约10 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 至约15 $\mu\text{m}$ 、约15 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 、约15 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 或约20 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,T细胞具有约9 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0366] 在一些实施方案中,T细胞具有约10 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约12 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约14 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0367] 在一些实施方案中,第二离心力在约350G与约4,000G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约350G与3,000G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约500G与约1,500G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约700G与约1,300G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约800G与约1,200G之间。在一些实施方案中,第二离心力在约900G与约1,100G之间。在一些实施方案中,第二离心力是约1,000G。在一些实施方案中,T细胞是非激活的T细胞或较少激活的T细胞。在一些实施方案中,T细胞被冷冻保存并在应用所述方法之前解冻。在一些实施方案中,T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约3 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约4 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约7 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 或约8 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0368] 在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约2,000G之间、在约200G与约1800G之间、在约500G与约1,500G或在约750G与约1,250G之间。在一些实施方案中,第二离心力是约250G。在一些实施方案中,第二离心力是约500G。在一些实施方案中,第二离心力是约600G。在一些实施方案中,第二离心力是约700G。在一些实施方案中,第二离心力是约800G。在一些实施方案中,第二离心力是约900G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,000G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,100G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,200G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,300G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,400G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,500G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,300G。在一些实施方案中,第二离心力是约1,750G。在一些实施方案中,第二离心力是约2,000G。

[0369] 在一些实施方案中,第二流速在约5mL/min与约100mL/min之间、在约5mL/min与约90mL/min之间、在约5mL/min与约80mL/min之间、在约5mL/min与约70mL/min之间、在约5mL/min与约60mL/min之间、在约5mL/min与约50mL/min之间、在约5mL/min与约40mL/min之间、在约5mL/min与约30mL/min之间、在约5mL/min与约20mL/min之间、在约5mL/min与约10mL/min之间、在约10mL/min与约100mL/min之间、在约10mL/min与约90mL/min之间、在约10mL/min与约80mL/min之间、在约10mL/min与约70mL/min之间、在约10mL/min与约60mL/min之间、在约10mL/min与约50mL/min之间、在约10mL/min与约40mL/min之间、在约10mL/min与约30mL/min之间、在约10mL/min与约20mL/min之间、在约20mL/min与约100mL/min之间、在约20mL/min与约90mL/min之间、在约20mL/min与约80mL/min之间、在约20mL/min与约70mL/min之间、在约20mL/min与约60mL/min之间、在约20mL/min与约50mL/min之间、在约20mL/min与约40mL/min之间、在约20mL/min与约30mL/min之间、在约30mL/min与约100mL/min之间、在约30mL/min与约90mL/min之间、在约30mL/min与约80mL/min之间、在约30mL/min与约70mL/min之间、在约30mL/min与约60mL/min之间、在约30mL/min与约50mL/min之间、在约30mL/min与约40mL/min之间、在约40mL/min与约100mL/min之间、在约40mL/min与约90mL/min之间、在约40mL/min与约80mL/min之间、在约40mL/min与约70mL/min之间、在约40mL/min与约60mL/min之间、在约40mL/min与约50mL/min之间、在约50mL/min与约100mL/min之间、在约50mL/min与约90mL/min之间、在约50mL/min与约80mL/min之间、在约50mL/min与约70mL/min之间、在约50mL/min与约60mL/min之间、在约60mL/min与约100mL/min之间、在约60mL/min与约90mL/min之间、在约60mL/min与约80mL/min之间、在约60mL/min与约70mL/min之间、在约70mL/min与约100mL/min之间、在约70mL/min与约90mL/min之间、在约70mL/min与约80mL/min之间、在约80mL/min与约100mL/min之间、在约80mL/min与约90mL/min或在约90mL/min与约100mL/min之间。

[0370] 在一些实施方案中,第二流速在约5mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第二离心力在约350G与约4,000G之间;并且(ii) 第二流速在约5mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速在约10mL/min与约65mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速在约10mL/min与约35mL/min之间。在一些实施方案中,细胞是激活的T细胞。在一些实施方案中,T细胞(例如,激活的T细胞)具有如下平均直径:约5 $\mu$ m至约25 $\mu$ m、约5 $\mu$ m至约20 $\mu$ m、约5 $\mu$ m至约15 $\mu$ m、约5 $\mu$ m至约10 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约25 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约20 $\mu$ m、约10 $\mu$ m至约15 $\mu$ m、约15 $\mu$ m至约25 $\mu$ m、约15 $\mu$ m至约20 $\mu$ m或约20 $\mu$ m至约25 $\mu$ m。在一些实施方案中,T细胞具有约9 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。

[0371] 在一些实施方案中,T细胞具有约10 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约12 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约14 $\mu$ m至约20 $\mu$ m的平均直径。

[0372] 在一些实施方案中,所述第二流速是30mL/min或更小。在一些实施方案中,第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中,(i) 第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii) 第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中,T细胞是非激活的T细胞或较少激活的T细胞。在一些实施方案中,T细胞被冷冻保存并在应用所述方法之前解冻。在一些实施方案中,T细胞具有小于9 $\mu$ m的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约3 $\mu$ m至约9 $\mu$ m、约4 $\mu$ m至约9 $\mu$ m、约5 $\mu$ m至约9 $\mu$ m、约6 $\mu$ m至约9 $\mu$ m、约7 $\mu$ m至约9 $\mu$ m或约8 $\mu$ m

至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0373] 在一些实施方案中，所述第二流速是30mL/min或更小。在一些实施方案中，第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中，(i) 第二离心力在约500G与约1,500G之间；并且(ii) 第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中，T细胞是非激活的T细胞或较少激活的T细胞。在一些实施方案中，所述方法包括在将第一离心力和第一流速施加至细胞组合物之前激活和培养细胞组合物的细胞(例如，培养细胞至少24、48、72或96小时)。在一些实施方案中，所述方法包括冷冻保存经富集的组合物中的T细胞以及任选地将其解冻。在一些实施方案中，T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约3 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约4 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约7 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 或约8 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0374] 在一些实施方案中，第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中，(i) 第二离心力在约1,500G与约3,000G之间；并且(ii) 第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中，第二流速在约65mL/min与约90mL/min之间。在一些实施方案中，第二流速在约65mL/min与约80mL/min之间。在一些实施方案中，T细胞是非激活的T细胞或较少激活的T细胞。在一些实施方案中，T细胞被冷冻保存并在应用所述方法之前解冻。在一些实施方案中，T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约3 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约4 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约7 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 或约8 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0375] 在一些实施方案中，第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中，(i) 第二离心力在约1,500G与约3,000G之间；并且(ii) 第二流速在约65mL/min与约100mL/min之间。在一些实施方案中，第二流速在约65mL/min与约90mL/min之间。在一些实施方案中，第二流速在约65mL/min与约80mL/min之间。在一些实施方案中，T细胞是非激活的T细胞或较少激活的T细胞。在一些实施方案中，所述方法包括冷冻保存经富集的组合物中的细胞以及任选地将其解冻。在一些实施方案中，T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约3 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约4 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约7 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 或约8 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中，T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0376] 在一些实施方案中，第二流速在约10与约100mL/min之间、在约15与约90mL/min之间、在约20与约80mL/min之间、在约25与约70mL/min之间、在约30与约60mL/min之间或在约35与约50mL/min之间。在一些实施方案中，第二流速是约20mL/min、约21mL/min、约22mL/min、约23mL/min、约24mL/min、约25mL/min、约25.5mL/min、约26mL/min、约26.5mL/min、约27mL/min、约27.5mL/min、约28mL/min、约28.5mL/min、约29mL/min、约29.5mL/min、约30mL/min、约31mL/min、约32mL/min、约33mL/min、约34mL/min或约35mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约25mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约25.5mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约26mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约26.5mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约27mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约27.5mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约28mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约28.5mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约29mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约29.5mL/min。在一些实施方案中，第二流速是约30mL/min。

[0377] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约20与约100之间、在20与约90之间、在20与约80之间、在20与约70之间、在20与约60之间、在20与约50之间、在20与约40之间、在20与约30之间、在30与约100之间、在30与约90之间、在30与约80之间、在30与约70之间、在30与约60之间、在30与约50之间、在30与约40之间、在40与约100之间、在40与约90之间、在40与约80之间、在40与约70之间、在40与约60之间、在40与约50之间、在50与约100之间、在50与约90之间、在50与约80之间、在50与约70之间、在50与约60之间、在60与约100之间、在60与约90之间、在60与约80之间、在60与约70之间、在70与约100之间、在70与约90之间、在70与约80之间、在80与约100之间、在80与约90之间或在约90与约100之间。

[0378] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约30与约70之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约30与约40之间。在一些实施方案中,细胞是激活的T细胞。在一些实施方案中,T细胞(例如,激活的T细胞)具有如下平均直径:约5 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约15 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约10 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 、约10 $\mu\text{m}$ 至约15 $\mu\text{m}$ 、约15 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 、约15 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 或约20 $\mu\text{m}$ 至约25 $\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,T细胞具有约9 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0379] 在一些实施方案中,T细胞具有约10 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约12 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约14 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0380] 在一些实施方案中,T细胞具有约9 $\mu\text{m}$ 至约20 $\mu\text{m}$ 的平均直径,并且第二离心力与第二流速的比率在约30与约70之间。在一些实施方案中,T细胞具有10 $\mu\text{m}$ 至20 $\mu\text{m}$ (例如,12 $\mu\text{m}$ 至20 $\mu\text{m}$ 或14 $\mu\text{m}$ 至20 $\mu\text{m}$ )的平均直径,并且第二离心力与第二流速的比率在约30与约70之间。在一些实施方案中,T细胞具有12 $\mu\text{m}$ 至20 $\mu\text{m}$ 的平均直径,并且第二离心力与第二流速的比率在约30与约70之间。在一些实施方案中,T细胞具有14 $\mu\text{m}$ 至20 $\mu\text{m}$ 的平均直径,并且第二离心力与第二流速的比率在约30与约70之间。

[0381] 在一些实施方案中,T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径,并且第二离心力与第二流速的比率在约30与约40之间。

[0382] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约30与约40之间。在一些实施方案中,T细胞是非激活的T细胞或较少激活的T细胞。在一些实施方案中,T细胞被冷冻保存并在应用所述方法之前解冻。在一些实施方案中,T细胞具有小于9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约3 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约4 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约5 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 、约7 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 或约8 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约6 $\mu\text{m}$ 至约9 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0383] 在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率在约20与约100之间、在约25与约80之间或在约30与约60之间。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约20。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约25。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约30。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约35。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约40。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约45。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约50。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约55。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约60。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约65。在一些实施方

案中,第二离心力与第二流速的比率是约70。在一些实施方案中,第二离心力与第二流速的比率是约75。

[0384] 在一些实施方案中,第二离心力在约500G与约1,500G之间,并且第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。在一些实施方案中,第二离心力是约1,000G并且流速是约28.5mL/min。

[0385] 在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物,持续在约5分钟与约100分钟之间、在约10分钟与约90分钟之间、在约15分钟与约80分钟之间、在约20分钟与约70分钟之间、在约25分钟与约60分钟之间、在约30分钟与约50分钟之间或在约35分钟与约40分钟之间。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约5分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约10分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约15分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约20分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约25分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约30分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约45分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约60分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约75分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物约90分钟。

[0386] 在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物至少约15分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物至少约30分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物至少约45分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物至少约60分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物至少约75分钟。在一些实施方案中,将第二离心力和第二流速施加至细胞组合物至少约90分钟。

#### A. 细胞组合物(例如,工程化细胞组合物)

[0387] 在一些实施方案中,在连续逆流离心机系统中针对活细胞富集包含T细胞(例如,先前工程化以表达抗原受体的T细胞)的细胞组合物。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的细胞浓度是从或从约 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL至 $1.0 \times 10^8$ 个细胞/mL,如至少或约至少或约 $1.0 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $5 \times 10^5$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL、 $5 \times 10^6$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL、 $5 \times 10^7$ 个细胞/mL或 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $1.25 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $1.75 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $2.25 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $2.5 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $2.75 \times 10^6$ 个细胞/mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $3 \times 10^6$ 个细胞/mL。

[0388] 在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积包含在约20mL与约300mL之间、在约25mL与约250mL之间、在约30mL与约200mL之间、在约35mL与约150mL之间或在约40mL与约100mL之间。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约20mL。在一些实施方案中,工

程化细胞组合物的体积是约25mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约30mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约35mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约40mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约45mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约50mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约55mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约60mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约70mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约80mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约100mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约125mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约150mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约175mL。在一些实施方案中,工程化细胞组合物的体积是约200mL。

[0389] 在一些实施方案中,工程化细胞组合物包含约 $1 \times 10^8$ 个总细胞、约 $2 \times 10^8$ 个总细胞、约 $3 \times 10^8$ 个总细胞、约 $4 \times 10^8$ 个总细胞、约 $5 \times 10^8$ 个总细胞、约 $6 \times 10^8$ 个总细胞、约 $7 \times 10^8$ 个总细胞、约 $8 \times 10^8$ 个总细胞、约 $9 \times 10^8$ 个总细胞或约 $1 \times 10^9$ 个总细胞。

[0390] 在一些实施方案中,T细胞具有如下平均直径:约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $15 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $10 \mu\text{m}$ 、约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 、约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 、约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $15 \mu\text{m}$ 、约 $15 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 、约 $15 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 或约 $20 \mu\text{m}$ 至约 $25 \mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,T细胞具有约 $9 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,细胞是激活的T细胞。

[0391] 在一些实施方案中,T细胞具有约 $10 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约 $12 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约 $14 \mu\text{m}$ 至约 $20 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,细胞是激活的T细胞。

[0392] 在一些实施方案中,T细胞具有小于 $9 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约 $3 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 、约 $4 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 、约 $5 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 、约 $6 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 、约 $7 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 或约 $8 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 的平均直径。在一些实施方案中,T细胞具有约 $6 \mu\text{m}$ 至约 $9 \mu\text{m}$ 的平均直径。

[0393] 在一些实施方案中,在根据所提供的方法进行基因工程化之前孵育和/或培养细胞。孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,所述方法包括在基因工程化之前在刺激条件下孵育细胞组合物的T细胞。此类条件包括设计为诱导群体中细胞的增殖、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)的那些。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))。

[0394] 在一些实施方案中,在施加第一离心力和第一流速之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。在一些实施方案中,所述方法包括在将细胞组合物装载至离心机系统之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。在一些实施方案中,在将细胞组合物装载至离心机系统之前将细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育。在一些实施方案中,细胞组合物包含激活的T细胞。在一些实施方案中,细胞组合物包含表达HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L、4-1BB或其组合的T细胞。

[0395] 在一些实施方案中,刺激条件包括刺激试剂的存在。在一些实施方案中,刺激试剂能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些方面,药剂在T细胞中开启或启动

TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类药剂可以包括例如结合至固体支持物(如珠)的抗体,如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些抗体(例如抗CD3、抗CD28);和/或一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,刺激试剂包含(i)与TCR复合物的成员特异性结合的一级药剂;和(ii)与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂。在一些实施方案中,一级药剂与CD3特异性结合。在一些实施方案中,共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。在一些实施方案中,一级药剂和二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,一级药剂是或包含抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,二级药剂是或包含抗CD28抗体或其抗原结合片段。任选地,扩增方法可以进一步可以包括向培养基中(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。

[0396] 在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,IL-2浓度为至少约10单位/mL。在一些方面,孵育是根据多种技术来进行,如以下文献中所述的那些技术: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。

[0397] 在一些实施方案中,刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或在约37摄氏度。任选地,孵育可以进一步包括添加非分裂的EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用约6000至10,000拉德范围内的 $\gamma$ 射线辐照LCL。在一些方面,LCL饲养细胞以任何合适的量来提供,如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1。

[0398] 在实施方案中,通过用抗原刺激幼稚或抗原特异性T淋巴细胞获得抗原特异性T细胞,如抗原特异性CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞。例如,可以通过从受感染的受试者中分离T细胞并用相同的抗原在体外刺激细胞,针对巨细胞病毒抗原产生抗原特异性T细胞系或克隆。

[0399] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的病毒载体颗粒。在一些此类情形中,可以在激活之前和或在不存在激活的情况下选择和/或转导细胞。

[0400] 在一些实施方案中,细胞组合物中的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的细胞(例如,T细胞)被激活,如在一些情况下,对于HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和/或4-1BB中的一种或多种呈表面阳性。在一些实施方案中,在开始施加第一离心力和第一流速之前,例如在建立流化床之前和/或在开始转导之前,如在存在抗CD3/抗CD28的情况下,用激活剂激活细胞。在不存在外源生长因子或存在少量外源生长因子的情况下体外扩增T细胞群的方法是本领域已知的(参见例如,美国专利6,352,694B1和欧洲专利EP 0 700 430B1)。通常,此类方法采用大于1 $\mu$ M的固相表面,其中各种结合剂(例如,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)被固定至所述固相表面上。例如,Dynabeads®CD3/CD28(Invitrogen)是用于T细胞扩增的可商购试剂,其是用针对人T细胞上的CD3和CD28细胞表面分子的亲和纯化的单克隆抗体的混合物包被的均匀的4.5 $\mu$ m超顺磁性、无菌、无热原聚苯乙烯珠。在一些实施方案中,激活剂(例如,抗CD3和/或抗CD28)可以固定在珠(如磁珠)上。

[0401] 在一些实施方案中,细胞激活也在存在IL-2(例如,从或从约50IU/mL至200IU/mL,如或约100IU/mL)的情况下进行。在一些实施方案中,激活进行如下时间: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,如至少或约至少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,激活在如下温度下进行:大于或大于约25°C,如通常大于或大于约32°C、35°C或37°C,例如为或约37°C±2°C,如为或约37°C的温度。

[0402] 在一些实施方案中,在开始接触之前,例如在开始转导之前,如在存在抗CD3/抗CD28的情况下,细胞未用激活剂激活。在一些实施方案中,细胞组合物包含多个静息细胞。在一些实施方案中,群体中至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的T细胞是静息T细胞,如缺乏T细胞激活标记物(如表面标记物或细胞内细胞因子或其他标记物)的T细胞和/或处于细胞周期的G0或G0G1a期的T细胞。

[0403] 在特定方面,所提供的方法允许在T细胞中发生转导,而无需在与寡聚体蛋白试剂(如多聚化试剂)接触和/或孵育之前激活。在一些实施方案中,所述方法包括用病毒载体转导含有静息或幼稚T细胞的T细胞群,而不首先(例如,在转导之前)激活和/或刺激T细胞。在一些此类实施方案中,所提供的方法可以用于制备用于过继疗法的细胞,如T细胞,所述方法不包括激活和/或刺激T细胞的步骤。

[0404] 在一些实施方案中,细胞通常是真核细胞,如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,细胞源自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,或者是免疫系统的细胞,如先天免疫或适应性免疫的细胞,例如髓系或淋巴样细胞(包括淋巴细胞,通常是T细胞和/或NK细胞)。其他示例性细胞包括干细胞,如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。细胞通常是原代细胞如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些原代细胞。在一些实施方案中,细胞是原代T细胞。在一些实施方案中,细胞是来自人受试者的原代T细胞。在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如整个T细胞群、CD4<sup>+</sup> T细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞及其亚群,如由以下各项所定义的那些亚群:功能、激活状态、成熟度、分化的可能性、扩增、再循环、定位和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记物或细胞因子分泌特征和/或分化程度。在一些实施方案中,细胞包含CD3<sup>+</sup> T细胞或针对CD3<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞包含CD4<sup>+</sup> T细胞或针对CD4<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞包含CD8<sup>+</sup> T细胞或针对CD8<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞包含CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞。关于待治疗的受试者,细胞可以是同种异体的和/或自体的。所述方法包括现成的方法。在一些方面,如对于现有技术,细胞是多能的和/或多潜能的,如干细胞,如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从受试者分离细胞,对其进行制备、处理、培养和/或工程化,如本文所述,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者体内。

[0405] T细胞和/或CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞的亚型和亚群包括幼稚T(TN)细胞、效应T细胞(TEFF)、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T(TSCM)、中枢记忆T(TCM)、效应记忆T(TEM)或终末分化效应记忆T细胞)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞(如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助细胞T细胞)、α/β T细胞和δ/γ T细胞。

[0406] 在一些实施方案中,细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,细胞是单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞

和/或嗜碱性粒细胞。

[0407] 在一些实施方案中,细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。细胞可以从样品(如生物样品,例如获得自或源自受试者的生物样品)分离。在一些实施方案中,从其分离出细胞的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将其施用细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中细胞被分离、处理和/或工程化)的人。

[0408] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个处理步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过处理的样品。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,包括源自其的处理的样品。

[0409] 在一些方面,衍生出或分离细胞的样品是血液或源自血液的样品,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、外周血单个核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检物、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、黏膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自其的细胞。在一些实施方案中,细胞是PBMC。在细胞疗法(例如,过继细胞疗法)的情况下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0410] 在一些实施方案中,细胞源自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,所述细胞获得自异种来源,例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物或猪。

[0411] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备步骤和/或非基于亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在存在一种或多种试剂的情况下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、富集所需组分、溶解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,细胞基于一种或多种特性来分离,所述特性如密度、粘附特性、大小、对特定组分的敏感性和/或耐药性。

[0412] 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。

[0413] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的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培养基中以用于后续的处理步骤。在一些实施方案中,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书,通过半自动“流通式”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将所述细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并且将细胞直接重悬于培养基中。

[0414] 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梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0415] 在一些实施方案中,在进行所提供的方法之前不必富集或选择细胞。

[0416] 在一些实施方案中,分离方法包括基于一种或多种特定分子(如表面标记物(例

如,表面蛋白)、细胞内标记物或核酸)在细胞中的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的用于基于此类标记物进行分离的方法。分离方法可以包括本文公开的那些方法中的任一种,包括使用可逆试剂系统(例如,如本文所述的药剂(如受体结合剂或选择剂)和试剂)的方法。

[0417] 在一些实施方案中,分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,分离包括基于细胞的一种或多种标记物(通常为细胞表面标记物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过与特异性结合此类标记物的抗体或结合配偶体一起孵育,然后通常进行洗涤步骤以及将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。

[0418] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记物进行分离的情况下,阴性选择可能特别有用。

[0419] 分离无需导致特定细胞群或表达特定标记物的细胞的100%富集或去除。例如,对特定类型的细胞(如表达标记物的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要使不表达所述标记物的细胞完全不存在。同样,对特定类型的细胞(如表达标记物的那些)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,但不需要使所有此类细胞完全去除。

[0420] 在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD3<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD3<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD4<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD8<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,将细胞组合物针对CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞进行富集。在一些实施方案中,细胞组合物中至少70%、至少75%、至少80%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的细胞是CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0421] 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,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗尽表达多种标记物的细胞,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物具有特异性)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,可以同时多个细胞类型进行阳性选择。

[0422] 例如,在一些方面,通过阳性或阴性选择技术来分离T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记物呈阳性或表达高水平的表面标记物的细胞,例如CD28<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD127<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>和/或CD45RO<sup>+</sup> T细胞。

[0423] 例如,可以使用CD3/CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS<sup>®</sup>M-450CD3/CD28 T细

胞扩增器)对CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup> T细胞进行阳性选择。

[0424] 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,阳性或阴性选择通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育来完成,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(标记物+)或以相对更高水平表达(标记物高)的一种或多种表面标记物特异性结合。

[0425] 在一些实施方案中,通过非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上表达的标记物如CD14的阴性选择,将T细胞从PBMC样品分离。在一些方面,CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>选择步骤用于分离CD4<sup>+</sup>辅助T细胞和CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞。此类CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>群体可以通过针对在一种或多种幼稚T细胞、记忆T细胞和/或效应T细胞亚群上表达或表达至相对较高程度的标记物进行阳性或阴性选择来进一步分选为亚群。

[0426] 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,进一步富集或耗尽CD8<sup>+</sup>细胞中的幼稚、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(TCM)细胞进行富集以增加功效,如以改善施用后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人(2012) Blood. 1:72-82;Wang等人(2012) JImmunother. 35(9):689-701。在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8<sup>+</sup> T细胞与CD4<sup>+</sup> T细胞进一步增强功效。

[0427] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8<sup>+</sup>外周血淋巴细胞的CD62L<sup>+</sup>和CD62L<sup>-</sup>两个子集中。可以如使用抗CD8和抗CD62L抗体将PBMC针对CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>和/或CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>级分进行富集或耗尽。

[0428] 在一些实施方案中,中枢记忆T(TCM)细胞的富集是基于CD45RO<sup>-</sup>、CD62L<sup>-</sup>、CCR7<sup>-</sup>、CD28<sup>-</sup>、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,通过表达CD4<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>的细胞的耗尽和表达CD62L<sup>+</sup>的细胞的阳性选择或富集来进行富含TCM细胞的CD8<sup>+</sup>群体的分离。在一方面,中枢记忆T(TCM)细胞的富集从基于CD4表达所选择阴性细胞级分开始进行,所述阴性细胞级分经受基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择以及基于CD62L的阳性选择。此类选择在一些方面是同时进行的,而在其他方面按任何顺序依序进行。在一些方面,将用于制备CD8<sup>+</sup>细胞群或亚群的基于CD4表达的不同选择步骤也用于生成CD4<sup>+</sup>细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分二者都被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在—个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0429] 在特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品进行CD4<sup>+</sup>细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。然后基于CD14和CD45RA或CD19的表达对阴性级分进行阴性选择,并基于中枢记忆T细胞(如CD62L或CCR7)的标记物特征进行阳性选择,其中以任何顺序进行阳性和阴性选择。

[0430] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4<sup>+</sup> T辅助细胞分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4<sup>+</sup>淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,幼稚CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞是CD45RO<sup>-</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4<sup>+</sup>细胞呈CD62L<sup>+</sup>和CD45RO<sup>+</sup>。在一些实施方案中,效应CD4<sup>+</sup>细胞是CD62L<sup>-</sup>和CD45RO<sup>-</sup>。

[0431] 在一个例子中,为了通过阴性选择富集CD4<sup>+</sup>细胞,单克隆抗体混合物通常包含针

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),以允许分离细胞用于阳性和/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)分离技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于以下文献中: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.Schumacher编辑©Humana Press Inc.,Totowa,NJ)。

[0432] 在一些方面,将要分离的细胞的样品或组合物与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,如DynaBeads或MACS珠))一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记物)特异性结合。

[0433] 在一些实施方案中,磁性颗粒或珠含有与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在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的美国专利号4,795,698;和Liberti等人的美国专利号5,200,084中所述的那些)是其他的例子。

[0434] 孵育通常在这样的条件下进行,由此附着于磁性颗粒或珠的抗体或结合配偶体或者与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。

[0435] 在一些方面,将样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;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和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步处理或经历另外的分离步骤。

[0436] 用于从细胞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、与可切割接头缀合的可磁化颗粒或抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0437] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是通过磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotech,加利福尼亚州奥本)进行的。磁激活细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以如下模式操作,其中在施加外部磁场之后依序洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附接至磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附接的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,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,非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0438] 在某些实施方案中,使用如下系统、装置或设备进行分离或分开,所述系统、装置或设备进行所述方法的分离、细胞制备、分开、处理、孵育、培养和/或制备步骤中的一个或多个。在一些方面,系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,系统是如国际专利申请公开号WO 2009/072003或US20110003380 A1中所述的系统。

[0439] 在一些实施方案中,所述系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动化或可编程方式进行分离、处理、工程化和配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结局评估和/或调整。

[0440] 在一些方面,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤,例如用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上进行细胞的自动化分离。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单元,其允许自动洗涤和通过离心来分级分离细胞。

[0441] 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,其中流体流中携带针对多种细胞表面标记物染色的细胞。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)本文所述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140;Cho等人(2010)Lab Chip 10,1567-1573;以及Godin等人(2008)J Biophoton.1(5):355-376。在两种情况下,可以用多种标记物来标记物细胞,从而允许以高纯度分离明确定义的T细胞子集。

[0442] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或基因工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)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,例如在洗涤步骤之后将所述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。一个例子包括使用含有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。然后用培养基将其1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将所述细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储罐的气相中。

#### B. 经富集的组合物

[0443] 在一些实施方案中,所述方法包括将第三离心力和第三流速施加至经富集的组合物以产生包含活力富集的细胞(例如,包含工程化细胞)的经富集的组合物。在一些实施方案中,收集或收获经富集的组合物,如以用于细胞疗法中的下游用途。在一些实施方案中,将第三离心力和第三流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的经富集的组合物中的细胞。在一些实施方案中,将第三离心力和第三流速施加至经富集的细胞允许收集或收获经富集的组合物。

[0444] 在一些实施方案中,经由套管收集经富集的组合物。在一些实施方案中,经富集的组合物在圆锥形流体外壳的尖端处或附近进入套管的末端,并且在圆锥形流体外壳的宽端处或附近离开套管的末端。

[0445] 在一些实施方案中,所述方法涉及冷冻保存经富集的组合物。在一些实施方案中,经富集的组合物中的活细胞水平在冷冻保存的经富集的组合物中维持。在一些实施方案中,所述方法涉及将冷冻保存的经富集的组合物解冻。在一些实施方案中,经富集的组合物中的活细胞水平在解冻的经富集的组合物中维持。

[0446] 在一些实施方案中,第三离心力在约2,000G与约3,000G、在约2,200G与约2,800G之间或在约2,400G与约2,600G之间。在一些实施方案中,第三离心力是约2,000G。在一些实

实施方案中,第三离心力是约2,100G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,200G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,300G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,400G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,500G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,600G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,700G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,800G。在一些实施方案中,第三离心力是约2,900G。在一些实施方案中,第三离心力是约3,000G。

[0447] 在一些实施方案中,第三流速是径向向外的。在一些实施方案中,第三流速被引导朝向圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第三离心力和第三流速在相同或基本相同的方向上。

[0448] 在一些实施方案中,第三流速受通过圆锥形流体外壳的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过圆锥形流体外壳的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开圆锥形流体外壳的尖端进入套管。

[0449] 在一些实施方案中,第三流速在约10mL/min与约30mL/min之间、在约12mL/min与约28mL/min之间、在约15mL/min与约25mL/min之间或在约18mL/min与约22mL/min之间。在一些实施方案中,第三流速是约15mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约16mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约17mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约18mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约19mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约20mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约21mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约22mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约23mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约24mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约15mL/min。在一些实施方案中,第三流速是约25mL/min。

[0450] 在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率在约100与约150之间、在约110与140之间或在约120与130之间。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约100。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约105。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约110。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约115。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约120。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约125。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约130。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约135。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约140。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约145。在一些实施方案中,第三离心力与第三流速的比率是约150。

[0451] 在一些实施方案中,第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。在一些实施方案中,第三离心力是约2,500G并且第三流速是约20mL/min。

[0452] 在一些实施方案中,处理步骤可以另外包括细胞的洗涤、培养、培育、刺激、激活、繁殖和/或配制。在一些实施方案中,在收集作为输出组合物之前,使经富集的细胞经受一个或多个洗涤步骤。在一些实施方案中,将所收集的经富集的组合物细胞在存在刺激条件或刺激剂的情况下孵育。此类条件包括设计用于诱导群体中的细胞的增殖、扩增、激活和/或存活和/或模拟抗原暴露的条件。可以在施用于受试者后离体或在体内进行刺激。在一些实施方案中,收集经富集的组合物并使其经受进一步的处理步骤,包括章节I.C中描述的那些中的任一种。C. 经富集的组合物的示例性特征

[0453] 在一些实施方案中,经富集的组合物(例如,所收集的经富集的组合物)的体积包

含在约1ml与约20,000ml之间、在约5ml与约2,000ml之间、在约10ml与约1,000ml之间、在约15ml与约500ml之间或在约20ml与约100ml之间。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约1ml、约5ml、约10ml、约15ml、约20ml、约25ml、约30ml、约35ml、约40ml、约45ml、约50ml、约55ml、约60ml、约65ml、约70ml、约75ml、约80ml、约85ml、约90ml、约95ml或约100ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约1ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约5ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约10ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约15ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约20ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约25ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约30ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约35ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约40ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约45ml。在一些实施方案中,经富集的组合物的体积是约50ml。

[0454] 在一些实施方案中,经富集的组合物比细胞组合物包含更大百分比的活T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物比细胞组合物包含更大百分比的活T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%或大至少约25%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比大约5%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约10%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约15%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约20%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约25%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比高约30%。

[0455] 在一些实施方案中,经富集的组合物比细胞组合物(例如,工程化细胞组合物)包含更大百分比的活T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T细胞的百分比比细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%或至少约25%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T输入的百分比比细胞组合物中活T输入的百分比大约5%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T输入的百分比比细胞组合物中活T输入的百分比高约10%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T输入的百分比比细胞组合物中活T输入的百分比高约15%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T输入的百分比比细胞组合物中活T输入的百分比高约20%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T输入的百分比比细胞组合物中活T输入的百分比高约25%。在一些实施方案中,经富集的组合物中活T输入的百分比比细胞组合物中活T输入的百分比高约30%。

[0456] 在特定实施方案中,经富集的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,经富集的组合物含有至少或至少约75%的活细胞。在某些实施方案中,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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,经富集的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。

[0457] 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/或频率的对凋亡标记物呈阳性的细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中小于或小于约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%的细胞表达、含有凋亡标记物和/或对凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,经富集的组合物中小于或小于约25%的细胞表达、含有凋亡标记物和/或对凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,经富集的组合物中小于或小于约10%的细胞表达、含有凋亡标记物和/或对凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,经富集的组合物中小于或小于约5%的细胞表达、含有凋亡标记物和/或对凋亡标记物呈阳性。在某些实施方案中,经富集的组合物中小于或小于约1%的细胞表达、含有凋亡标记物和/或对凋亡标记物呈阳性。

[0458] 在特定实施方案中,经富集的组合物是针对CD3+ T细胞富集的细胞组合物。在一些实施方案中,经富集的组合物中至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约98.5%、至少或约99%、至少或约99.5%、至少或约99.9%、100%或约100%的总细胞是CD3+ T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中至少或约86%、至少或约86.5%、至少或约87%、至少或约87.5%、至少或约88%、至少或约88.5%、至少或约89%、至少或约89.5%、至少或约90%、至少或约90.5%、至少或约91%、至少或约91.5%、至少或约92%、至少或约92.5%、至少或约93%、至少或约93.5%、至少或约94%、至少或约94.5%、至少或约95%、至少或约95.5%、至少或约96%、至少或约96.5%、至少或约97%、至少或约97.5%、至少或约98%或至少或约98.5%的总细胞是CD3+ T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中在约80%与约100%之间、在约85%与约98%之间、在约88%与约96%之间或在约90%与约94%之间的总细胞是CD3+ T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物基本上由CD3+ T细胞组成。在一些实施方案中,经富集的组合物中至少或约90%的总细胞是CD3+ T细胞,并且经富集的组合物中至少或约40%的总细胞表达重组受体(例如,CAR)。

[0459] 在某些实施方案中,经富集的组合是富含CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞的细胞组合。在特定实施方案中,CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞占经富集的组合中总细胞的至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约98%、至少或约98.5%、至少或约99%、至少或约99.5%、至少或约99.9%、100%或约100%。在一些实施方案中,CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞占经富集的组合中总细胞的至少或约86%、至少或约86.5%、至少或约87%、至少或约87.5%、至少或约88%、至少或约88.5%、至少或约89%、至少或约89.5%、至少或约90%、至少或约90.5%、至少或约91%、至少或约91.5%、至少或约92%、至少或约92.5%、至少或约93%、至少或约93.5%、至少或约94%、至少或约94.5%、至少或约95%、至少或约95.5%、至少或约96%、至少或约96.5%、至少或约97%、至少或约97.5%、至少或约98%或至少或约98.5%。在一些实施方案中,CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞占经富集的组合中总细胞的在约80%与约100%之间、在约85%与约98%之间、在约88%与约96%之间或在约90%与约94%之间。在一些实施方案中,经富集的组合基本上由CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞组成。

[0460] 在特定实施方案中,经富集的组合含有在为或约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%之间或约50%或50%的CD4<sup>+</sup> 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%之间或约50%或50%的CD8<sup>+</sup> T细胞。在某些实施方案中,经富集的组合含有在为或约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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T细胞,以及为或约在为或约35%与为或约65%之间的CD8<sup>+</sup> T细胞。在特定实施方案中,经富集的组合含有比率在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<sup>+</sup> T细胞与CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,细胞组合具有比率为为或约3:1、为或约2.8:1、为或约2.5:1、为或约2.25:1、为或约2:1、为或约1.8:1、为或约1.7:1、为或约1.6:1、为或约1.5:1、为或约1.4:1、为或约1.3:1、为或约1.2:1、为或约1.1:1、为或约1:1、为或约1:1.1、为或约1:1.2、为或约1:1.3、为或约1:1.4、为或约1:1.5、为或约1:1.6、为或约1:1.7、为或约1:1.8、为或约1:2、为或约1:2.25、为或约1:2.5、为或约1:2.8或者为或约1:3的CD4<sup>+</sup> T细胞与CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0461] 在一些实施方案中,经富集的组合含有比率在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<sup>+</sup> T细胞与表达重组受体(例如CAR)的CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,在经富集的组合中表达重组受体(例如,CAR)的CD4<sup>+</sup> T细胞与表达重组受体(例如,CAR)的CD8<sup>+</sup> T细胞的比率为为或约3:

1、为或为约2.8:1、为或为约2.5:1、为或为约2.25:1、为或为约2:1、为或为约1.8:1、为或为约1.7:1、为或为约1.6:1、为或为约1.5:1、为或为约1.4:1、为或为约1.3:1、为或为约1.2:1、为或为约1.1:1、为或为约1:1、为或为约1:1.1、为或为约1:1.2、为或为约1:1.3、为或为约1:1.4、为或为约1:1.5、为或为约1:1.6、为或为约1:1.7、为或为约1:1.8、为或为约1:2、为或为约1:2.25、为或为约1:2.5、为或为约1:2.8或为或为约1:3。

[0462] 在一些实施方案中,与所提供的方法结合生成或产生的经富集的组合含有表达重组受体(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具有定位于细胞膜和/或细胞表面的一种或多种重组受体蛋白,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物的mRNA或蛋白质。

[0463] 在一些实施方案中,经富集的组合中至少或约5%、至少或约10%、至少或约20%、至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的细胞表达重组受体。在某些实施方案中,经富集的组合中至少或约50%的细胞表达重组受体。在某些实施方案中,经富集的组合中至少或约5%、至少或约10%、至少或约20%、至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的CD3+ T细胞表达重组受体。在一些实施方案中,经富集的组合中至少或约50%的CD3+ T细胞表达重组受体。在某些实施方案中,经富集的组合中至少或约5%、至少或约10%、至少或约20%、至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的细胞是表达重组受体的CD3+ T细胞。在一些实施方案中,经富集的组合中至少或约50%的细胞是表达重组受体的CD3+ T细胞。

[0464] 在特定实施方案中,经富集的组合中至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的CD4+ T细胞表达重组受体。在特定实施方案中,经富集的组合中至少或约50%的CD4+ T细胞表达重组受体。在一些实施方案中,经富集的组合中至少或约30%、至少或约40%、至少或约45%、至少或约50%、至少或约55%、至少或约60%、至少或约65%、至少或约70%、至少或约75%、至少或约80%、至少或约85%、至少或约90%、至少或约95%、至少或约97%、至少或约99%或超过99%的CD8+ T细胞表达重组受体。在某些实施方案中,经富集的组合中至少或约50%的CD8+ T细胞表达重组受体。

[0465] 在特定实施方案中,经富集的组合中至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,经富集的组合中至少或至少约85%、至少或至少约

90%或至少或至少约95%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约90%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约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,对凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约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,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约90%的CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+)CD3+T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的重组受体表达(例如,CAR+)CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,经富集的组合物中至少或至少约90%的重组受体表达(例如,CAR+)CD3+ T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。

[0466] 在特定实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少或至少约85%、至少或至少约90%或至少或至少约95%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少或至少约90%的重组受体表达(例如,CAR+)细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少或至少约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,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少或至少约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,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物

中平均至少或至少约90%的CD3<sup>+</sup> T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在一些实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少或至少约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%的重组受体表达(例如,CAR<sup>+</sup>)CD3<sup>+</sup> T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在特定实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少85%、至少90%或至少95%的重组受体表达(例如,CAR<sup>+</sup>)CD3<sup>+</sup> T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。在某些实施方案中,通过本文所公开的方法产生的多种经富集的组合物中平均至少90%的重组受体表达(例如,CAR<sup>+</sup>)CD3<sup>+</sup> T细胞是活细胞,例如,对细胞凋亡标记物如半胱天冬酶(例如,激活的半胱天冬酶-3)呈阴性的细胞。

[0467] 在任何进行的实施方案中,通过本文公开的方法产生的多种经富集的组合物可以源自相同或不同的供体。在一些方面,所述多种经富集的组合物中的至少两种源自不同的供体。在一些方面,所述多种经富集的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。

[0468] 在特定实施方案中,经富集的组合物的大多数细胞是幼稚或幼稚样细胞、中枢记忆细胞和/或效应记忆细胞。在特定实施方案中,经富集的组合物的大多数细胞是幼稚样或中枢记忆细胞。在一些实施方案中,经富集的组合物中的大多数细胞是中枢记忆细胞。在一些方面,分化程度较低的细胞(例如,中枢记忆细胞)不再存活,并且消耗较慢,从而增加持久性和耐久性。在一些方面,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。

[0469] 在某些实施方案中,经富集的组合物中的细胞具有高份额和/或频率的幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞。在某些实施方案中,经富集的组合物中的幼稚样细胞的份额和/或频率大于从替代过程(如涉及扩增的过程(例如包括扩增单元操作和/或包括旨在引起细胞扩增的步骤的过程))生成的经富集的组合物。在某些实施方案中,幼稚样T细胞可以包括处于不同分化状态的细胞,并且特征可以是某些细胞标记物的阳性或高表达(例如,表面表达或细胞内表达)和/或其他细胞标记物的阴性或低表达(例如,表面表达或细胞内表达)。在一些方面,幼稚样T细胞的特征为CCR7、CD45RA、CD28和/或CD27的阳性或高表达。在一些方面,幼稚样T细胞的特征为CD25、CD45RO、CD56、CD62L和/或KLRG1的阴性表达。在一些方面,幼稚样T细胞的特征为CD95的低表达。在某些实施方案中,幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞是CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>,其中所述细胞是CD27<sup>+</sup>或CD27<sup>-</sup>。在某些实施方案中,幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞是CD27<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>,其中所述细胞是CD45RA<sup>+</sup>或CD45RA<sup>-</sup>。在某些实施方案中,幼稚样T细胞或对幼稚样T细胞上表达的标记物呈表面阳性的T细胞是CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>。

### III. 细胞组合物去珠的方法

[0470] 本文提供了使用离心机系统(例如,“反向”或连续逆流离心机系统)去除珠或使细

胞组合物“去珠”的方法。在一些实施方案中,细胞组合物包含章节I.A.i中所述的那些中的任一种,如先前已与珠(例如,顺磁珠)孵育的细胞组合物。因此,在一些实施方案中,细胞组合物包含细胞(例如,T细胞)和珠(例如,顺磁珠)。

[0471] 在一些实施方案中,珠是顺磁珠,如顺磁性聚苯乙烯珠。在一些实施方案中,细胞先前与珠一起孵育,例如以激活或刺激细胞。在一些实施方案中,将珠用刺激试剂包被。在一些实施方案中,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。在一些实施方案中,刺激试剂包含(i)与TCR复合物的成员特异性结合的一级药剂;和(ii)与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂。在一些实施方案中,一级药剂与CD3特异性结合。在一些实施方案中,共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。在一些实施方案中,一级药剂和二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,一级药剂是或包含抗CD3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,二级药剂是或包含抗CD28抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,珠包括用抗CD3抗体包被的珠。在一些实施方案中,珠包括用抗CD28抗体包被的珠。在一些实施方案中,珠包括用抗CD3抗体包被的珠和用抗CD28抗体包被的珠。

[0472] 在一些实施方案中,细胞组合物包含至少约 $10 \times 10^6$ 个珠、至少约 $25 \times 10^6$ 个珠、至少约 $50 \times 10^6$ 个珠、至少约 $75 \times 10^6$ 个珠、至少约 $100 \times 10^6$ 个珠、至少约 $125 \times 10^6$ 个珠、至少约 $150 \times 10^6$ 个珠、至少约 $175 \times 10^6$ 个珠、至少约 $200 \times 10^6$ 个珠、至少约 $225 \times 10^6$ 个珠、至少约 $250 \times 10^6$ 个珠、至少约 $275 \times 10^6$ 个珠或至少约 $300 \times 10^6$ 个珠。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $100 \times 10^6$ 个珠。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $150 \times 10^6$ 个珠。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $200 \times 10^6$ 个珠。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $250 \times 10^6$ 个珠。在一些实施方案中,细胞组合物包含约 $300 \times 10^6$ 个珠。

[0473] 在一些实施方案中,所述方法包括(i)施加第一离心力和第一流速以建立细胞流化床;和(ii)施加第二离心力和第二流速以从细胞组合物中去除珠,从而生成去珠的组合物。

[0474] 在一些实施方案中,所述方法包括在施加第一离心力和第一流速之前将细胞组合物装载至圆锥形流体外壳中。

[0475] 在一些实施方案中,离心机系统包括在圆锥形流体外壳内的套管。在一些实施方案中,套管沿着圆锥形流体外壳的长度延伸。在一些实施方案中,套管的一端在圆锥形流体外壳的尖端处或附近。在一些实施方案中,套管的另一端在圆锥形流体外壳的宽端处或附近,如在宽端的中心处或附近。

[0476] 在一些实施方案中,将细胞组合物经由套管装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,将细胞组合物在圆锥形流体外壳的尖端处或附近装载至圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,通过以下方式将细胞组合物装载至圆锥形流体外壳中:在圆锥形流体外壳的宽端处或附近进入套管的末端并且在圆锥形流体外壳的尖端处或附近离开套管的末端。

[0477] 在一些实施方案中,通过从圆锥形流体外壳淘洗细胞来从细胞组合物去除珠。在一些实施方案中,淘洗的细胞经由圆锥形流体外壳的宽端处的开口离开圆锥形流体外壳。在一些实施方案中,开口在圆锥形流体外壳的宽端处或附近至少部分地围绕套管的末端。

在一些实施方案中,开口在圆锥形流体外壳的宽端处或附近围绕套管的末端。

[0478] 在一些实施方案中,珠保留在圆锥形流体外壳中。在一些实施方案中,在淘洗细胞之后,将珠从圆锥形流体外壳移除。在一些实施方案中,经由套管移除珠。在一些实施方案中,珠在圆锥形流体外壳的尖端处或附近进入套管的末端,并且在圆锥形流体外壳的宽端处或附近离开套管的末端。

[0479] 在一些实施方案中,第一离心力在约500G与约2,000G之间或在约750G与约1,500G之间或在约500G与约1,000G之间。在一些实施方案中,第一离心力是约500G。在一些实施方案中,第一离心力是约1,000G。在一些实施方案中,第一离心力是约1,500G。在一些实施方案中,第一离心力是约2,000G。

[0480] 在一些实施方案中,第一流速是径向向内的。在一些实施方案中,第一流速被引导远离圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第一离心力被第一流速抵消。在一些实施方案中,第一流速是逆流流速。

[0481] 在一些实施方案中,第一流速受通过套管的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过套管的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开套管以在其尖端处进入圆锥形流体外壳。

[0482] 在一些实施方案中,第一流速在约10mL/min与约50mL/min之间、在约15mL/min与约45mL/min之间、在约20mL/min与约40mL/min之间或在约25mL/min与约35mL/min之间。在一些实施方案中,第一流速是约20mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约25mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约30mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约35mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约40mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约45mL/min。在一些实施方案中,第一流速是约50mL/min。

[0483] 在一些实施方案中,第一离心力是约1000G并且第一流速是约30mL/min。

[0484] 在一些实施方案中,第二离心力在约100G与约1,000G之间、在约200G与约800G之间或在约400G与约600G之间。在一些实施方案中,第二离心力是约100G。在一些实施方案中,第二离心力是约200G。在一些实施方案中,第二离心力是约300G。在一些实施方案中,第二离心力是约400G。在一些实施方案中,第二离心力是约500G。在一些实施方案中,第二离心力是约600G。在一些实施方案中,第二离心力是约700G。在一些实施方案中,第二离心力是约800G。

[0485] 在一些实施方案中,第二流速是径向向内的。在一些实施方案中,第二流速被引导远离圆锥形流体外壳的尖端。在一些实施方案中,第二离心力被第二流速抵消。在一些实施方案中,第二流速是逆流流速。

[0486] 在一些实施方案中,第二流速受通过套管的培养基流的影响。在一些实施方案中,培养基通过套管的流动是从圆锥形流体外壳的宽端到尖端。在一些实施方案中,培养基离开套管以在其尖端处进入圆锥形流体外壳。

[0487] 在一些实施方案中,第二流速在约10mL/min与约100/min之间、在约20mL/min与约80mL/min之间或在约30mL/min与约60mL/min之间。在一些实施方案中,第二流速是约10mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约20mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约30mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约40mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约50mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约60mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约70mL/min。

min。在一些实施方案中,第二流速是约80mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约90mL/min。在一些实施方案中,第二流速是约100mL/min。

[0488] 在一些实施方案中,第二离心力是约600G并且第二流速是约50mL/min。

[0489] 在一些实施方案中,第二离心力和第二流速的施加从细胞组合物去除至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约99%的珠。

[0490] 在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的少于约10%、少于约5%、少于约2%、少于约1%、少于约0.5%、少于约0.2%、少于约0.1%、少于约0.05%、少于约0.02%或少于约0.01%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约10%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约5%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约1%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约1%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约0.5%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约0.1%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约0.05%的珠。在一些实施方案中,去珠的组合物含有细胞组合物中所含的约0.01%的珠。在一些实施方案中,收集去珠的组合物作为去珠的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法包括使去珠的输出组合物经受一个或多个另外的处理步骤,如细胞的转导、洗涤、培养、培育、刺激、增殖和/或配制。在一些实施方案中,随后使去珠的输出组合物经受转导,如以用于细胞疗法中。

#### IV. 病毒载体颗粒

[0491] 在一些实施方案中,病毒载体颗粒是逆转录病毒载体颗粒,如慢病毒颗粒。在一些实施方案中,病毒载体颗粒在病毒载体的基因组中含有编码重组和/或异源分子(例如,重组或异源蛋白,如重组和/或异源受体,如嵌合抗原受体(CAR)或其他抗原受体)的核酸。在一些实施方案中,所述重组分子是趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、抗原受体(例如,CAR或TCR)或其组合。在一些实施方案中,重组分子是趋化因子。在一些实施方案中,重组分子是趋化因子受体。在一些实施方案中,重组分子是细胞因子。在一些实施方案中,重组分子是细胞因子受体。在一些实施方案中,重组分子是抗原受体(例如,CAR或TCR)。在一些实施方案中,抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,抗原受体是T细胞受体(TCR)。病毒载体颗粒的基因组通常包括除了编码重组分子的核酸以外的序列。此类序列可包括允许将基因组包装至病毒颗粒中的序列和/或促进编码重组受体(例如CAR)的核酸表达的序列。

##### A. 病毒载体

[0492] 在一些实施方案中,病毒载体颗粒含有源自基于逆转录病毒基因组的载体(如源自基于慢病毒基因组的载体)的基因组。在所提供的病毒载体的一些方面,编码重组受体(如抗原受体,如CAR)的异源核酸被包含在和/或位于载体基因组的5'LTR与3'LTR序列之间。

[0493] 在一些实施方案中,病毒载体基因组是慢病毒基因组,如HIV-1基因组或SIV基因组。例如,已经通过多次减弱毒力基因生成慢病毒载体,例如,可以使基因env、vif、vpu和nef缺失,使得载体对于治疗目的更安全。慢病毒载体是已知的。参见Naldini等人,(1996和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998;美国专利号6,013,516和5,994,136。在一些

实施方案中,这些病毒载体是基于质粒的或基于病毒的,并且被配置为携带用于掺入外来核酸的必要序列,用于选择和用于将核酸转移至宿主细胞中。已知的慢病毒可以容易地从保管机构或保藏中心(如美国典型培养物保藏中心(“ATCC”;弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道(University Blvd.)10801号20110-2209))获得,或者使用常用技术从已知来源分离。

[0494] 慢病毒载体的非限制性例子包括源自慢病毒的那些,如人免疫缺陷病毒1(HIV-1)、HIV-2、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人嗜T淋巴细胞病毒1(HTLV-1)、HTLV-2或马感染贫血病毒(E1AV)。例如,已经通过多次减弱HIV毒力基因产生慢病毒载体,例如,使基因env、vif、vpr、vpu和nef缺失,使得载体对于治疗目的更安全。慢病毒载体是本领域已知的,参见Naldini等人,(1996和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998;美国专利号6,013,516和5,994,136。在一些实施方案中,这些病毒载体是基于质粒的或基于病毒的,并且被配置为携带用于掺入外来核酸的必要序列,用于选择和用于将核酸转移至宿主细胞中。已知的慢病毒可以容易地从保管机构或保藏中心(如美国典型培养物保藏中心(“ATCC”;弗吉尼亚州马纳萨斯大学大道(University Blvd.)10801号20110-2209))获得,或者使用常用技术从已知来源分离。

[0495] 在一些实施方案中,病毒基因组载体可以含有逆转录病毒(如慢病毒)的5'和3'LTR的序列。在一些方面,病毒基因组构建体可以含有来自慢病毒的5'和3'LTR的序列,并且具体而言可以含有来自慢病毒的5'LTR的R和U5序列以及来自慢病毒的失活或自失活3'LTR。LTR序列可以是来自任何物种的任何慢病毒的LTR序列。例如,它们可以是来自HIV、SIV、FIV或BIV的LTR序列。典型地,LTR序列是HIV LTR序列。

[0496] 在一些实施方案中,病毒载体(如HIV病毒载体)的核酸缺乏另外的转录单元。载体基因组可以含有失活或自失活的3'LTR(Zufferey等人J Virol 72:9873,1998;Miyoshi等人,J Virol 72:8150,1998)。例如,用于产生病毒载体RNA的核酸的3'LTR的U3区域中的缺失可以用于生成自失活(SIN)载体。然后可以在逆转录期间将此缺失转移至原病毒DNA的5'LTR。自失活载体通常具有自3'长末端重复序列(LTR)的增强子和启动子序列缺失,所述缺失在载体整合期间被拷贝至5'LTR中。在一些实施方案中,可以消除足够的序列,包括去除TATA框,以消除LTR的转录活性。这可以防止在转导的细胞中产生全长载体RNA。在一些方面,3'LTR的U3元件含有其增强子序列、TATA盒、Sp1和NF- $\kappa$ B位点的缺失。由于自失活3'LTR,在进入和逆转录之后生成的原病毒含有失活的5'LTR。这可以通过降低动员载体基因组的风险和LTR对附近细胞启动子的影响来提高安全性。可以通过本领域已知的任何方法来构建自失活3'LTR。在一些实施方案中,这不会影响载体滴度或载体的体外或体内特性。

[0497] 任选地,来自慢病毒5'LTR的U3序列可以在病毒构建体中用启动子序列(如异源启动子序列)替代。这可以增加从包装细胞系回收的病毒的滴度。也可以包括增强子序列。可以使用增加病毒RNA基因组在包装细胞系中的表达的任何增强子/启动子组合。在一个例子中,使用CMV增强子/启动子序列(美国专利号5,385,839和美国专利号5,168,062)。

[0498] 在某些实施方案中,可以通过将逆转录病毒载体基因组(如慢病毒载体基因组)构建为整合缺陷性来使插入诱变的风险降至最低。可以采用多种途径来产生非整合型载体基因组。在一些实施方案中,可以将一种或多种突变工程化至pol基因的整合酶组分中,使得其编码具有无活性整合酶的蛋白质。在一些实施方案中,可以修饰载体基因组本身以通过例如使一个或两个衔接位点突变或缺失来防止整合,或者通过缺失或修饰使3'LTR近端多

嘌呤束 (PPT) 没有功能。在一些实施方案中,可以使用非遗传途径;这些途径包括抑制整合酶的一种或多种功能的药理学药剂。这些方法并不相互排斥;也就是说,可以一次使用多于一种所述方法。例如,整合酶和衔接位点两者可以都没有功能,或者整合酶和PPT位点可以没有功能,或者衔接位点和PPT位点可以没有功能,或者它们全部都可以没有功能。此类方法和病毒载体基因组是已知的并且是可获得的(参见Philpott和Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007;Engelman等人J Virol 69:2729, 1995;Brown等人J Virol 73:9011 (1999);WO 2009/076524;McWilliams等人, J Virol 77:11150, 2003;Powell和Levin J Virol 70:5288, 1996)。

[0499] 在一些实施方案中,载体含有用于在宿主细胞(如原核宿主细胞)中繁殖的序列。在一些实施方案中,病毒载体的核酸含有用于在原核细胞(如细菌细胞)中繁殖的一个或多个复制起点。在一些实施方案中,包括原核复制起点的载体还可以含有这样的基因,其表达赋予可检测或可选择标记物,如抗药性。

[0500] 在一些实施方案中,病毒载体含有编码异源重组蛋白的核酸。在一些实施方案中,所述异源重组分子是或包括重组受体(例如抗原受体)、SB转座子(例如用于基因沉默)、衣壳包封的转座子、同源双链核酸(例如用于基因组重组)或报告基因(例如荧光蛋白,如GFP)或萤光素酶。

[0501] 在一些实施方案中,病毒载体含有编码重组受体和/或嵌合受体(例如异源受体蛋白)的核酸。重组受体(例如异源受体)可以包括抗原受体,例如功能性非TCR抗原受体,包括嵌合抗原受体(CAR)和其他抗原结合受体,例如转基因T细胞受体(TCR)。受体还可以包括其他受体,如其他嵌合受体,如与特定配体结合并且具有与CAR中存在的那些类似的跨膜和/或细胞内信号传导结构域的受体。

[0502] 在任何此类例子中,将核酸插入或定位于病毒载体的区域中,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。

[0503] 在一些实施方案中,所编码的重组抗原受体(例如,CAR)是能够与要靶向的细胞或疾病上的一种或多种配体特异性结合的受体,所述疾病如癌症、感染性疾病、炎性或自身免疫性疾病或其他疾病或病症,包括本文所述用于以所提供的方法和组合物靶向的那些。

[0504] 在某些实施方案中,示例性抗原是或包括 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 整合素(avb6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、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、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 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、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 $\alpha$ (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha\text{2}$ (IL-13Ra2)、激酶插入

结构域受体 (kdr)、 $\kappa$ 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)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒 (CMV)、粘蛋白1 (MUC1)、MUC16、自然杀伤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)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、肾母细胞瘤1 (WT-1)、病原体特异性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, 由所述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细胞标记物中的任一种。在一些实施方案中, 抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig $\kappa$ 、Ig $\lambda$ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0505] 在一些实施方案中, 示例性抗原是孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- $\alpha$ 、IL-13R- $\alpha$ 2、kdr、 $\kappa$ 轻链、Lewis Y、L1细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2和MAGE A3、CE7、肾母细胞瘤1 (WT-1)、细胞周期蛋白 (如细胞周期蛋白A1 (CCNA1)), 和/或生物素化的分子, 和/或由HIV、HCV、HBV、HPV和/或其他病原体表达的分子和/或具有HIV、HCV、HBV、HPV和/或其他病原体的特征的分子或对HIV、HCV、HBV、HPV和/或其他病原体具有特异性的分子, 和/或其致癌形式。

[0506] 在一些实施方案中, 抗原是或包括病原体特有的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。

[0507] 在一些实施方案中, 抗原受体 (包括CAR和重组TCR) 及其产生和引入包括例如以下文献中所述的那些: 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、US 2013287748、US20130149337、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, 和/或以下文献中所述的那些: 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。

#### i. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0508] 在一些实施方案中, 病毒载体基因组中所含的核酸编码嵌合抗原受体 (CAR)。CAR通常是基因工程化受体, 其具有细胞外配体结合结构域, 例如含有抗体或其片段的细胞外部分, 所述细胞外配体结合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, 嵌合抗原受体包括连接细胞外结构域和细胞内信号传导结构域的跨膜结构域和/或

细胞内结构域。此类分子通常模拟或模仿通过天然抗原受体的信号和/或通过这样的受体与共刺激受体的组合的信号。

[0509] 在一些实施方案中,CAR被构建具有对特定标记物的特异性,如在过继疗法所靶向的特定细胞类型中表达的标记物,例如癌症标记物和/或任何所述抗原。因此,CAR通常包含抗体的一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或一个或多个抗体可变结构域和/或抗体分子。在一些实施方案中,CAR包含抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如可变重链(VH)或其抗原结合部分或源自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0510] 在一些实施方案中,提供工程化细胞(如T细胞),其表达对特定抗原(或标记物或配体)具有特异性的CAR,所述特定抗原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,其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。

[0511] 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域,所述细胞内信号传导区域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),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 $\zeta$ )链的 $\zeta$ 链的胞质信号传导结构域或区域或其功能变体或信号传导部分);和/或所述细胞内信号传导区域包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。

[0512] 在一些实施方案中,嵌合受体进一步含有特异性地结合至配体(例如抗原)抗原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,其含有特异性地结合至抗原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,并且抗原是处理过的肽抗原,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。

[0513] 示例性抗原受体(包括CAR)以及将此类抗原受体工程化并引入细胞中的方法包括例如以下文献中所述的那些: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、US 2013287748、US20130149337、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EP2537416;和/或以下文献中所述的那些: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。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,和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。

[0514] 在一些实施方案中,CAR被构建为具有对特定抗原(或标记物或配体)的特异性,所述特定抗原是例如在由过继疗法靶向的特定细胞类型中表达的抗原(例如癌症标记物)和/或旨在诱导衰减应答的抗原(例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含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包含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)。

[0515] 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的方法包括例如以下文献中所述的那些:国际专利申请公开号WO 2000/14257、WO 2013/126726、WO 2012/129514、WO 2014/031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061、WO 2016/0046724、WO 2016/014789、WO 2016/090320、WO 2016/094304、WO 2017/025038和WO 2017/173256;美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748和US20130149337;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、8,479,118和9,765,342;以及欧洲专利申请号EP 2537416;和/或以下文献中所述的那些: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;和Wu等人,Cancer,2012年3月18(2):160-75。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,和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。

[0516] 示例性抗原受体(例如CAR)还包括以下文献中所述的任一种:Marofi等人,Stem Cell Res Ther 12:81(2021);Townsend等人,J Exp Clin Cancer Res 37:163(2018);Ma等人,Int J Biol Sci 15(12):2548-2560(2019);Zhao和Cao,Front Immunol 10:2250(2019);Han等人,J Cancer 12(2):326-334(2021);Specht等人,Cancer Res 79:4增刊,摘要P2-09-13;Byers等人,Journal of Clinical Oncology 37,第15期\_增刊(2019);Panowski等人,Cancer Res 79(13增刊)2326(2019);以及Sauer等人,Blood 134(增刊\_1):1932(2019);或者可以含有以下文献中所述的任何抗体或抗原结合片段:美国专利号8,153,765、8,603,477和8,008,450;美国公开号US20120189622和US20100260748;以及国际PCT公开号WO 2006099875、WO 2009080829、WO 2012092612和WO 2014210064。

[0517] 另外的示例性抗原受体(例如CAR,如抗BCMA CAR)包括以下各项的CAR:艾基维仑赛(idecabtagene vicleucel)、ABECMA<sup>®</sup>、BCMA02、JCARH125、JNJ-68284528(LCAR-B38M;西达基奥仑赛(ciltacabtagene autoleucel);CARVYKTI<sup>™</sup>(Janssen/Legend)、P-BCMA-101(Poseida)、PBCAR269A(Poseida)、P-BCMA-Allol(Poseida)、Allo-715(Pfizer/Allogene)、

CT053 (Carsgen)、Descartes-08 (Cartesian)、PHE885 (Novartis)、ARI-002 (Hospital Clinic Barcelona, IDIBAPS) 和 CTX120 (CRISPR Therapeutics)。在特定实施方案中, CAR是艾基维仑赛细胞的CAR。在特定实施方案中, CAR是 ABECMA®细胞 (ABECMA® 免疫疗法中使用的细胞) 的CAR。在特定实施方案中, CAR是西达基奥仑赛细胞的CAR。在特定实施方案中, CAR是CARVYKTI™细胞 (CARVYKTI™免疫疗法中使用的细胞) 的CAR。

[0518] 示例性抗原受体 (例如CAR) 还包括以下FDA批准的产品的CAR: BREYANZI® (利基迈仑赛 (lisocabtagene maraleucel))、TECARTUS™ (布瑞基奥仑赛 (brexucabtagene autoleucel))、KYMRIAH™ (替沙仑赛 (tisagenlecleucel)) 和 YESCARTA™ (阿基仑赛 (axicabtagene ciloleucel))、ABECMA® (艾基维仑赛) 和 CARVYKTI™ (西达基奥仑赛)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是以下各项的CAR: BREYANZI® (利基迈仑赛)、TECARTUS™ (布瑞基奥仑赛)、KYMRIAH™ (替沙仑赛)、YESCARTA™ (阿基仑赛)、ABECMA® (艾基维仑赛) 或 CARVYKTI™ (西达基奥仑赛)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是 BREYANZI® 的CAR (利基迈仑赛, 参见 Sehgal 等人, 2020, *Journal of Clinical Oncology* 38:15\_增刊, 8040; Teoh 等人, 2019, *Blood* 134 (增刊\_1): 593; 以及 Abramson 等人, 2020, *The Lancet* 396 (10254): 839-852)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是 TECARTUS™ 的CAR (布瑞基奥仑赛, 参见 Mian 和 Hill, 2021, *Expert Opin Biol Ther*; 21 (4): 435-441; 以及 Wang 等人, 2021, *Blood* 138 (增刊1): 744)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是 KYMRIAH™ 的CAR (替沙仑赛, 参见 Bishop 等人, 2022, *N Engl J Med* 386:629:639; Schuster 等人, 2019, *N Engl J Med* 380:45-56; Halford 等人, 2021, *Ann Pharmacother* 55 (4): 466-479; Mueller 等人, 2021, *Blood Adv.* 5 (23): 4980-4991; 以及 Fowler 等人, 2022, *Nature Medicine* 28:325-332)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是 YESCARTA™ 的CAR (阿基仑赛, 参见 Neelapu 等人, 2017, *N Engl J Med* 377 (26): 2531-2544; Jacobson 等人, 2021, *The Lancet* 23 (1): P91-103; 以及 Locke 等人, 2022, *N Engl J Med* 386:640-654)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是 ABECMA® 的CAR (艾基维仑赛, 参见 Raje 等人, 2019, *N Engl J Med* 380:1726-1737; 以及 Munshi 等人, 2021, *N Engl J Med* 384:705-716)。在所提供的任何实施方案中的一些中, CAR是 CARVYKTI™ 的CAR (西达基奥仑赛, 参见 Berdeja 等人, *Lancet*. 2021年7月24日; 398 (10297): 314-324; 以及 Martin, 摘要#549 [Oral], 在 2021 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting & Exposition 上呈现)。

[0519] 在一些实施方案中, 抗原是 BCMA。在一些实施方案中, CAR 包含抗体分子的一个或多个 BCMA 结合部分, 如抗体的重链可变 (VH) 区和/或轻链可变 (VL) 区 (例如 scFv 抗体片段)。嵌合受体 (如 CAR) 通常包括细胞外抗原结合结构域, 如抗体分子的一部分, 通常是抗体的可变重 (VH) 链区和/或可变轻 (VL) 链区, 例如 scFv 抗体片段。在一些实施方案中, 所提供的 BCMA 结合 CAR 含有赋予所提供的 CAR 的 BCMA 结合特性的抗体 (如抗 BCMA 抗体) 或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合结构域可以是所述任何抗 BCMA 抗体或源自所述任何抗 BCMA 抗体。参见例如, Carpenter 等人, *Clin. Cancer Res.*, 2013, 19 (8): 2048-2060; Feng 等人, *Scand. J. Immunol.* (2020) 92: e12910; 美国专利号 9,034,324、美国专利号 9,765,342; 美国专利公开号 US 2016/0046724、US 20170183418; 以及国际 PCT 申请号 WO 2016090320、WO 2016090327、WO 2016094304、WO 2016014565、WO 2016014789、WO 2010104949、WO 2017025038、WO 2017173256、WO 2018085690 或 WO 2021091978。任何此类

抗BCMA抗体或抗原结合片段都可以用于所提供的CAR中。在一些实施方案中,所述抗BCMACAR含有一种或多种单结构域抗BCMA抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种单结构域抗BCMA抗体源自WO 2017025038或WO 2018028647中所述的抗体。在一些实施方案中,所述抗BCMA CAR含有两种单结构域抗BCMA抗体。在一些实施方案中,所述两种单结构域抗BCMA抗体源自WO 2017025038或WO 2018028647中所述的一种或多种抗体。在一些实施方案中,所述BCMA结合结构域包含A37353-G4S-A37917(G4S是这两个结合结构域之间的接头)或由其组成,其描述于WO 2017025038或WO 2018028647中,并且提供于例如WO 2017025038或WO 2018028647的SEQ ID NO:300、301和302(具有或不具有信号肽)中。在一些实施方案中,抗BCMA CAR含有抗原结合结构域,其为含有可变重链(VH)区和/或可变轻链(VL)区的scFv。在一些实施方案中,含有可变重链(VH)区和/或可变轻链(VL)区的scFv源自WO 2016090320或WO 2016090327中所述的抗体。在一些实施方案中,含有可变重链(VH)区和/或可变轻链(VL)区的scFv源自WO 2019/090003中描述的抗体。在一些实施方案中,含有可变重链(VH)区和/或可变轻链(VL)区的scFv源自WO 2016094304或WO 2021091978中描述的抗体。在一些实施方案中,含有可变重链(VH)区和/或可变轻链(VL)区的scFv源自WO 2018133877中所述的抗体。在一些实施方案中,含有可变重链(VH)区和/或可变轻链(VL)区的scFv源自WO 2019149269中所述的抗体。在一些实施方案中,所述抗BCMACAR是如WO 2019173636或WO 2020051374A中所述的任一种。在一些实施方案中,所述抗BCMA CAR是如WO 2018102752中所述的任一种。在一些实施方案中,所述抗BCMACAR是如WO 2020112796或WO 2021173630中所述的任一种。

[0520] 在一些实施方案中,CAR是对BCMA(例如人BCMA)具有特异性的抗BCMACAR。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BCMA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,US 9,765,342、WO2016/090320、WO 2016090327、WO 2010104949A2、WO 2016/0046724、WO 2016/014789、WO 2016/094304、WO 2017/025038、和WO 2017173256。

[0521] 在一些实施方案中,抗BCMACAR含有抗原结合结构域如scFv,所述抗原结合结构域含有源自WO 2016094304或WO 2021091978中所述抗体的重链可变(VH)区和/或轻链可变(VL)区。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域是含有可变重链(VH)区和可变轻链(VL)区的抗体片段。在一些实施方案中,抗BCMACAR含有抗原结合结构域如scFv,所述抗原结合结构域含有源自WO 2016/090320或WO 2016090327中所述抗体的重链可变(VH)区和/或轻链可变(VL)区。

[0522] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段(例如scFv或V<sub>H</sub>结构域)特异性地识别抗原,如CD19。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段源自特异性地结合CD19的抗体或抗原结合片段或者是其变体。在一些实施方案中,所述抗原是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<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>。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。在一些实施方案中,抗原结合结构域包括源自FMC63的V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>,其在一些方面可以是scFv。FMC63通常是指针对人来源的表达CD19的Na1m-1和Na1m-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,抗原结合结构域包括源自SJ25C1的V<sub>H</sub>

和/或 $V_L$ ,其在一些方面可以是scFv.SJ25C1是针对人来源的表达CD19的NaIm-1和NaIm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.等人(1987).Leucocyte typing III.302)。

[0523] 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作为或源自利妥昔单抗的抗体,如利妥昔单抗scFv。

[0524] 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如下抗体,所述抗体是m971或源自m971,如m971scFv。

[0525] 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GPCR5D的抗体或抗体片段是或含有来自国际公开号WO 2016/090329和WO 2016/090312所示的抗体或抗体片段的 $V_H$ 和 $V_L$ 。

[0526] 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。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复合物表现出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-肽复合物具有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个或多个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模仿通过天然抗原受体(如TCR)的信号,并且模拟或模仿任选地通过这种受体与共刺激受体的组合的信号。

[0527] 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。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型白血病和髓性白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0528] 在一些实施方案中,抗原(或配体)是多肽。在一些实施方案中,其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。

[0529] 在一些实施方案中,CAR含有特异性识别在细胞表面上表达的抗原(如完整抗原)的抗体或抗原结合片段(例如,scFv)。

[0530] 在一些实施方案中,抗原(或配体)是肿瘤抗原或癌症标记物。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、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、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 $\alpha$ 、神经节苷脂GD2、

O-乙酰化GD2 (OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100 (gp100)、G蛋白偶联受体5D (GPCR5D)、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 $\alpha$ (IL-22Ra)、IL-13受体 $\alpha$ 2(IL-13Ra2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 $\kappa$ 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)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤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)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、肾母细胞瘤1(WT-1)、病原体特异性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,由所述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细胞标记物中的任一种。在一些实施方案中,抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig $\kappa$ 、Ig $\lambda$ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0531] 在一些实施方案中,抗原是或包括病原体特有的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,如特异性识别作为MHC-肽复合物于细胞表面上呈递的细胞内抗原(如肿瘤相关抗原)的抗体或抗原结合片段(例如,scFv)。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)的部分在细胞上表达。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复合物表现出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。

[0532] 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(包括由细胞机器处理的肽抗原)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,例如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类分子是具有跨膜 $\alpha$ 链(在一些情况下具有三个 $\alpha$ 结构域)和非共价缔合的 $\beta$ 2微球蛋白的异二聚体。通常,MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 $\alpha$ 和 $\beta$ 构成,两者通常都跨越膜。MHC分子可以包括MHC的有效部分,所述有效部分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<sup>+</sup> T细胞,但是在一些情况下是CD4<sup>+</sup> 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,其中肽通常被CD4<sup>+</sup> T细胞识别。通常,MHC分子由一组连锁基因座编码,它们在小鼠中统称为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)。

[0533] 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)特异性识别。

[0534] 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,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,肽通常具有约8至约24个氨基酸的长度。在一些实施方案中,对于MHC II类复合物中的识别,肽的长度为从或从约9至22个氨基酸。在一些实施方案中,对于MHC I类复合物中的识别,肽的长度为从或从约8至13个氨基酸。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,诱导T细胞应答,如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞应答或其他应答。

[0535] 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;US 2004/0191260;US2006/0034850;US2007/00992530;US20090226474;US 20090304679;和国际PCT公开号WO 03/068201)。

[0536] 在一些实施方案中,特异性地结合MHC-肽复合物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,然后向宿主施用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一段足以引发针对所述肽在MHC分子的结合沟中的三维呈递的免疫应答的时间。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递的所需抗体。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、单独的目的肽以及MHC与无关肽的复合物。然后可以分离所需抗体。

[0537] 在一些实施方案中,特异性地结合MHC-肽复合物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,可以产生突变体Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库,例如,其中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;和Cohen CJ.等人(2003) *JMol. Recogn.* 16:324-332。

[0538] 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,包括抗原结合的片段(Fab)片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V<sub>H</sub>)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,如细胞内抗体、肽体、嵌合抗体、完全人抗体、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。该术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类的抗体,包括IgG及其亚类IgM、IgE、IgA和IgD。

[0539] 在一些实施方案中,所述抗原结合蛋白、抗体及其抗原结合片段特异性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')<sub>2</sub>、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,特别地选自例如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 $\kappa$ 。

[0540] 所提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体中结合完整抗体所结合抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>;双抗体;线性抗体;可变重链(V<sub>H</sub>)区、单链抗体分子(如scFv)和单结构域V<sub>H</sub>单一抗体;以及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。

[0541] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链中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<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单一V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>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<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V<sub>L</sub>或V<sub>H</sub>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)。

[0542] 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物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。

[0543] 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域或链的那些),和/或可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,所述抗体片段是scFv。

[0544] “人源化”抗体是如下抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基都源自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基都源自人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”是指非人抗体的变体,其已经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,CDR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0545] 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域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区域包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,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/或包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的信号传导结构域。

[0546] 在一些实施方案中,CAR的细胞外部分(如其抗体部分)进一步包括间隔子,如抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区域。间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或经修饰形式的至少一部分,如铰链区域(例如,IgG4铰链区域)和/或CH1/

CL和/或Fc区域。在一些实施方案中,重组受体进一步包含间隔子和/或铰链区域。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的恒定区或部分。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域。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:1所示的序列,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。

[0547] 在一些实施方案中,恒定区或部分是人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,所述间隔子具有与SEQ ID NO:1、3、4和5中的任何一个展现出至少或至少约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。

[0548] 在一些实施方案中,间隔子可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或经修饰形式的至少一部分,如铰链区域(例如,IgG4铰链区域)和/或C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub>和/或Fc区域。在一些实施方案中,重组受体进一步包含间隔子和/或铰链区域。在一些实施方案中,恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的恒定区或部分。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域。与不存在间隔子的情况下相比,间隔子的长度可以提供抗原结合后增强的细胞应答性。在一些例子中,间隔子具有为或约12个氨基酸的长度或者具有不超过12个氨基酸的长度。示例性间隔子包括具有以下的那些: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。在一些实施方案中,间隔子区域具有约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。示例性间隔子包括仅IgG4铰链、与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链或与CH3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或国际专利申请公开号WO 2014/031687。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:1所示的序列,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。

[0549] 在一些实施方案中,恒定区或部分是人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,间隔子具有与SEQ ID NO:1、3、4和5中的任何一个展现出至少或至少约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。

[0550] 细胞外配体结合结构域(如抗原识别结构域)通常与一个或多个细胞内信号传导组分连接,所述一个或多个细胞内信号传导组分如在CAR的情况下模拟通过抗原受体复合物(如TCR复合物)进行激活和/或通过另一细胞表面受体传导信号的信号传导组分。在一些实施方案中,跨膜结构域连接细胞外配体结合结构域与细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)与一个或多个跨膜信号传导区域和细胞内信号传导区域连接。在一些实施方案中,CAR包含与细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用天然地与受体(例如,CAR)中的结构域之一缔合的跨膜结构域。在一些情况下,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。

[0551] 在一些实施方案中,跨膜结构域源自天然或合成来源。当来源是天然的时,在一些方面,所述结构域可以源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区域包括源自以下的那些(例如,包含以下的至少一个或多个跨膜区域):T细胞受体的 $\alpha$ 、 $\beta$ 或 $\zeta$ 链,CD28,CD3 $\epsilon$ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137或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,通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域来实现所述连接。

[0552] 在一些实施方案中,短的寡肽或多肽接头(例如,长度在2与10个之间的氨基酸的接头,如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体)存在并形成CAR的跨膜结构域与胞质信号传导结构域之间的连接。

[0553] 重组受体(例如,CAR)通常包含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 $\zeta$ 链。因此,在一些方面,抗原结合部分连接至一个或多个细胞信号传导模块。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)进一步包括一种或多种其他分子(如Fc受体 $\gamma$ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,CAR或其他嵌合受体包含CD3-zeta(CD3- $\zeta$ )或Fc受体 $\gamma$ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0554] 在一些实施方案中,在连接CAR或其他嵌合受体后,受体的胞质结构域和/或区域或细胞内信号传导结构域和/或区域激活免疫细胞(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辅助细胞活性,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结构域的截短部分(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,细胞内信号传导区域(例如,包含一种或多种细胞内信号传导结构域)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(其在天然情境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。

[0555] 在天然TCR的情况下,完全激活通常不仅需要经由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,用于生成次级或共刺激信号的组分也被包含在CAR中。在其他实施方案中,CAR不包含用于生成共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在同一细胞中表达,并且提供用于生成次级或共刺激信号的组分。

[0556] T细胞激活在一些方面被描述为由至少如下两类胞质信号传导序列介导: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),以及以非抗原依赖性方式起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包含这样的信号传导组分中的一种或两种。

[0557] 在一些方面,CAR包含调节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(其称为免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM)。含有ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括源自以下的那些:TCR或CD3

$\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD8、CD22、CD79a、CD79b和CD66d。在某些实施方案中,含有ITAM的初级胞质信号传导序列包括源自TCR或CD3 $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 或FcR $\beta$ 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 $\zeta$ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0558] 在一些实施方案中,CAR包含共刺激受体(例如CD28、4-1BB、OX40、CD27、DAP10和ICOS)的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面,同一CAR包含激活或信号传导区域和共刺激组分两者。

[0559] 在一些实施方案中,激活结构域包含在一个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W02014/055668)。在一些方面,CAR是刺激或激活CAR;在其他方面,它是共刺激CAR。在一些实施方案中,细胞进一步包括抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月),例如识别不同抗原的CAR,其中通过识别第一抗原的CAR递送的激活信号通过抑制性CAR与其配体的结合而被减少或抑制,例如,以减少脱靶效应。

[0560] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含与CD3细胞内结构域连接的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包括与CD3细胞内结构域连接的嵌合CD28和CD137共刺激结构域。

[0561] 在一些实施方案中,CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞的细胞内信号传导结构域与CD4<sup>+</sup>辅助T细胞的细胞内信号传导结构域相同。在一些实施方案中,CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞的细胞内信号传导结构域与CD4<sup>+</sup>辅助T细胞的细胞内信号传导结构域不同。

[0562] 在一些实施方案中,CAR包含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- $\zeta$ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0563] 在一些实施方案中,由所提供的病毒载体内的一个或多个核酸编码的一种或多种重组受体(例如CAR)进一步包括一种或多种标记物,例如,用于确认要表达受体的细胞的转导或工程化和/或对表达由多核苷酸编码的一种或多种分子的细胞的选择和/或靶向的目的。在一些方面,这种标记物可以由不同的核酸或多核苷酸编码,所述核酸或多核苷酸也可以在基因工程化过程期间被引入,通常通过相同的方法(例如,通过本文所提供的任何方法转导,例如通过相同的载体或相同类型的载体转导)被引入。

[0564] 在一些方面,标记物(例如,转导标记物)是蛋白质和/或是细胞表面分子。示例性标记物是天然存在的(例如,内源性)标记物(如天然存在的细胞表面分子)的截短的变体。在一些方面,与天然或内源细胞表面分子相比,变体具有降低的免疫原性、降低的运输功能和/或降低的信号传导功能。在一些实施方案中,所述标记物是细胞表面受体的截短形式,例如截短的EGFR(tEGFR)。在一些方面,标记物包括全部或部分(例如,截短形式的)CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)。在一些实施方案中,编码标记物的核酸与编码接头序列(如可切割的接头序列,例如T2A、P2A、E2A和/或F2A)的多核苷酸可操作地连接。参见例如,W0 2014/031687。

[0565] 在一些实施方案中,标记物是并非在T细胞上天然发现或并非在T细胞表面上天然发现的分子(例如细胞表面蛋白)或其部分。

[0566] 在一些实施方案中,分子是非自身分子,例如非自身蛋白质,例如并非被将细胞过继转移至其中的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。

[0567] 在一些实施方案中,标记物不提供治疗功能和/或不产生除了用作基因工程化标记物(例如,用于选择成功工程化的细胞)以外的作用。在其他实施方案中,标记物可以是治疗性分子或原本发挥一定所需作用的分子,如在体内所遇到的细胞的配体,如共刺激或免疫检查点分子,以增强和/或减弱细胞在过继转移和遇到配体后的反应。

[0568] 在一些情况下,CAR被称为第一代、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,例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在一些方面包含不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0569] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括细胞外配体结合部分(如抗原结合部分,如抗体或其片段)和细胞内结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv或单结构域VH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 $\zeta$ )链的 $\zeta$ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接和/或设置在细胞外结构域与细胞内信号传导区域或结构域之间的跨膜结构域。

[0570] 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结构域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结构域通过间隔子(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。

[0571] 在一些实施方案中,所述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)以及细胞内信号传导结构域(含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3 $\zeta$ 的信号传导部分或其功能变体)。在一些实施方案中,所述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)以及细胞内信号传导结构域(含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 $\zeta$ 的信号传导部分或其功能变体)。在一些此类实施方案中,所述受体进一步包括含有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。

[0572] 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出与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具有与SEQ ID NO:9的至少或至少约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。

[0573] 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。

[0574] 在一些实施方案中,细胞内结构域包含人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LL被GG取代的这种结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导区域和/或结构域可以包含SEQ ID NO:10或11中所示的氨基酸序列,或者展现出与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,细胞内区域和/或结构域包含4-1BB的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体,如人4-1BB(登录号Q07011.1)的42氨基酸胞质结构域或其功能变体或部分,如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12展现出至少或至少约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。

[0575] 在一些实施方案中,细胞内信号传导区域和/或结构域包含人CD3链、任选地CD3 $\zeta$ 刺激信号传导结构域或其功能变体,如人CD3 $\zeta$ (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 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,所述细胞内信号传导区域包含SEQ ID NO:13、14或15所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13、14或15展现出至少或至少约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。

[0576] 在一些方面,间隔子仅含有IgG的铰链区域,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:1所示的仅铰链的间隔子。在其他实施方案中,间隔子是与CH2和/或CH3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<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:3所示。在一些实施方案中,间隔子是仅与C<sub>H</sub>3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。

[0577] 例如,在一些实施方案中,CAR包含:细胞外配体结合部分(如抗原结合部分,如抗体或其片段,包括sdAb和scFv),其特异性结合抗原,例如本文所述的抗原;间隔子,如任何含有Ig铰链的间隔子;跨膜结构域,其是CD28的一部分或其变体;细胞内信号传导结构域,其含有CD28的信号传导部分或其功能变体;以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的信号传导部分或其功能变体。在一些实施方案中,CAR包含:细胞外配体结合部分(如抗原结合部分,如抗体或其片段,包括sdAb和scFv),其特异性结合抗原,例如本文所述的抗原;间隔子,如任何含有Ig铰链的间隔子;跨膜结构域,其是CD28的一部分或其变体;细胞内信号传导结构域,其含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体;以及CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的信号传导部分或其功能变体。在一些实施方案中,此类CAR构建体进一步包含例如CAR下游的T2A核糖体跳跃元件和/或tEGFR序列。

#### ii. T细胞受体 (TCR)

[0578] 在一些实施方案中,由一种或多种核酸编码的一种或多种重组分子是或包括重组T细胞受体 (TCR)。在一些实施方案中,重组TCR对抗原具有特异性,所述抗原通常是存在于靶细胞上的抗原,例如肿瘤特异性抗原,在与自身免疫或炎性疾病相关的特定细胞类型上表达的抗原,或源自病毒病原体或细菌病原体的抗原。在一些实施方案中,提供了工程化细胞,例如T细胞,其表达识别靶多肽(例如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原)的肽表位或T细胞表位的TCR或其抗原结合部分。

[0579] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是如下分子,所述分子含有可变 $\alpha$ 和 $\beta$ 链

(也分别称为TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ )或可变 $\gamma$ 和 $\delta$ 链(也分别称为TCR $\gamma$ 和TCR $\delta$ )或其抗原结合部分,并且能够特异性结合与MHC分子结合的肽。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一般在结构上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,发现TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,在此处它通常负责识别与主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的抗原。

[0580] 除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或其抗原结合片段。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是如下抗原结合部分,所述抗原结合部分小于全长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 $\alpha$ 链和可变 $\beta$ 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的可变链含有参与肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区。

[0581] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有高变环或互补决定区(CDR),它们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分子之间展示更低可变性(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可变区上的三个CDR中对于抗原识别和/或对于与肽-MHC复合物的处理肽部分相互作用而言最为重要。在一些情况下, $\alpha$ 链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情况下, $\beta$ 链的CDR1可以与所述肽的C末端部分相互作用。在一些情况下,CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或其识别贡献最大或者是主要负责的CDR。在一些实施方案中, $\beta$ 链的可变区可以含有另外的高变区(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)。

[0582] 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4:33页, 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、跨膜区域和位于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。

[0583] 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, $\alpha$ 链或 $\beta$ 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, $C\alpha$ 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 $\beta$ 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,其中可变结构域各自含有CDR。

TCR的恒定结构域可含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,由此连接TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可在每条 $\alpha$ 和 $\beta$ 链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。

[0584] 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,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域的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 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 和CD3 $\zeta$ 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免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM。

[0585] 在一些实施方案中,TCR可以是两条链 $\alpha$ 和 $\beta$ (或者任选地 $\gamma$ 和 $\delta$ )的异二聚体,或者其可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中,TCR是含有连接的两条单独链( $\alpha$ 和 $\beta$ 链或 $\gamma$ 和 $\delta$ 链)的异二聚体,所述链如通过一个或多个二硫键连接。

[0586] 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 $\alpha$ 、 $\beta$ 链的序列)生成,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易于获得的。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。

[0587] 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TCR序列的知识以合成方式生成。

[0588] 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生成的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的V $\alpha$ 和V $\beta$ 库来生成,所述T细胞是从受试者分离,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性淋巴细胞(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(例如,正常TCR文库)扩增。在一些实施方案中,TCR可以从患病受试者的T细胞来源(例如,患病TCR文库)扩增。在一些实施方案中,使用简并引物扩增V $\alpha$ 和V $\beta$ 的基因库,如通过在从人获得的样品(如T细胞)中进行RT-PCR。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然V $\alpha$ 和V $\beta$ 文库组装,其中扩增的产物被克隆或组装以通过接头隔开。取决于受试者和细胞的来源,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生成。在一些方面,使TCR经受例如 $\alpha$ 或 $\beta$ 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所选TCR。在一些实施方案中,可以选择抗原特异性T细胞,如通过筛选以评估针对肽的CTL活性。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,如通过对抗原的结合活性(例如,特定亲和力或亲合力)来选择。

[0589] 在一些实施方案中,基因工程化抗原受体包括重组T细胞受体(TCR)和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方案中,TCR是已经从天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方案中,从患者鉴定并分离靶抗原(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 and 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。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已经修饰或工程化的。在一些实施方案中,使用定向进化方法来生成具有改变的特性如具有较高的对特定MHC-肽复合物的亲和力的TCR。在一些实施方案中,通过展示方法实现定向进化,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。

[0590] 在一些实施方案中,用于在产生或生成目的TCR中使用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,适用于生成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)和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。

[0591] 使用计算机预测模型的蛋白酶体和免疫蛋白酶体的HLA-A0201结合基序和切割位点是已知的。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.BIOINFORMATICS17(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卷(1):75-93 2007)

[0592] 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质或其突变形式,其中一种或多种特性(如结合特征)已经被改变。在一些实施方案中,TCR可以源自各种动物物种之一,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,出于所提供的的方法的目的,TCR呈在细胞的表面上表达的细胞结合形式。

[0593] 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。

[0594] 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能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与在T细胞的表面上产生活性TCR的信号传导结构域连接。在一些实施方案中,TCR在细胞的表面上表达。

[0595] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR $\alpha$ 链可变区序列的序列与对应于TCR $\alpha$ 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 $\beta$ 链可变区序列的序列与对应于TCR $\beta$ 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,键可以对应于天然二聚 $\alpha\beta$ 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。

[0596] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR $\alpha$ 链(含有可变 $\alpha$ 结构域、恒定 $\alpha$ 结构域和附接至恒定 $\alpha$ 结构域C末端的第一二聚化基序)和TCR $\beta$ 链(包含可变 $\beta$ 结构域、恒定 $\beta$ 结构域和附接至恒定 $\beta$ 结构域C末端的第一二聚化基序),其中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 $\alpha$ 链与TCR $\beta$ 链连接在一起。

[0597] 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) 90 3830 (1993); 国际公开PCT号WO 96/13593、WO 96/18105、WO99/60120、WO99/18129、WO 03/020763、WO2011/044186; 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WO 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WO 99/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有经由肽接头与TCR $\beta$ 可变结构域共价连接的TCR $\alpha$ 可变结构域(参见例如,国际公开PCT号WO 99/18129)。

[0598] 在一些实施方案中,scTCR含有由对应于TCR $\alpha$ 链可变区的氨基酸序列构成的第一区段、由对应于TCR $\beta$ 链可变区序列的氨基酸序列构成的第二区段(融合至对应于TCR $\beta$ 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端)和将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端的接头序列。

[0599] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 $\alpha$ 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 $\alpha$ 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 $\beta$ 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 $\beta$ 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将所述第一区段的C末端连接至所述第二区段的N末端)。

[0600] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 $\beta$ 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCR $\beta$ 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 $\alpha$ 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 $\alpha$ 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将所述第一区段的C末端连接至所述第二区段的N末端)。

[0601] 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形成单多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。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表示氨基酸序列,其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,第一区段和第二区段配对,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所述第一区段的C末端与所述第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长以阻断或减少所述scTCR与所述靶配体的结合。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,接头具有式-PGGG-(SGGGG)<sub>5</sub>-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,接头具有序列GSADDAKKDAKKDGKS(SEQ ID NO:23)。

[0602] 在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,所述共价二硫键将 $\alpha$ 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至 $\beta$ 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。

[0603] 在含有引入的链间二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,用形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸取代另一残基,如取代丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,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引入的二硫键。TCR的示例性非天然二硫键描述于公开的国际PCT号WO 2006/000830中。

[0604] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段展现出对靶抗原的亲合力,其平衡结合常数在或在约 $10^{-5}M$ 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。

[0605] 在一些实施方案中,编码TCR(如 $\alpha$ 和 $\beta$ 链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的方式扩增,并且克隆至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。

[0606] 在一些实施方案中,载体可以是如下系列的载体: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 $\lambda$ G10、 $\lambda$ GT11、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、 $\lambda$ EMBL4和 $\lambda$ 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。

[0607] 在一些实施方案中,所述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,其对引入载体的宿主(例如,细菌、真菌、植物或动物)的类型具特异性,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启动子以及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。

[0608] 在一些实施方案中,在获得T细胞克隆之后,将TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链分离并克隆至基因表达载体中。在一些实施方案中,TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 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,编码TCR的核酸进一步包括标记物以确认细胞经转导或工程化而表达受体。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。

[0609] 在一些实施方案中,为了生成编码TCR的载体,将 $\alpha$ 和 $\beta$ 链从自表达目的TCR的T细胞克隆分离的总cDNA进行PCR扩增,并克隆至表达载体中。在一些实施方案中,将 $\alpha$ 和 $\beta$ 链克隆至同一载体中。在一些实施方案中,将 $\alpha$ 和 $\beta$ 链克隆至不同的载体中。在一些实施方案中,将所产生的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链掺入逆转录病毒(例如慢病毒)载体中。

### iii. 其他调节元件

[0610] 在本文提供的方法和组合物的一些实施方案中,病毒载体基因组中所含的编码重组受体(例如抗原受体,例如CAR)的核酸序列与其他遗传元件(例如转录调节序列,包括启动子或增强子)以功能关系可操作地连接,以特定方式调节目标序列的表达。在某些情况下,此类转录调节序列是在活性方面在时间上和/或空间上受调节的那些。可用于调节组分表达的表达控制元件是已知的,并且包括但不限于诱导型启动子、组成型启动子、分泌信号、增强子和其他调节元件。在一些实施方案中,病毒载体基因组中所含的核酸序列含有多个表达控制元件,其控制所编码的不同组分,例如不同的受体组分和/或信号传导组分,使得重组受体和/或工程化细胞(例如表达工程化受体的细胞)的表达、功能和/或活性可以被调节,例如是可诱导的、可抑制的、可调节的和/或用户控制的。在一些实施方案中,一种或多种载体可含有一种或多种核酸序列,所述核酸序列含有一种或多种表达控制元件和/或一种或多种所编码组分,使得核酸序列一起可调节所编码组分(例如重组受体)或工程化细胞的表达、活性和/或功能。

[0611] 在一些实施方案中,编码重组受体(如抗原受体,例如CAR)的核酸序列与内部启动子/增强子调节序列可操作地连接。所用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或在适当条件下可用于引导所引入DNA区段的高水平表达。启动子可以是异源的或内源的。在一些实施方案中,合成地产生启动子和/或增强子。在一些实施方案中,使用重组克隆和/或核酸扩增技术产生启动子和/或增强子。

[0612] 在一些情况下,编码所述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,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 $\alpha$ 链的示范性信号肽。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范性例子包括例如SEQ ID NO:25中所示

并且由SEQ ID NO:24中所示核苷酸序列编码的GMCSFR $\alpha$ 链信号肽,或SEQ ID NO:26中所示的CD8 $\alpha$ 信号肽。

[0613] 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,所述启动子可操作地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所述重组受体的表达。

[0614] 在核酸分子编码两种或更多种不同多肽链(例如,重组受体和标记物)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至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物的核酸与相同的启动子可操作地连接,并且任选地由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)的核酸隔开。在一些实施方案中,编码标记物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,编码标记物的核酸和编码所述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,如通过逆转录病毒转导、转染或转化将编码所述重组受体的多核苷酸引入含有所培养细胞的组合物中。

[0615] 在一些实施方案中,如多核苷酸含有第一和第二核酸序列的那些实施方案中,编码不同多肽链中的每一种的编码序列可以与相同或不同的启动子可操作地连接。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(例如编码标记物和编码重组受体)。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(例如编码标记物和编码重组受体),所述基因由编码自切割肽(例如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶)的序列彼此隔开。所述ORF由此编码单一多肽,所述多肽在翻译期间(在2A的情况下)或在翻译后被处理为单独蛋白质。在一些情况下,肽(如T2A)可以引起核糖体跳过2A元件C末端处肽键的合成(核糖体跳跃),导致2A序列的末端与下游的下一个肽之间隔开(参见例如,de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13(2004)和de Felipe等人 *Traffic* 5:616-626(2004))。各种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)、马鼻炎A病毒(E2A,例如SEQ ID NO:20)、明脉扁刺蛾 $\beta$ 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。

[0616] 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物的核酸序列,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,编码标记物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,编码所述重组受体的核酸存在于编码标记物的核酸的下游。

[0617] 在一些实施方案中,所述载体骨架含有编码一种或多种标记物的核酸序列。在一

些实施方案中,所述一种或多种标记物是转导标记物、替代标记物和/或选择标记物。

[0618] 在一些实施方案中,标记物是转导标记物或替代标记物。转导标记物或替代标记物可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,转导标记物可以指示或确认对细胞的修饰。在一些实施方案中,替代标记物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,这种替代标记物是已经修饰以具有极少或无活性的表面蛋白。在某些实施方案中,替代标记物由编码重组受体的相同多核苷酸编码。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸序列与编码标记物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)或编码自切割肽或引起核糖体跳跃的肽(例如2A序列,例如T2A、P2A、E2A或F2A)的核酸分开。在一些情况下,外在标记物基因可以结合工程化细胞用于允许检测或选择细胞,并且在一些情况下还可以用于促进细胞自杀。

[0619] 示例性替代标记物可以包括截短的细胞表面多肽,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,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)或其经修饰形式。EGFRt可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,标记物(例如替代标记物)包括全部或部分(例如截短形式的)CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如tEGFR)。在一些实施方案中,编码标记物的核酸与编码接头序列(如可切割的接头序列,例如T2A)的多核苷酸可操作地连接。例如,标记物和任选地接头序列可以是如PCT公开号WO 2014031687。例如,标记物可以是截短EGFR(tEGFR),其任选地连接接头序列,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。

[0620] 在一些实施方案中,标记物是或包含荧光蛋白,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,标记物是或包含酶(如萤光素酶)、来自大肠杆菌的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌的胚胎碱性磷酸酶(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)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(GUS)或其变体。

[0621] 在一些实施方案中,标记物是选择标记物。在一些实施方案中,选择标记物是或包含赋予对外源药剂或药物的耐药性的多肽。在一些实施方案中,选择标记物是抗生素耐药基因。在一些实施方案中,选择标记物是向哺乳动物细胞赋予抗生素耐药性的抗生素耐药基因。在一些实施方案中,选择标记物是或包括嘌呤霉素抗性基因、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修饰形式。

[0622] 另外的核酸(例如,用于引入的基因)包括:用于改进治疗功效的那些,如通过促进

所转移细胞的活力和/或功能;用于提供用于选择和/或评价细胞(如用于评估体内存活或定位)的遗传标记物的基因;用于改进安全性的基因,例如通过使细胞在体内对阴性选择易感,如以下中所述: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的公开案,其描述了使用通过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。

[0623] 在一些实施方案中,启动子和/或增强子可以是与核酸序列天然缔合的启动子和/或增强子,如可以通过分离位于编码区段和/或外显子上游的5'非编码序列获得的。可替代地,在一些实施方案中,可以将编码核酸区段定位在重组和/或异源启动子和/或增强子的控制下,所述重组和/或异源启动子和/或增强子在自然环境中通常不与编码核酸序列缔合。例如,用于重组DNA构建的示例性启动子包括但不限于 $\beta$ -内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖、色氨酸(trp)、RNA聚合酶(pol) III启动子(包括人和鼠U6 pol III启动子以及人和鼠H1 RNAPol III启动子)、RNA聚合酶(pol) II启动子、巨细胞病毒立即早期启动子(pCMV)、延伸因子-1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )和劳斯肉瘤病毒长末端重复启动子(pRSV)启动子系统。在一些实施方案中,启动子可以例如从病毒基因组获得,所述病毒例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40)。启动子还可以是例如异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、热休克启动子或通常与天然序列缔合的启动子,只要此类启动子与靶细胞相容。在一个实施方案中,启动子是病毒表达系统中的天然存在的病毒启动子。

[0624] 在一些实施方案中,启动子可以具有组成性活性。可以使用的组成型启动子的非限制性例子包括用于以下各项的启动子:泛素(美国专利号5,510,474;WO 98/32869)、CMV(Thomsen等人,PNAS 81:659,1984;美国专利号5,168,062)、 $\beta$ 肌动蛋白(Gunning等人1989Proc.Natl.Acad.Sci.USA84:4831-4835)和pgk(参见例如,Adra等人1987Gene 60:65-74;Singer-Sam等人1984Gene32:409-417;和Dobson等人1982Nucleic Acids Res.10:2635-2637)。

[0625] 在一些实施方案中,启动子可以是组织特异性启动子和/或靶细胞特异性启动子。在一些实施方案中,可以选择启动子以允许可诱导地表达目的序列。已知许多用于可诱导表达的系统,包括四环素应答系统、lac操纵子-阻遏物系统、以及对多种环境或生理变化有响应的启动子,包括热休克、金属离子(如金属硫蛋白启动子)、干扰素、低氧、类固醇(如孕酮或糖皮质激素受体启动子)、辐照(如VEGF启动子)。在一些实施方案中,基于大肠杆菌的tet抑制(tetr)对tet操纵子序列(TECO)的抑制作用的四环素-(tet)-可调节系统可以被修饰用于哺乳动物系统并用作表达盒的可调节元件。这些系统是熟知的。(参见Goshen和Badgered,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:5547-51(1992),Shockett等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:6522-26(1996),Lindemann等人,Mol.Med.3:466-76(1997))。

[0626] 启动子的组合也可以用于获得目的基因的所需表达。普通技术人员将能够基于基因在目的生物或靶细胞中的所需表达模式来选择启动子。

[0627] 在一些实施方案中,增强子也可以存在于病毒构建物中以增加目的基因的表达。

增强子通常是顺式作用核酸元件,长度通常为约10至300by,其作用于启动子以增加其转录。病毒基因组中的许多增强子(如HIV或CMV)是已知的。例如,可以使用CMV增强子(Boshart等人Cell, 41:521, 1985)。其他例子包括例如复制起点晚期侧(bp 100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。在一些情况下,增强子来自哺乳动物基因,如来自球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白或胰岛素的增强子。增强子可以与异源启动子组合使用。可以将增强子剪接至载体中,在编码目标基因的多核苷酸序列的5'或3'位置,但通常位于启动子的5'位点。本领域普通技术人员将能够基于所需表达模式来选择适当的增强子。

[0628] 病毒载体基因组还可以含有另外的遗传元件。可以被包括在构建体中的元件的类型不以任何方式受到限制,并且可以由本领域技术人员选择。

[0629] 例如,可以包括促进病毒基因组核进入靶细胞的信号。这种信号的例子是HIV-1拍动信号(flap signal)(在一些情况下称为拍动序列)。另外,载体基因组可含有一种或多种设计用于增强目标基因表达的遗传元件。在一些实施方案中,基因组含有转录后调节元件(PRE)或其展现出转录后活性的经修饰形式。例如,在一些实施方案中,可以将土拨鼠肝炎病毒转录后响应元件(WPRE)置入构建体中(Zufferey等人1999.J.Virol.74:3668-3681; Deglon等人2000.Hum.Gene Ther.11:179-190)。在一些实施方案中,载体基因组缺乏拍动序列和/或缺乏WPRE。在一些实施方案中,载体基因组含有突变或缺陷的拍动序列和/或WPRE。

[0630] 在一些情形中,可以包括超过一个的编码单独的异源蛋白的开放阅读框。例如,在一些实施方案中,如果报告基因和/或可检测和/或可选择基因被包括在表达构建体中,则可以包括内部核糖体进入位点(IRES)序列。通常,另外的遗传元件与独立的启动子/增强子可操作地连接并受其控制。另外的遗传元件可以是报道基因、可选择标记物或其他所需基因。

[0631] 在一些实施方案中,其他各种调节元件可以包括转录起始区和/或终止区。表达载体还可以含有用于终止转录和用于稳定mRNA的序列。此类序列是已知的并且通常天然存在于真核或病毒DNA或cDNA的5'和偶尔3'非翻译区中。转录终止区的例子包括但不限于聚腺苷酸化信号序列。多腺苷酸化信号序列的例子包括但不限于牛生长激素(BGH)聚(A)、SV40晚期聚(A)、兔 $\beta$ -球蛋白(RBG)聚(A)、胸苷激酶(TK)聚(A)序列及其任何变体。

[0632] 在一些实施方案中,调节元件可以包括允许重组受体(例如,CAR)的可调节表达和/或活性的调节元件和/或系统。在一些实施方案中,可调节的表达和/或活性是通过将重组受体配置成含有特定调节元件和/或系统或受所述调节元件和/或系统控制来实现。在一些实施方案中,一种或多种另外的受体可以用于表达调节系统中。在一些实施方案中,表达调节系统可以包括需要暴露于特定配体或结合特定配体的系统,所述配体可以调节重组受体的表达和/或活性。在一些实施方案中,重组受体(例如CAR)的受调节表达是通过可调节的转录因子释放系统(例如,经修饰的Notch信号传导系统)来实现(参见,例如,Roybal等人,Cell(2016)164:770-779;Morsut等人,Cell(2016)164:780-791)。在一些实施方案中,对重组受体活性的调节是通过施用另外的药剂来实现,所述另外的药剂可以诱导多肽(例如重组受体)的构象变化和/或多聚化。在一些实施方案中,另外的药剂是化学诱导剂(参见例如,美国专利公开号2016/0046700,Clackson等人(1998)Proc Natl Acad Sci U S A.95

(18):10437-42;Spencer等人(1993)Science 262(5136):1019-24;Farrar等人(1996)Nature 383(6596):178-81;Miyamoto等人(2012)Nature Chemical Biology 8(5):465-70;Erhart等人(2013)Chemistry and Biology 20(4):549-57)。

#### B. 病毒载体颗粒的制备

[0633] 所述病毒载体基因组通常以质粒形式构建,其可以转染至包装细胞系或生产细胞系中。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递送系统: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,例如,要转移的遗传物质。可以在设计这些组分之一或两者时引入生物安全保护措施。

[0634] 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(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(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。

[0635] 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,除了所述一种或多种目的序列(例如重组核酸)以外,病毒载体基因组可以包含一个或多个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,并且在包装细胞系中单独提供。

[0636] 在一些实施方案中,用含有产生颗粒所必需的组分的一种或多种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,例如编码抗原受体(如CAR)的核酸)的质粒;以及编码病毒酶和/或结构组分(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。

[0637] 在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(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(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,如辛德比斯病毒包膜、GALV或VSV-G。

[0638] 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。

[0639] 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。

[0640] 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-葡聚糖和脂质体转染方法、电穿孔和显微注射。

[0641] 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,包装序列可以允许将重组质粒的RNA转录物包装至病毒颗粒中,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,随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。

[0642] 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。

[0643] 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至宿主基因组中。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,如CAR)的表达。

#### V. 组合物、配制品和施用方法

[0644] 还提供了含有表达工程化受体(例如,工程化抗原受体)(如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR))的转导的细胞群的组合物以及含有工程化细胞的组合物,包括药物组合物和配制品。还提供所述组合物的使用方法和用途,如用于其中表达抗原的疾病、病症和障碍的治疗中,或者用于检测、诊断和预后方法中。

[0645] 还提供了含有已针对活细胞富集的细胞群的组合物,所述细胞群可以是已针对活细胞富集的转导的细胞群。本文还提供了含有已经去珠的细胞群的组合物,所述细胞群可以是已经去珠的转导的细胞群。在一些实施方案中,转导的细胞群表达工程化受体(例如,工程化抗原受体),如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,组合物包括药物组合物和配制品。还提供所述组合物的使用方法和用途,如用于其中表达抗原的疾病、病症和障碍的治疗中,或者用于检测、诊断和预后方法中。

#### A. 组合物和配制品

[0646] 在一些实施方案中,将包含用重组抗原受体(例如,CAR或TCR)工程化的细胞的一定剂量的细胞作为组合物或配制品,如药物组合物或配制品提供。此类组合物可以根据所提供的方法来使用和/或与所提供的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,或者用于检测、诊断和预后方法中。

[0647] 术语“药物配制品”是指这样的制剂,其处于使得其中所含活性成分的生物活性有

效的形式,并且不含对施用配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0648] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了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剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0649] 在一些方面,载体的选择部分地由特定细胞或药剂和/或通过施用方法确定。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。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。该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,0sol,A,编辑(1980)。药学上可接受的载体在所用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、海藻糖或山梨糖醇;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)。

[0650] 在一些方面,在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、磷酸钾以及各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。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。用于制备可施用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。

[0651] 配制品或组合物还可含有多于一种活性成分,其可用于用细胞或药剂预防或治疗的特定适应证、疾病或病症,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以组合形式适当地存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物进一步包含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,药剂或细胞以盐(例如药学上可接受的盐)的形式施用。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸,硝酸和硫酸)和有机酸(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)的那些盐。

[0652] 在一些实施方案中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)的药剂或细胞。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功效或预防功效。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,重复进行治疗直至发生所希望的对疾病症状的抑制。然而,其他给药方案可能有用并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注施用组合物、通过多次推注施用组合物或通过连续输注施用组合物来递送。

[0653] 药剂或细胞可以通过任何合适的方式施用,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、眼球筋膜囊下注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜递送。在一些实施方案中,将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中,给定剂量通过细胞或药剂的单次推注施用来施用。在一些实施方案中,其是通过例如在不超过3天的时间段内对细胞或药剂的多次推注施用或通过细胞或药剂的连续输注施用来施用。

[0654] 对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可以取决于待治疗的疾病类型、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、施用药剂或细胞是用于预防目的还是治疗目的、先前疗法、受试者的临床病史和对药剂或细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,组合物适合一次或在一系列治疗中施用于受试者。

[0655] 可以使用标准施用技术、配制品和/或设备施用细胞或药剂。提供了用于储存和施用组合物的配制品和装置,如注射器和小瓶。关于细胞,施用可以是自体的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以从一名受试者获得,并且将其施用于同一受试者或不同的相容受试者。外周血来源的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外来源的)可以通过局部注射施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用治疗性组合物(例如,含有基因修饰的免疫应答细胞或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)。

[0656] 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、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方案中,肠胃外施用药剂或细胞群。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送向受试者施用药剂或细胞群。

[0657] 在一些实施方案中,组合物作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、混悬剂、乳剂、分散体或粘性组合物,其在一些方面可以缓冲至所选pH。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更易于制备。另外,液体组合物在某种程度上更便于施用,尤其是通过注射。另一方面,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制,以提供与特定组织的更长接触时间。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,其含有例如水、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。

[0658] 无菌可注射溶液可以通过以下方式来制备:将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。

[0659] 用于体内施用的配制品通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌性。

## B. 剂量和施用

[0660] 细胞或组合物是以一定剂量施用,以在体内产生治疗有效量的表达重组受体(例如,CAR)的细胞,用于治疗疾病或病症。对于疾病的预防或治疗,适当的剂量可能取决于待治疗的疾病类型、细胞或重组受体的类型、组合中其他药物或药剂的施用(如加强、扩大或增强细胞扩增的那些)、疾病的严重程度和病程、施用细胞用于预防性目的还是或治疗性目的、先前的治疗、受试者的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中,所述组合物和细胞适合一次或在一系列治疗中施用受试者。

[0661] 在施用的情况下,药剂(例如药物配制品、细胞或组合物)的“有效量”是指在必要

的剂量/量下和必要的时间段内有效实现所需结果(例如治疗或预防结果)的量。

[0662] 药剂(例如药物配制品或细胞)的“治疗有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需治疗结果(如针对治疗疾病、病症或障碍)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。治疗有效量可以根据多种因素而变,所述因素例如受试者的疾病状态、年龄、性别和体重,以及所施用的细胞群,和组合(例如同时)施用的其他药物或药剂。

[0663] “预防有效量”是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下能有效实现所需预防结果的量。通常但不是必须的,因为预防剂量是在疾病之前或早期在受试者体内使用的,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0664] 在一些实施方案中,细胞或组合物是以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来施用。因此,在一些实施方案中,施用方法包括以有效量施用细胞和组合物。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功效或预防功效。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,重复进行治疗直至发生所希望的对疾病症状的抑制。然而,其他给药方案可能有用并且可以被确定。

[0665] 在一些实施方案中,将治疗有效量的细胞施用于受试者。在一些实施方案中,例如在其中在用于细胞的体内扩增的条件下施用细胞的某些情况下,将次最佳剂量的细胞施用于受试者。

[0666] 在某些实施方案中,细胞或单独细胞亚型群体是以约10万至约1000亿个细胞和/或每公斤受试者体重所述细胞量的范围施用于受试者,例如,10万至约500亿个细胞(例如,少于50万个细胞、少于1百万个细胞、约10万个细胞、约20万个细胞、约30万个细胞、约40万个细胞、约50万个细胞、约1百万个细胞、约5百万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或由任两个前述值定义的范围)、100万至约500亿个细胞(例如,约5百万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞,或由任两个前述值定义的范围),例如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞,或由任两个前述值定义的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、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,这些值是指表达重组受体的细胞的数量;在其他实施方案中,它们是指施用的T细胞或PBMC或总细胞的数量。

[0667] 在一些实施方案中,细胞疗法包括施用包含许多细胞的剂量,所述剂量为至少或至少约或者为或为约 $0.1 \times 10^6$ 个细胞/kg受试者体重、 $0.2 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $0.3 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $0.4 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $1 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $2.0 \times 10^6$ 个细胞/kg、 $3 \times 10^6$ 个细胞/kg或 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg。

[0668] 在一些实施方案中,细胞疗法包括施用包含许多细胞的剂量,所述剂量在或在约 $0.1 \times 10^6$ 个细胞/kg受试者体重与 $1.0 \times 10^7$ 个细胞/kg之间、在或在约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/kg与 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/kg与 $3 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $0.5 \times$

$10^6$ 个细胞/kg与 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/kg与 $1 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/kg受试者体重与 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/kg与 $3 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $1.0 \times 10^6$ 个细胞/kg与 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $2.0 \times 10^6$ 个细胞/kg受试者体重与 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg之间、在或在约 $2.0 \times 10^6$ 个细胞/kg与 $3 \times 10^6$ 个细胞/kg之间或者在或在约 $3.0 \times 10^6$ 个细胞/kg受试者体重与 $5 \times 10^6$ 个细胞/kg之间,每个都包含端值。

[0669] 在一些实施方案中,细胞的剂量包含在为或约 $2 \times 10^5$ 个细胞/kg与为或约 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg之间,如在为或约 $4 \times 10^5$ 个细胞/kg与为或约 $1 \times 10^6$ 个细胞/kg之间或在为或约 $6 \times 10^5$ 个细胞/kg与为或约 $8 \times 10^5$ 个细胞/kg之间。在一些实施方案中,细胞的剂量包含不超过 $2 \times 10^5$ 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 $3 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $4 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $5 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $6 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $7 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $8 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $9 \times 10^5$ 个细胞/kg、不超过或不超过约 $1 \times 10^6$ 个细胞/kg或者不超过或不超过约 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg。

[0670] 在一些实施方案中,细胞剂量包含至少或至少约或为或约 $2 \times 10^5$ 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约 $3 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $4 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $5 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $6 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $7 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $8 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $9 \times 10^5$ 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 $1 \times 10^6$ 个细胞/kg或者至少或至少约或为或约 $2 \times 10^6$ 个细胞/kg。

[0671] 在一些实施方案中,细胞的剂量是细胞的平剂量或细胞的固定剂量,使得细胞剂量不依赖于或基于受试者的体表面积或体重。

[0672] 在某些实施方案中,细胞或单独的细胞亚型群体以约100万至约1000亿个细胞和/或按每公斤体重所述细胞量的范围施用于受试者,例如,100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由任两个前述值定义的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞)或在这些范围和/或每公斤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。

[0673] 例如,在一些实施方案中,如果受试者是人,那么剂量包括少于约 $5 \times 10^8$ 个总重组受体(例如,CAR)表达细胞、T细胞或外周血单个核细胞(PBMC),例如在约 $1 \times 10^6$ 至 $5 \times 10^8$ 个此类细胞的范围内,如 $2 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个总此类细胞,或任两个前述值之间的范围内。

[0674] 在一些实施方案中,细胞疗法包括施用一定剂量,所述剂量包含以下细胞数量:从或从约 $1 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^8$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单个核细胞(PBMC),从

或从约 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单个核细胞(PBMC),或从或从约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单个核细胞(PBMC),每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞疗法包括使用一定剂量的细胞,所述剂量包含以下细胞数量:至少或至少约 $1 \times 10^5$ 个总重组受体表达细胞、总T细胞或总外周血单个核细胞(PBMC),如至少或至少 $1 \times 10^6$ 、至少或至少约 $1 \times 10^7$ 、至少或至少约 $1 \times 10^8$ 个此类细胞。在一些实施方案中,数量是关于CD3+或CD8+的总数,在一些情况下也是关于重组受体表达(例如,CAR+)细胞。在一些实施方案中,细胞疗法包括施用包含以下细胞数量的剂量:从或从约 $1 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^8$ 个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞、从或从约 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞或从或从约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个CD3+或CD8+总T细胞或CD3+或CD8+重组受体表达细胞,每个都包含端值。在一些实施方案中,细胞疗法包括施用包含如下细胞数量的剂量:从或从约 $1 \times 10^5$ 至 $5 \times 10^8$ 个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞、从或从约 $5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^7$ 个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞或者从或从约 $1 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^7$ 个总CD3+/CAR+或CD8+/CAR+细胞,每个都包含端值。

[0675] 在一些实施方案中,所述剂量的T细胞包括CD4+ T细胞、CD8+ T细胞或CD4+和CD8+ T细胞。

[0676] 在一些实施方案中,例如,如果受试者是人,那么所述剂量的CD8+ T细胞(包括在剂量中包括CD4+和CD8+ T细胞)包括在约 $1 \times 10^6$ 与 $5 \times 10^8$ 个之间的总重组受体(例如,CAR)表达CD8+细胞,例如,在约 $5 \times 10^6$ 至 $1 \times 10^8$ 个此类细胞的范围内,例如 $1 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $7.5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个总此类细胞,或在任两个前述值之间的范围内。在一些实施方案中,向患者施用多个剂量,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,细胞的剂量包括施用从或从约 $1 \times 10^7$ 至 $0.75 \times 10^8$ 个总重组受体表达CD8+ T细胞、 $1 \times 10^7$ 至 $2.5 \times 10^7$ 个总重组受体表达CD8+ T细胞、从或从约 $1 \times 10^7$ 至 $0.75 \times 10^8$ 个总重组受体表达CD8+ T细胞,每个均包含端值。在一些实施方案中,细胞的剂量包括施用或施用约 $1 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $7.5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个总重组受体表达CD8+ T细胞。

[0677] 在一些实施方案中,将细胞(例如,重组受体表达T细胞)的剂量作为单一剂量施用于受试者,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施用一次。

[0678] 在过继细胞疗法的背景下,给定“剂量”的细胞的施用包括以单一组合物和/或单次不间断施用的方式(例如以单次注射或连续输注的方式)施用给定量或数量的细胞,并且还包括在例如不超过3天的指定时间段内以在多个单独组合物或输注中提供的分割剂量或多个组合物的方式施用给定量或数量的细胞。因此,在一些情况下,剂量是指定数量的细胞的单次或连续施用,在单个时间点给予或开始。然而,在一些情况下,剂量在不超过三天的时间段内以多次注射或输注的方式施用,例如每天一次持续三天或两天或者通过在一天的时间内多次输注。

[0679] 因此,在一些方面,所述剂量的细胞以单一药物组合物施用。在一些实施方案中,所述剂量的细胞以共同含有所述剂量的细胞的多种组合物施用。

[0680] 术语“分割剂量”是指分割的剂量,使其在超过一天的时间内施用。这种类型的给药涵盖在本发明方法中并且被认为是单一剂量。在一些实施方案中,分割剂量的细胞在不超过三天的时间段内以共同包含剂量的细胞的多个组合物来施用。

[0681] 因此,细胞的剂量可以作为分割剂量施用,例如随时间施用的分割剂量。例如,在

一些实施方案中,所述剂量可以在2天或3天内施用于受试者。用于分割给药的示例性方法包括在第一天施用25%的剂量并在第二天施用剩余的75%的剂量。在其他实施方案中,可以在第一天施用所述剂量的33%,并且在第二天施用剩余的67%。在一些方面,在第一天施用10%的剂量,在第二天施用30%的剂量,并且在第三天施用60%的剂量。在一些实施方案中,分割剂量不超过3天。

[0682] 在一些实施方案中,所述剂量的细胞可以通过施用多种组合物或溶液(如第一和第二,任选地更多)来施用,每种组合物或溶液含有所述剂量的一些细胞。在一些方面,任选地在一定时间段内,分开地或独立地施用多个组合物,每个组合物含有不同细胞群和/或细胞亚型。例如,细胞群或细胞亚型可以分别包括CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup> T细胞,和/或分别包含富集CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup>的群体,例如CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> 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,所述剂量的施用包括施用第一组合物,其包含一定剂量的CD8<sup>+</sup> T细胞或一定剂量的CD4<sup>+</sup> T细胞;以及施用第二组合物,其包含另一剂量的CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞。

[0683] 在一些实施方案中,组合物或剂量的施用(例如,所述多种细胞组合物的施用)涉及分开施用所述细胞组合物。在一些方面,分开施用是同时或以任何顺序依次进行。在一些实施方案中,剂量包括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施用相隔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,第一组合物的施用的开始和第二组合物的施用的开始相隔不超过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。在一些实施方案中,第一组合物的施用的开始和/或完成以及第二组合物的施用的完成和/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。

[0684] 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<sup>+</sup>T细胞。在一些组合物中,所述第一组合物(例如,所述剂量的第一组合物)包含CD8<sup>+</sup> T细胞。在一些实施方案中,在第二组合物之前施用第一组合物。

[0685] 在一些实施方案中,细胞的剂量或组合物包括限定或目标比率的表达重组受体的CD4<sup>+</sup>细胞与表达重组受体的CD8<sup>+</sup>细胞和/或CD4<sup>+</sup>细胞与CD8<sup>+</sup>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,具有目标或所需比率的不同细胞群(如CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>比率或CAR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>:CAR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>比率,例如1:1)的组合物或剂量的施用涉及施用含有一种群体的细胞组合物,然后施用包含另一种群体的单独细胞组合物,其中施用是以或大致以目标或所需比率来进行。在一些方面,以确定比率施用细胞的剂量或组合物导致改善的T细胞疗法的扩增、持久性和/或抗肿瘤活性。

[0686] 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,向受试者施用两个剂量。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天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天施用。在一些实施方案中,在第一剂量后施用多个连续剂量,使得在施用连续剂量后施用另外一个或多个剂量。在一些方面,以另外的剂量向受试者施用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,另外的一个或多个剂量大于先前剂量。

[0687] 在一些方面,所述第一和/或连续剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如所述

受试者对先前治疗(例如化学疗法)的反应、所述受试者的疾病负荷(如肿瘤负担、体积、大小或程度)、转移的范围或类型、分期和/或所述受试者发生毒性结局(例如CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0688] 在一些方面,第一剂量的施用与连续剂量的施用之间的时间为约9至约35天、约14至约28天或15至27天。在一些实施方案中,连续剂量的施用是在施用第一剂量后大于约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,在施用连续剂量后施用另外一个或多个剂量(例如连续剂量)。在一些方面,在施用先前剂量后至少约14天且小于约28天施用另外的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,在先前剂量之后4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天)施用另外的剂量。在一些实施方案中,在先前剂量后小于约14天不施用剂量,和/或在先前剂量后超过约28天不施用剂量。

[0689] 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),包含第一剂量的T细胞和连续剂量的T细胞,其中第一剂量和第二剂量中之一或两者包括施用分割剂量的T细胞。

[0690] 在一些实施方案中,细胞的剂量通常足够大以有效降低疾病负荷。

[0691] 在一些实施方案中,将细胞以所需剂量施用,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,细胞的剂量基于细胞总数(或每kg体重的数量)和单独群体或亚型的所需比率,如CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>的比率。在一些实施方案中,细胞的剂量基于单独群体中的细胞或单独细胞类型的所需总数(或每kg体重的数量)。在一些实施方案中,剂量基于此类特征的组合,此类特征如所需的总细胞数量、所需比率和单独群体中的所需细胞总数。

[0692] 在一些实施方案中,以总细胞的所需剂量(如T细胞的所需剂量)的容忍差异或在所述容忍差异内施用细胞的群体或亚型,如CD8<sup>+</sup>和CD4<sup>+</sup> T细胞。在一些方面,所需剂量是所需细胞数量或被施用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最小细胞数量。在一些方面,在以所需剂量施用的总细胞中,单独群体或亚型是以等于或接近所需输出比率(如CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>的比率)存在,例如在这种比率的某一耐受差异或误差内存在。

[0693] 在一些实施方案中,将细胞以细胞的一种或多种单独群体或亚型的所需剂量(如CD4<sup>+</sup>细胞的所需剂量和/或CD8<sup>+</sup>细胞的所需剂量)施用,或在所述耐受差异内施用。在一些方面,所需剂量是亚型或群体的细胞的所需数量或被施用细胞的受试者的每单位体重的此类细胞的所需数量,例如细胞/kg。在一些方面,所需剂量等于或高于群体或亚型的细胞的最小数量或每单位体重群体或亚型的细胞的最小数量。

[0694] 因此,在一些实施方案中,剂量基于总细胞的所需固定剂量和所需比率,和/或基于一种或多种单独亚型或亚群(例如,各自)的所需固定剂量。因此,在一些实施方案中,剂量基于T细胞的所需固定剂量或最小剂量以及CD4<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>细胞的所需比率,和/或基于CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>细胞的所需固定剂量或最小剂量。

[0695] 在一些实施方案中,所述细胞在多种细胞群或亚型(如CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞或亚型)的所需输出比率的耐受范围下或耐受范围内施用。在一些方面,所需比率可以是特定比率或

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<sup>+</sup>与CD8<sup>+</sup>细胞的比率)在为或约5:1与为或约5:1之间(或者大于约1:5且小于约5:1),或者在为或约1:3与为或约3:1之间(或者大于约1:3且小于约3:1),如在为或约2:1与为或约1:5之间(或者大于约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,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%内,包括这些范围之间的任何值。

[0696] 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/或浓度是指施用的所有细胞、T细胞或外周血单个核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0697] 在一些方面,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局(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答)的可能性或发生率。

[0698] 在一些实施方案中,所述方法还包括施用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施用: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局(例如,CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所施用的细胞和/或重组受体的宿主免疫反应)的可能性或发生率。

[0699] 在一些实施方案中,可以施用相对较低剂量的细胞,例如次最佳剂量的细胞或低于治疗有效量的剂量的细胞,其在体内刺激(例如通过内源性抗原或外源性药剂)时可以导致受试者中存在的工程化细胞的数量加强(例如增加或扩增)。在任何此类实施方案中,细胞的扩增和/或激活可以与在体内暴露于抗原一起发生,例如,在施用细胞后,受试者体内工程化细胞的扩增。在一些实施方案中,体内扩增的范围、程度或量值可以通过多种方法来扩大、加强或增强,所述方法能够调节(例如增加)所施用细胞(例如表达重组受体的细胞)的扩增、增殖、存活和/或功效。

[0700] 一旦将细胞施用于受试者(例如人),在一些方面通过许多已知方法中的任何一种来测量细胞群的生物活性。要评价的参数包括细胞与抗原的特异性结合,在体内例如通过成像来评价,或离体例如通过ELISA或流式细胞术来评价。在某些实施方案中,细胞破坏靶细胞的能力可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,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,还可以通过测定某些细胞因子如CD107a、IFN  $\gamma$ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来测量细胞的生物活

性。在一些方面,通过评估临床结局(如肿瘤负荷或负担的减少)来测量生物活性。在一些方面,评估毒性结局、细胞的持久性和/或扩增和/或宿主免疫反应的存在或不存在。

#### VI. 制品和试剂盒

[0701] 在一些实施方案中,还提供了可用于进行所提供的方法的系统、设备和试剂盒。在一些实施方案中,提供了含有病毒颗粒和/或细胞以及任选的使用说明书的制品,如试剂盒或装置。在一些实施方案中,试剂盒可以用于转导细胞(如与制备用于过继细胞疗法的基因工程化细胞一致)的方法中。在一些实施方案中,试剂盒可以用于针对活细胞富集的方法中,如在转导的细胞中。在一些实施方案中,试剂盒可以用于将细胞去珠。

[0702] 在一些实施方案中,制品包括一个或多个容器(通常多个容器)、包装材料、以及在一个或多个容器和/或包装上或与一个或多个容器和/或包装相关的标签或包装插页(通常包括用于转导细胞如转导来自受试者的细胞的说明书)。可替代地,说明书可以用于活细胞的富集或细胞的去珠。

[0703] 本文提供的制品含有包装材料。用于在包装所提供的材料中使用的包装材料是本领域技术人员所熟知的。参见例如,美国专利号5,323,907、5,052,558和5,033,252,将其各自以其整体并入本文。包装材料的例子包括但不限于泡罩包装、瓶、管、吸入器、泵、袋、小瓶、容器、注射器或瓶。制品可以包括针或其他注射装置,以便于材料的分配。通常,包装不与其中所含的组合物反应。

[0704] 在一些实施方案中,病毒颗粒和细胞是分开包装的。在一些实施方案中,每个容器可以具有单一区室。在一些实施方案中,含有病毒颗粒的容器是适于由使用者例如通过隔室中的开口添加细胞的容器,或反之亦然。考虑了适于具有用于容纳病毒颗粒和/或细胞的限定空间并且适于简单操作以允许添加混合物所需的最终组分从而产生含有与细胞缔合的病毒颗粒的输入组合物的任何容器或其他制品。在一些实施方案中,在将细胞组合物和病毒颗粒装载至离心机中之前,将细胞添加至病毒颗粒中。

[0705] 在一些实施方案中,将此类材料分开包装在同一容器中,例如,使得组分可以在容器中混合或组合。在一些方面,此类容器的例子包括具有如下空间的那些:含有病毒颗粒的封闭限定空间以及含有细胞的单独的封闭限定空间,使得两个空间被容易移除的膜分开,所述膜在移除后允许组分混合。可以设想其中组分可以保持分开的任何容器或其他制品。在一些实施方案中,制品可以在由分隔构件(如膜)分开的相邻隔室中含有各组分,所述分隔构件在压缩制品时破裂,从而允许分开的组分混合。对于合适的实施方案,参见例如描述于美国专利号3,539,794和5,171,081中的容器。

#### VII. 定义

[0706] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号以及其他技术和科学术语或用辞意图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应被解释为表示与本领域通常理解的含义有实质性差异。

[0707] 除非上下文另有明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。例如,“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”意指“至少一个/一种”或“一个/一种或多个/多种”。应理解,本文描述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0708] 在整个本公开文本中,要求保护的主题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,并且不应被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此,应该认为范围的描述具体公开了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,在该范围的上限与下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他所陈述值或中间值都涵盖在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在该较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主题内,受制于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述范围包括所述限值中的之一或两者的情况下,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题内。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0709] 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。在本文中提及“约”某一值或参数时包括(并描述)涉及该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。

[0710] 如本文所用,术语“载体”是指能够传播与其连接的另一核酸的核酸分子。所述术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已将其引入的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够引导与它们操作性地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。载体包括病毒载体颗粒,如逆转录病毒(例如, $\gamma$  逆转录病毒和慢病毒)载体。

[0711] 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。后代的核酸含量可能与亲本细胞不完全相同,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活性的突变体后代。

[0712] 如本文所用,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、混悬剂、液体、散剂、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0713] 如本文所用,当提及一种或多种特定细胞类型或细胞群时,“富集”是指例如与所述组合物中的总细胞数或组合物体积相比,或者相对于其他细胞类型,如通过基于所述群体或细胞表达的标记物的阳性选择,或通过基于在要耗尽的所述细胞群或细胞上不存在的标记物的阴性选择,增加所述细胞类型或群体的数量或百分比。所述术语不需要从组合物完全去除其他细胞、细胞类型或群体,并且不需要如此富集的细胞在经富集组合物中以等于或甚至接近100%存在。

[0714] 如本文所用,细胞或细胞群针对特定标记物呈“阳性”的陈述是指,特定标记物(通常是表面标记物)在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标记物时,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物特异性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/或所述水平基本上与已知对所述标记物呈阳性的细胞的水平相似,和/或所述水平基本上高于已知对所述标记物呈阴性的细胞的水平。

[0715] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记物呈“阴性”的陈述是指,特定标记物(通常是表面标记物)在细胞上或细胞中不存在基本上可检测的存在。当提及表面标记物时,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物特异性

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物呈阳性的细胞的水平,和/或所述水平与已知对所述标记物呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0716] 如本文所用的,术语“表达”是指借此基于核酸分子(如基因)的编码序列产生多肽的过程。该过程可以包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或其任何组合。

[0717] 如本文所用,“反向”或“逆流”离心是指一种技术,由此颗粒在离心加速下在流体(例如,支持培养基)中的沉降速率被支持培养基的流动抵消。

[0718] 如本文所用,与“死端”或“分批”离心相反,“连续”流离心是指一种技术,由此可以离心大体积或材料,包括在高离心力下,而不需要频繁停止和启动转子,或频繁填充和倾析离心管。连续流系统可以在连续流的基础上起作用。死端离心的例子是水平式(swing-bucket)转子离心。

[0719] 如本文所用的,对照是指除了没有用测试参数处理外与测试样品基本上相同的样品,或者如果是血浆样品,它可以来自不受目标条件影响的正常志愿者。对照也可以是内部对照。

#### VIII. 示例性实施方案

[0720] 本文提供的实施方案包括:

1. 一种用于产生基因工程化T细胞的组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床;

(b) 将病毒载体颗粒装载至圆锥形流体外壳中,从而生成包含所述细胞组合物和所述病毒载体颗粒的输入组合物;以及

(c) 将第二离心力和第二流速施加至所述输入组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述病毒载体颗粒在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成基因工程化T细胞。

2. 根据实施方案1所述的方法,其中所述病毒载体颗粒的所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分期间进行和/或在(c)中的所述施加的至少一部分期间进行。

3. 一种用于产生基因工程化T细胞的组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的输入组合物以产生细胞流化床,所述输入组合物包含(i)病毒载体颗粒和(ii)含有T细胞的细胞组合物;以及

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述圆锥形流体外壳中的所述输入组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述病毒载体颗粒在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成基因工程化T细胞。

4. 根据实施方案3所述的方法,所述方法进一步包括将所述细胞组合物和所述病毒载体颗粒装载至所述圆锥形流体外壳中,从而生成所述输入组合物,其中所述细胞组合物的装载在所述病毒载体颗粒的装载之前、期间和/或之后。

5. 根据实施方案4所述的方法,其中所述细胞组合物的装载和/或所述病毒载体颗

粒的装载在(a)中的所述施加之前和/或期间进行。

6. 根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

7. 根据实施方案1-6中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将第三离心力和第三流速施加至所述离心机系统的圆锥形流体外壳中的所述基因工程化T细胞,以产生包含所述基因工程化T细胞的输出组合物。

8. 根据实施方案7所述的方法,其中所述输出组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合物中活T细胞的百分比,任选地大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%或大至少约25%。

9. 根据实施方案7或实施方案8所述的方法,其中所述输出组合物中至少或至少约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%或至少或至少约30%的所述T细胞被所述病毒载体颗粒转导。

10. 根据实施方案1-9中任一项所述的方法,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间,任选地其中将所述第一离心力和所述第一流速施加至所述细胞组合物或所述输入组合物约15秒、约30秒、约45秒或约60秒。

11. 根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

12. 根据实施方案11中任一项所述的方法,其中所述第一离心力与所述第一流速的比率在约200与约400之间。

13. 根据实施方案1-12中任一项所述的方法,其中所述第一离心力与所述第一流速的比率是约300。

14. 根据实施方案1-13中任一项所述的方法,其中所述第一离心力是约3,000G,并且所述第一流速是约10mL/min。

15. 根据实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述第二离心力与所述第二流速的比率在约20与约100之间、在约25与约85之间或在约30与约65之间。

16. 根据实施方案1-15中任一项所述的方法,其中所述第二离心力与所述第二流速的比率是约35。

17. 根据实施方案1-16中任一项所述的方法,其中所述第二离心力是约1,000G,并且所述第二流速是约28.5mL/min。

18. 根据实施方案1-15中任一项所述的方法,其中所述第二离心力与所述第二流速的比率是约62.5。

19. 根据实施方案1-17中任一项所述的方法,其中将所述第二离心力和所述第二流速施加至所述输入组合物至少约15分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约60分钟、至少约75分钟或至少约90分钟。

20. 根据实施方案7-19中任一项所述的方法,其中(i)所述第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且(ii)所述第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。

21. 根据实施方案7-20中任一项所述的方法,其中所述第三离心力与所述第三流速的比率在约100与约150之间,任选地其中所述第三离心力与所述第三流速的比率是约

125。

22. 根据实施方案7-21中任一项所述的方法,其中所述第三离心力是约2,500G,并且所述第三流速是约20mL/min。

23. 根据实施方案7-22中任一项所述的方法,其中在施加所述第三离心力和所述第三流速之前,所述方法包括使所述基因工程化T细胞经受一个或多个洗涤步骤,任选地其中所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。

24. 根据实施方案1-23中任一项所述的方法,其中所述方法包括在(a)中的所述施加之前将所述细胞组合物的T细胞在刺激条件下孵育和/或将所述细胞组合物的T细胞在(a)中的所述施加之前在刺激条件下孵育。

25. 根据实施方案24所述的方法,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。

26. 根据实施方案25所述的方法,其中所述刺激试剂包含(i)与TCR复合物的成员特异性结合、任选地与CD3特异性结合的一级药剂,以及(ii)与T细胞共刺激分子特异性结合的二级药剂,任选地其中所述共刺激分子选自CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

27. 根据实施方案26所述的方法,其中所述一级药剂和所述二级药剂中的至少一种包含抗体或其抗原结合片段。

28. 根据实施方案26和实施方案27所述的方法,其中所述一级药剂是抗CD3抗体或其抗原结合片段,并且所述二级药剂是抗CD28抗体或其抗原结合片段。

29. 根据实施方案26-28中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和所述二级药剂各自存在或附着在固体支持物的表面上,任选地其中所述固体支持物是或包括珠,进一步任选地其中所述固体支持物是表面附着有抗CD3和抗CD28抗体的顺磁珠。

30. 根据实施方案26-28中任一项所述的方法,其中所述一级药剂和所述二级药剂可逆地结合在包含多个链霉亲和素分子或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚体颗粒试剂的表面上。

31. 根据实施方案30所述的方法,其中所述链霉亲和素分子或所述链霉亲和素突变蛋白分子结合或能够结合生物素、抗生物素蛋白、生物素类似物或生物素突变蛋白、抗生物素蛋白类似物或抗生物素蛋白突变蛋白和/或其生物活性片段。

32. 根据实施方案26-30中任一项所述的方法,其中所述一级药剂包括抗CD3Fab,并且其中所述二级药剂包括抗CD28 Fab。

33. 根据实施方案24-32中任一项所述的方法,其中所述刺激条件包括一种或多种重组细胞因子的存在。

34. 根据实施方案24-33中任一项所述的方法,其中所述刺激条件包括重组IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种的存在。

35. 根据实施方案7-34中任一项所述的方法,其中所述方法包括收集所述输出组合物和/或将所述输出组合物收集。

36. 根据实施方案35所述的方法,其中所述方法包括孵育所收集的输出组合物的基因工程化T细胞和/或将所收集的输出组合物的基因工程化T细胞孵育。

37. 根据实施方案35或实施方案36所述的方法,其中将所收集的输出组合物的基

因工程化T细胞在所述收集后立即孵育至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天或至少约20天。

38. 根据实施方案35-37中任一项所述的方法,其中在收集后约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天的所收集的输出组合中活T细胞的百分比大于所述输入组合中活T细胞的百分比。

39. 根据实施方案35-38中任一项所述的方法,其中在收集后约1天的所收集的输出组合中活T细胞的百分比大于所述输入组合中活T细胞的百分比。

40. 根据实施方案35-39中任一项所述的方法,其中在收集后约5天的所收集的输出组合中活T细胞的百分比大于所述输入组合中活T细胞的百分比。

41. 根据实施方案35-40中任一项所述的方法,其中所述方法包括冷冻保存所收集的输出组合物和/或将所收集的输出组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的组合物。

42. 根据实施方案41所述的方法,其中将所述冷冻保存的组合物解冻以产生解冻的组合物,并且所述解冻的组合物中活T细胞的百分比大于所述输入组合中活T细胞的百分比,任选地大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%、大至少约25%或大至少约30%。

43. 根据实施方案1-42中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含具有如下平均直径的T细胞:大于或大于约6微米、大于或大于约6微米、大于或大于约7微米、大于或大于约8微米、大于或大于约9微米、大于或大于约10微米或大于或大于约11微米。

44. 根据实施方案1-43中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含在约 $1 \times 10^6$ 个总T细胞与约 $2 \times 10^9$ 个总T细胞之间。

45. 根据实施方案1-44中任一项所述的方法,其中所述输入组合物包含至少约 $1 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $2 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $3 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $4 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $5 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $6 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $7 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $8 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $9 \times 10^8$ 个总T细胞、至少约 $1 \times 10^9$ 个总T细胞、至少约 $1.25 \times 10^9$ 个总T细胞、至少约 $1.50 \times 10^9$ 个总T细胞或至少约 $1.75 \times 10^9$ 个总T细胞。

46. 根据实施方案1-45中任一项所述的方法,其中所述输入组合物的体积在约5ml与约20,000ml之间、在约10ml与约2,000ml之间、在约15ml与约1,000ml之间、在约20ml与约500ml之间、在约25ml与约100ml之间或在约30ml与约60ml之间。

47. 根据实施方案1-46中任一项所述的方法,其中所述输入组合物的体积在约30ml与约60ml之间。

48. 根据实施方案7-47中任一项所述的方法,其中所述输出组合物的体积在约2.5ml与约60ml之间、在约5ml与约40ml之间或在约10ml与约20ml之间。

49. 根据实施方案7-48中任一项所述的方法,其中所述输出组合物的体积是约5ml、约10ml、约15ml、约20ml、约25ml、约30ml、约35ml、约40ml、约45ml、约50ml、约55ml或约60ml。

50. 一种针对活细胞富集细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a) 将第一离心力和第一流速施加至离心机系统的圆锥形流体外壳中的包含T细胞的细胞组合物,以产生细胞流化床,其中所述细胞组合物包含活T细胞和非活T细胞,其中(i)所述第一离心力在约2,000G与约4,000G之间;并且(ii)所述第一流速在约5mL/min与约15mL/min之间;以及

(b) 将第二离心力和第二流速施加至所述细胞组合物,其中所述第二离心力和所述第二流速使所述输入组合物的细胞在所述离心机系统的流体路径中再循环,从而生成具有比所述细胞组合物中活T细胞百分比更高的活T细胞百分比的经富集的组合物,其中(i)所述第二离心力在约500G与约1,500G之间;并且(ii)所述第二流速在约25mL/min与约30mL/min之间。

51. 根据实施方案50所述的方法,其中所述方法包括将所述细胞组合物装载至所述离心机系统中,其中所述装载在(a)中的所述施加的至少一部分之前和/或期间进行。

52. 根据实施方案50或实施方案51所述的方法,其中所述离心机系统是连续逆流离心机系统。

53. 根据实施方案50-52中任一项所述的方法,其中在(a)中的所述施加之前,所述方法包括使所述细胞组合物的T细胞与病毒载体颗粒接触,从而产生基因工程化T细胞,和/或所述细胞组合物的T细胞已经与病毒载体颗粒接触,从而产生基因工程化T细胞。

54. 根据实施方案50-53中任一项所述的方法,其中所述经富集的组合物中活T细胞的百分比比所述细胞组合物中活T细胞的百分比大至少约10%、大至少约20%、大至少约30%、大至少约40%、大至少约50%或大至少约60%。

55. 根据实施方案50-54中任一项所述的方法,所述方法包括(c)将第三离心力和第三流速施加至所述离心机系统的圆锥形流体外壳中的所述经富集的组合物以收集所述经富集的组合物,其中(i)所述第三离心力在约2,000G与约3,000G之间;并且(ii)所述第三流速在约15mL/min与约25mL/min之间。

56. 根据实施方案55所述的方法,其中在施加所述第三离心力和所述第三流速之前,所述方法包括使所述经富集的组合物经受一个或多个洗涤步骤,任选地其中所述一个或多个洗涤步骤包括培养基交换。

57. 根据实施方案23-49和56中任一项所述的方法,其中所述一个或多个洗涤步骤在所述第二离心力和所述第二流速下进行。

58. 根据实施方案1-57中任一项所述的方法,其中所述细胞组合物包含激活的T细胞。

59. 根据实施方案50-58中任一项所述的方法,其中所述方法包括冷冻保存所收集的经富集的组合物和/或将所收集的经富集的组合物冷冻保存,从而生成冷冻保存的经富集的组合物。

60. 根据实施方案59所述的方法,其中将所述冷冻保存的经富集的组合物解冻以产生解冻的经富集的组合物,并且所述解冻的经富集的组合物中活T细胞的百分比大于所述细胞组合物中活T细胞的百分比,任选地大至少约5%、大至少约10%、大至少约15%、大至少约20%、大至少约25%或大至少约30%。

61. 根据实施方案1-60中任一项所述的方法,其中所述方法的一个或多个步骤是自动化的,任选地其中所述方法的所述一个或多个步骤通过所述离心机系统或其组件自动

化。

62. 根据实施方案1-61中任一项所述的方法,其中所述病毒载体颗粒包含编码重组分子的异源核酸。

63. 根据实施方案62所述的方法,其中所述重组分子是趋化因子、趋化因子受体、细胞因子、细胞因子受体、抗原受体(例如,CAR或TCR)或其组合。

64. 根据实施方案62或实施方案63所述的方法,其中所述重组分子是抗原受体。

65. 根据实施方案64所述的方法,其中所述抗原受体是转基因T细胞受体(TCR)。

66. 根据实施方案65所述的方法,其中所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

67. 根据实施方案66所述的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

68. 根据实施方案67所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域包含CD3- $\zeta$ (CD3 $\zeta$ )链的细胞内结构域。

69. 根据实施方案67或实施方案68所述的方法,其中所述CAR进一步包含连接所述细胞外结构域和所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

70. 根据实施方案69所述的方法,其中所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。

71. 根据实施方案67-70中任一项所述的方法,其中所述细胞内信号传导结构域进一步包含T细胞共刺激分子的细胞内信号传导结构域。

72. 根据实施方案71所述的方法,其中所述T细胞共刺激分子选自CD28和4-1BB。

73. 根据实施方案66-72中任一项所述的方法,其中所述CAR被重组表达。

74. 根据实施方案66-73中任一项所述的方法,其中所述CAR由载体,任选地 $\gamma$ 逆转录病毒载体或慢病毒载体表达。

75. 根据实施方案66-74中任一项所述的方法,其中所述CAR由慢病毒载体表达。

76. 根据实施方案64-75中任一项所述的方法,其中所述抗原受体特异性结合与疾病或病症相关的抗原。

77. 根据实施方案76所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症、自身免疫性疾病或障碍和/或感染性疾病。

78. 根据实施方案76或实施方案77所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

79. 根据实施方案1-78中任一项所述的方法,其中所述T细胞是原代T细胞,任选地来自人受试者。

80. 一种组合物,所述组合物包含通过根据实施方案1-79中任一项所述的方法产生的基因工程化T细胞。

81. 根据实施方案80所述的组合物,其中所述组合物包含在约 $1.0 \times 10^6$ 个CAR表达T细胞与 $2.0 \times 10^9$ 个CAR表达T细胞之间。

82. 根据实施方案80或81所述的组合物,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。

83. 根据实施方案80或实施方案81所述的组合物,所述组合物进一步包含冷冻保护剂。

84. 一种治疗患有疾病或障碍的受试者的方法,所述方法包括将根据实施方案80-82中任一项所述的组合物施用于所述受试者。

85. 根据实施方案84所述的方法,其中所述基因工程化T细胞表达特异性结合与所述疾病或障碍相关的抗原的抗原受体。

#### IX. 实施例

[0721] 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。

##### 实施例1通过连续逆流离心在转导期间富集活细胞

###### A. 在转导期间富集活细胞

[0722] 通过基于免疫亲和力的富集从来自四名人供体的白细胞单采术样品的分离的PBMC中选择CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞的单独组合物。将所选择的细胞组合物冷冻保存,随后解冻并以1:1的活CD4<sup>+</sup>细胞与活CD8<sup>+</sup>细胞的比率进行培养。然后将组合的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞组合物与抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚体链霉亲和素突变蛋白试剂(参见例如,WO 2018197949和Poltorak等人(2020)Sci Rep10,17832)一起在含有用于激活T细胞的重组IL-2、IL-7和IL-15的培养基中孵育18-30小时。

[0723] 在激活后,使T细胞组合物在连续逆流离心机系统(CTS Rotea™逆流离心系统)中在存在编码抗CD19嵌合抗原受体(CAR)的慢病毒载体颗粒的情况下经受基于连续逆流淘洗(“CCE”)的离心方法,以用载体转导T细胞(“输入组合物”)。CAR含有源自鼠抗体的抗CD19 scFv(源自FMC63的可变区、免疫球蛋白来源的间隔子、源自CD28的跨膜结构域、源自4-1BB的共刺激区域和CD3- $\zeta$ 细胞内信号传导结构域)。病毒载体中的表达构建体进一步含有编码截短的受体的序列,所述序列通过T2A核糖体跳跃序列与CAR序列隔开并且用作CAR表达的替代标记物。

[0724] 首先,生成了T细胞组合物,其在200mL的总培养基体积中含有100-200万个细胞/mL,并经由沿着圆锥形外壳部分的长度延伸的窄套管装载至系统的圆锥形部分中。对于装载,T细胞组合物在圆锥形外壳部分的宽端进入套管,并在圆锥形外壳部分的尖端离开套管。首先使T细胞组合物经受3,000x g的离心力和10mL/min的流速,产生3,000:10的离心力与流速比率(G/FR为300)以形成细胞流化床。非活细胞倾向于朝向圆锥形外壳部分的尖端的外边缘聚集。在建立流化细胞床之后,将含有慢病毒载体颗粒的10mL溶液经由连续逆流离心机系统的套管装载至圆锥形外壳部分中,维持离心力和流速,以建立细胞和载体颗粒的流化床。

[0725] 在建立细胞和载体颗粒的流化床之后,流速维持在10mL/min下,但是离心力为625x g,从而得到62.5的G/FR。这些条件允许较大的、粘性的非活T细胞聚集体继续在圆锥形外壳部分的圆锥形尖端处聚集为沉淀物(“废物”级分),而流化的T细胞(活的或非活的)和载体颗粒被迫朝向圆锥形外壳部分的中心,并允许离开(淘洗出)圆锥形外壳部分的宽端,并通过流体路径流入收集室作为“输出”级分。将输出级分再循环通过连续逆流离心机系统的圆锥形外壳部分总共30分钟,直至细胞组合物被重新引导并收集为最终转导的细胞“产物”级分。

[0726] 在再循环之后,将输出级分在2,500x g的离心力和20mL/min的流速(得到125的G/FR)下重新引导并且收集为最终活细胞“产物”级分。经由套管收集转导的“产物”级分,其中所收集的细胞在圆锥形外壳部分的尖端处进入套管并在圆锥形外壳部分的宽端处离开套管。将转导的“产物”级分以 $0.75 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度重悬于培养基中,并在37摄氏度下孵育24小时以允许病毒载体的整合。通过基于荧光显微术的细胞计数仪器测定各种级分中

的活细胞和非活细胞的数量。

[0727] 三次不同运行的结果示于图1A和图1B中。示例性离心转导方法去除了平均约50%的非活细胞(图1A,底部图),并且活细胞产量平均提高了约20%(图1B)。这些结果证明,基于CCE的转导方法可以针对样品中的活细胞进行富集并且增加样品中活细胞的百分比。

#### B. 转导效率和转导后的细胞活力

[0728] 原代人T细胞组合物是由来自成人供体的白细胞单采术样品生成的,并且在存在编码抗CD19 CAR的慢病毒载体的情况下经受基于CCE的离心方法,以用载体转导T细胞(“输入”组合物),如章节A中所述。在转导后立即以及在之后的多个时间点评估离心的细胞组合物的转导效率和细胞活力。

[0729] 作为对照,通过按比例缩小的方法在进行或不进行旋转接种的情况下用慢病毒载体转导T细胞。对于旋转接种方法,生成了T细胞组合物,其含有 $2 \times 10^7$ 个活细胞/mL,并在基本上刚性的圆柱形离心室中以693g离心30分钟。将“无旋转”对照样品在相同条件但不离心的情况下孵育。所有样品的载体滴度为1.11 $\mu$ L/百万个细胞。也在转导后孵育对照组合物以允许病毒载体的整合。

[0730] 在孵育后,收集转导的产物级分,并将其通过死端离心和缓冲液交换的自动化方法洗涤。基于转导的细胞组合物中具有CAR表面表达的CD3+ T细胞的百分比确定转导效率。如章节A中所述评估转导的细胞组合物的活力。

[0731] 如图2A中对于从来自两名供体的细胞产生的转导的细胞组合物所示,相对于无旋转对照方法,基于CCE的方法导致改善的转导效率。CCE方法的转导效率低于旋转接种方法获得的转导效率。

[0732] 如图2B所示,在用载体连续逆流离心后,T细胞的活力立即从65%增加至81% (“输入”相比于“0h”)。在转导后24小时 (“24h”)和5天 (“第5天”),转导的T细胞继续展现出与其转导前活力相比增加的细胞活力。相比之下,对照样品中的细胞活力与转导前活力水平相比没有显著变化。

#### C. 转导体积对细胞活力的影响

[0733] 在相关实验中,通过CCE方法在连续逆流离心机系统中通过相同的方法转导T细胞,其中每百万个细胞1.11 $\mu$ L载体,总体积为30mL或60mL。作为对照,使T细胞经受按比例缩小的旋转接种方法。经受CCE方法的30mL和60mL细胞和载体组合物的活力均可比较地增加(图3),表明组合物体积对转导的细胞的活力没有显著影响。

[0734] 结果与以下观察结果一致,即连续逆流离心机系统可以用于同时用病毒载体颗粒转导T细胞组合物以及针对活T细胞富集组合物。

#### 实施例2通过连续逆流离心与替代性自动化离心来富集转导的活细胞

[0735] 如实施例1中所述从11名人供体生成T细胞组合物并且将其激活。在激活后,将细胞重悬于含有重组IL-2、IL-7和IL-15的培养基中,并用编码抗CD19CAR的慢病毒载体通过以693g旋转接种30分钟进行转导。CAR含有源自鼠抗体的抗CD19 scFv(源自FMC63的可变区、免疫球蛋白来源的间隔子、源自CD28的跨膜结构域、源自4-1BB的共刺激区域和CD3- $\zeta$ 细胞内信号传导结构域)。病毒载体中的表达构建体进一步含有编码截短的受体的序列,所述序列用作CAR表达的替代标记物,其通过T2A核糖体跳跃序列与CAR序列隔开。

[0736] 将旋转接种的细胞洗涤并重悬于培养基中,并在37摄氏度下培养,直至开始激活

之后96小时。在培养后,将转导的T细胞组合物(“输入组合物”)装载至连续逆流离心机系统(CTS Rotea™逆流离心机系统)的圆锥形外壳部分中,并经受3,000g的离心力和10mL/min的流速30秒,以建立流化细胞床。然后使转导的细胞经受2,500g的离心力和40mL/min(62.5G/FR)或75mL/min(33.3G/FR)的流速。在这些条件下,然后将培养基交换成具有1.25%人血清白蛋白的pH 7.4的PlasmaLyte作为“洗涤”步骤,允许淘洗非活细胞以供收集和分析废物级分。

[0737] 作为对照,使源自相同供体并通过相同方法生成的转导的T细胞组合物经受自动化死端离心和缓冲液交换的替代方法(“替代方法”)。

[0738] 如前所述评估通过基于连续逆流的方法或替代方法生成的输入组合物、洗涤的产物级分和废物级分的细胞活力。如图4A(每条线代表一名供体)所示,输入组合物的连续逆流离心在洗涤的产物级分中产生一致改善的细胞活力,这在经受离心和缓冲液交换的替代方法的输入组合物中没有观察到。对于测试的两种G/FR比率,观察结果是相似的。

#### 实施例3在冷冻保存的产物中改善的活力的维持

[0739] 随后将来自实施例2的洗涤的产物(WP)级分重悬于25%缓冲液和75% CryoStor® CS-10培养基中以产生配制的药物产品(FDP)。基本上如所述评估FDP的活力。发现在洗涤的产物级分中观察到的改善的细胞活力在FDP中得以维持。然后将FDP在速率受控的冷冻器中冷冻以产生冷冻保存的药物产品(CDP)。将CDP在液氮中储存至少3天,然后取出以在室温下解冻。观察到与洗涤前产物级分(“收获的产物”;HP)、WP级分和FDP的活力相比,解冻的CDP的活力降低(图4B)。

[0740] 为了确定FDP与解冻的CDP之间的活力损失是否与供体有关,将每名供体的WP级分、FDP和解冻的CDP的细胞活力针对相同供体的洗涤前产物级分中的初始细胞活力归一化(图4C)。未观察到供体特异性效应。为了进一步确认通过基于CCE的离心方案是否在具有低活力的供体洗涤前产物级分中富集了活细胞,在具有最低活力的供体洗涤前产物级分中追踪过程的每个步骤期间的细胞数量和定位。洗涤前产物(HP)级分展现出61%细胞活力,而洗涤的产物(WP)级分展现出92%活力(图4D),表明在基于CCE的离心期间,活细胞和非活细胞被分离并分布至不同的级分中,而不管洗涤前产物级分活力如何。

[0741] 修改基于CCE的离心方案以减少在解冻的CDP中观察到的活力富集的损失(“修改的基于CCE的方法”)。特别地,向下调节离心力和流速以减少对细胞的离心应力。如图4E(具有低活力(<70%)的输入级分由菱形和星号表示)所示,将离心力从2500g降低至1000g并实施28.5mL/min的流速(35G/FR)保留了解冻的CDP中的活力富集效果。与替代方法相比,还发现修改的基于CCE的方法获得可比较的细胞数量产量(图4F)。不希望受理论束缚,这些观察结果与以下发现一致,即更低的离心力和流速可以减少在解冻的CDP中观察到的细胞活力的损失。

[0742] 在相关实验中,使来自供体样品的低(230-400x 10<sup>6</sup>个细胞)、中(400-750x 10<sup>6</sup>个细胞)和高(>750x 10<sup>6</sup>个细胞)负荷的细胞经受修改的基于CCE的方法(“Mod CCE”)或实施例2中所述的替代方法(“Alt”)。供体样品在相应的修改的基于CCE的方法与替代方法之间匹配。未观察到细胞负荷影响由修改的基于CCE的方法产生的CDP的活力。此外,与替代方法相比,由修改的基于CCE的方法产生的CDP展现出相似或更高的活力(图4G),而不管细胞负荷如何。

[0743] 进行建模以预测在洗涤前产物 (HP) 级分中展现出一定范围的活力的供体样品中由修改的基于CCE的方法或替代方法产生的CDP的细胞活力的改善。如图4H、图4I和图4J所示,建模预测,与替代方法相比,修改的基于CCE的方法将产生增加的活力富集,特别是在具有展现出更低活力的洗涤前产物 (“HP”) 级分的供体中。因此,可以实现活力富集,同时维持可比较的最终产物产量。基于CCE的方法去除潜在杂质 (例如,蛋白质、DNA、细胞碎片和在制造期间使用的试剂) 的能力也通过对进入培养基和离开培养基进行建模以及通过对进入培养基的实际测量来评估。特别地,图4K显示进入和离开培养基中杂质的预测浓度,以及进入培养基中杂质的测量浓度。

[0744] 因此,建模表明,修改的基于CCE的方法可以增加成功制造出产品的供体的数量。

#### 实施例4按照扩增培养方案通过连续逆流离心富集转导的活细胞

[0745] 如实施例2中所述生成并转导原代人T细胞组合物,不同之处在于使细胞经受扩增方案,其中在开始激活后将T细胞培养总共15天。通过在开始激活之后将T细胞组合物孵育15天,细胞可以变得较少地被激活,从而改变它们的大小。因此,进行实验以了解G/FR比率如何影响经受扩增方案的活细胞的富集。

[0746] 按照扩增培养方案,将展现出50%细胞活力的转导的T细胞输入组合物装载至连续逆流离心机系统 (CTS Rotea™逆流离心系统) 的圆锥形外壳部分中,并经受3,000g的离心力和10mL/min的流速30秒,以建立细胞流化床。然后将离心力降低至2,500G,并将流速增加至40mL/min,从而得到62.5的G/FR比率。如在实施例2中所述,将培养基交换成具有1.25%人血清白蛋白的pH 7.4的PlasmaLyte作为“洗涤”步骤,允许淘洗非活细胞以供收集和分析废物级分。

[0747] 如前所述评估活细胞和非活细胞的数量。如图5A (左图) 中所示,当离心力和流速在整个离心过程中在62.5G/FR下保持恒定时,产物级分 (洗涤的产物1) 中活细胞百分比与输入组合物 (输入) 中活细胞百分比相比基本上没有变化。此外,在洗涤的废物级分 (洗涤废物) 中存在最少的非存活细胞。

[0748] 为了淘洗另外的非活细胞,对在第一次洗涤期间收集的细胞 (洗涤的产物1) 进行第二次洗涤步骤。在第二次洗涤步骤期间,离心力保持在2,500g下并且流速保持在75mL/min下,得到33.3G/FR比率。在G/FR比率为33.3的第二次洗涤后,在洗涤的废物级分 (洗涤废物) 中发现了大量的非活细胞 (图5A; 右图), 并且与输入组合物中细胞的活细胞百分比相比,产物级分 (洗涤产物2) 中的活细胞百分比显著提高 (图5B)。结合实施例3中描述的结果,观察到更低的G/FR比率 (例如,33.3或35) 改善了针对活细胞的富集。

[0749] 不希望受理论束缚,在扩增方案之后细胞大小的变化可以导致离心力、流速及它们的比率的差异,这可以用于扩增的细胞的活力富集。基于洗涤的产物1的细胞测定扩增方案后的细胞大小,如图5C (底部图) 所示。洗涤的产物1的活 (V) 和非活 (NV) 细胞的平均大小均小于9 $\mu$ m。为了比较,在单独的实验中激活三天之后的细胞大小示于图5C (顶部图) 中。激活三天的细胞平均大于开始激活之后15天收集的洗涤的产物1的细胞。这一发现与以下情况一致,即细胞在初始激活期间大小增加,然后在培养中扩增期间变得较少地激活并且大小减小。此外,虽然激活三天的细胞的非活细胞 (NV) 具有约9 $\mu$ m的平均大小,但激活三天的细胞的大部分活细胞 (V) 具有较大的大小 (约14 $\mu$ m)。

#### 实施例5通过连续逆流离心进行病毒转导的效率

[0750] 如实施例1中所述,从来自成人供体的白细胞单采术样品生成原代人T细胞组合物,并使其在存在编码抗CD19 CAR的载体的情况下经受基于CCE的离心方法以转导T细胞。如以下章节中所述独立地改变连续逆流离心方法的各种参数,并评估转导效率。

#### A. 离心力和流速对转导效率的影响

[0751] 基本上如实施例1中所述,使用基于CCE的方法用编码抗CD19 CAR的慢病毒载体转导T细胞组合物,不同之处在于离心力和流速是变化的。在建立细胞和载体颗粒的流化床后,将离心力调节至625x g或1,500x g,并将流速调节至10mL/min或24mL/min,得到62.5或150的G/FR比率(参见表E1)。

离心机 (G)	625	1500	1500
流速 (mL/min)	10	24	10
G/FR 比率	62.5	62.5	150

[0752] 通过测定具有CAR表面表达的CD3+ T细胞的百分比来计算转导效率。如图6A所示,用编码CAR的载体在表E1中所示的离心力和流速下转导T细胞组合物。所测试的不同参数导致相似的CD3+CAR+ T细胞百分比。

[0753] 作为对照,将基于连续逆流离心机系统的方法与实施例1的小节B中描述的按比例缩小的旋转接种转导方法进行比较。使离心后的载体整合如实施例1中所述进行,并评估转导效率。基于按比例缩小的旋转接种的转导的结果示于图6B中。观察到这两种方法的转导效率是可比较的,使得基于CCE的方法导致可比较的转导效率,但细胞活力更高。

[0754] 进一步测试了用于再循环的离心力和流速,特别地300G离心力与10mL/min流速(300G/10FR)和3000G/30FR条件。在300G/10FR下再循环导致与用表E1中的测试的参数所实现的转导效率可比较的转导效率。如图6C中所示,与在625G/10FR下再循环和按比例缩小的旋转接种控制方法所实现的转导效率相比,在3000G/30FR下再循环导致转导效率降低。

[0755] 测试了另一种再循环程序,其中施加1500G/10FR条件一分钟,接着施加300G/10FR条件一分钟。在30分钟的孵育期间重复该程序,从而使圆锥形外壳中流化床的大小在整个孵育期间波动。如图6D所示,这种波动的再循环程序导致与在625G/10FR下再循环所实现的转导效率可比较的转导效率。

#### B. 载体滴度对转导效率的影响

[0756] 基本上如前述章节中所述,通过基于CCE的方法转导T细胞组合物,其中每百万个细胞1.11或3.33 $\mu$ L载体。如图7A所示,当使用每百万个细胞3.33 $\mu$ L载体时,CD3+CAR+细胞的百分比增加。

[0757] 进行了另外的实验,其中使用来自每百万个细胞6 $\mu$ L来自单独载体批次的载体在用于再循环的625G/10FR条件下进行转导。如图7B对于来自五名供体的转导的T细胞所示,该载体滴度导致与在693G下大规模旋转接种对照方法可比较的转导效率,表明在最佳滴度下可以实现与大规模旋转接种对照方法可比较的效率。

#### C. 孵育体积对转导效率的影响

[0758] 基本上如前述章节中所述,在连续逆流离心机系统(CTS Rotea™逆流离心机系统)中转导T细胞,不同之处在于转导体积变化,而载体滴度保持恒定。将T细胞离心,其中每百

万个细胞1.11 $\mu$ L载体,总体积为30mL或60mL(参见表E2)。如图8A所示并如图8B中量化,结果表明,改变转导体积对基于CCE的方法的转导效率没有显著影响。对于从另外的供体产生的转导的T细胞获得了类似的结果,其中测试了25mL、35mL和65mL转导体积。

	载体滴度 ( $\mu$ L/1 x 10 <sup>6</sup> 个细胞)	所需的转导 TNC (x 1E6)	载体体积 ( $\mu$ L)	转导体积 (mL)	相对载体 浓度	转导 VCC (x 1E6/mL)
<b>CCE</b>	1.11	240.00	266.40	60.00	4.44	4.00
<b>CCE</b>	1.11	240.00	266.40	30.00	8.88	8.00

#### D. T细胞数量对转导效率的影响

[0759] 在另一个实验中,基本上如前述章节中所述,在连续逆流离心机系统(CTS Rotea™逆流离心机系统)中转导T细胞,不同之处在于T细胞数量变化,而转导体积和载体滴度保持恒定。如表E3所示,将2亿或6亿个T细胞离心,其中每百万个细胞1.11 $\mu$ L载体,总体积为35mL。作为对照,使1500万个T细胞经受先前描述的按比例缩小的旋转接种方法。含有6亿个T细胞的组合物产生比含有2亿个T细胞的组合物更大且更致密的细胞流化床(数据未显示)。如前述章节所述测定转导效率。结果(如图9A中所示并如图9B中量化)证明,在CCE条件之间,输入组合物中更高数量的T细胞导致更高的转导率。

	载体滴度 ( $\mu$ L/1 x 10 <sup>6</sup> 个细胞)	所需的转导 TNC (x 1E6)	载体体积 ( $\mu$ L)	转导体积 (mL)	相对 载体浓度
<b>旋转接种</b>	1.11	15	16.65	0.76	21.91
<b>CCE</b>	1.11	200	222	35	6.34
<b>CCE</b>	1.11	600	666	35	19.03

#### E. 孵育时间对转导效率的影响

[0760] 基本上如前述章节中所述,在连续逆流离心机系统(CTS Rotea™逆流离心系统)中转导200x 10<sup>6</sup>个T细胞,不同之处在于通过允许输出级分通过连续逆流离心机系统的圆锥形外壳再循环30分钟或90分钟来改变孵育时间。定期从离心室收集上清液样品以监测慢病毒载体随时间的消耗。用样品转导Jurkat细胞,并且基于转导效率评估每个上清液样品中的慢病毒载体的量。还评估了通过连续逆流离心机系统转导的T细胞的转导效率。

[0761] 如图10A所示,与通过起始慢病毒载体材料转导的Jurkat细胞相比,通过在孵育5分钟之后获得的慢病毒载体上清液样品转导的Jurkat细胞的百分比降低了约20%。如图10B所示,在与慢病毒载体颗粒孵育30分钟的T细胞和与颗粒孵育90分钟的T细胞之间,未观察到转导效率的显著差异。不希望受理论束缚,该实验的结果表明,大多数慢病毒载体在孵育的前五分钟内被消耗,使得更长的孵育时间可能不会增加转导效率。

#### F. 离心机系统体积对载体浓度的影响

[0762] 使用实施例1中描述的基于CCE的方法在用于再循环的625G/10FR条件下转导T细胞,不同之处在于通过向流体路径添加孵育袋来增加连续逆流离心机系统的总体积。没有

孵育袋的总系统体积是25mL。通过添加孵育袋将总系统体积增加至39mL或72mL。圆锥形外壳部分的体积是15mL。

[0763] 将总系统体积从39mL增加至72mL不影响转导效率。进一步的分析揭示,在39mL系统中,病毒载体优先集中在圆锥形外壳部分中,其中存在离心场,尽管圆锥形外壳部分仅占总系统体积的15mL(图11,左图)。在72mL系统中,观察到较低优先浓度的病毒载体(图11,右图)。

#### 实施例6通过离心淘洗将珠-细胞组合物去珠

[0764] 如实施例1中所述生成原代人T细胞组合物。将T细胞与用抗CD3和抗CD28抗体包被的约 $200 \times 10^6$ 个顺磁性聚苯乙烯珠一起在37摄氏度下孵育24小时以刺激T细胞。在刺激后,将细胞和珠组合物稀释至 $7.5 \times 10^5$ 个细胞/mL,并在37摄氏度下进一步孵育72小时。在进一步孵育之后,如通过自动化细胞计数器分析的,确定细胞组合物含有具有66%活力的 $1.60 \times 10^6$ 个细胞/mL。然后将细胞-珠组合物放入连续逆流离心机系统(CTS Rotea™逆流离心系统)的圆锥形流体外壳部分中作为“输入”组合物,并经受基于连续逆流淘洗(“CCE”)的离心方法。最初使输入组合物经受1,000g的离心力和30mL/min的流速,以在圆锥形流体外壳中建立细胞-珠组合物的流化床。

[0765] 随后使细胞-珠组合物的流化床经受50mL/min的流速。离心力以100g的负增量从1,000g逐步降低至200g。有间隔地取样以用于分析细胞数量和活力。基于收集的数据,选择50mL/min的流速和600g的离心力用于随后的实验。

[0766] 在随后的实验中,生成T细胞输入组合物以含有约 $200 \times 10^6$ 个珠和具有69.5%活力的 $2.08 \times 10^6$ 个细胞/mL。在最初经受1,000g的离心力和30mL/min的流速以建立细胞-珠组合物的流化床之后,使输入组合物经受600g的离心力和50mL/min的流速,产生T细胞的“输出”级分,其在流体路径中通过连续逆流离心机系统再循环,直至其被重新引导至最终收集室作为“产物”级分。

[0767] 使用基于荧光显微术的Cytation™5细胞成像系统测定输入组合物以及产物和废物级分中的珠数量。最终产物级分含有220个珠/mL,代表存在于输入组合物中的约0.01%的珠颗粒。所收集的废物级分含有40,930个珠/mL。输出级分中的细胞和珠的数量示于表E4中。

级分	计算的总珠	珠/mL	珠产量 (基于输入组合物中的 $200 \times 10^6$ 个珠)
输入	$3.66 \times 10^6$	31,618	N/A
产物 <sub>1</sub>	$2.87 \times 10^4$	220	0.01%
产物 <sub>2</sub>	$3.64 \times 10^4$	343	0.02%
废物	$2.61 \times 10^6$	40,930	1.31%

产物<sub>1</sub>是在使整个输入组合物通过室之后的第一淘洗级分。

产物<sub>2</sub>是在用缓冲液冲洗室之后的第二淘洗级分。

实施例7用于在连续逆流离心机系统中转导的另外的方法

[0768] 测试了用于在连续逆流离心机系统中转导细胞的另外的方法 (CTS Rotea™ 逆流离心系统) 对转导效率的影响。除了下文所述的修改之外,另外的方法在其他方面如实施例1中所述。

[0769] 在测试的另一种方法中,在建立细胞和载体颗粒的流化床之后,将T细胞和慢病毒载体颗粒孵育一分钟,然后立即收集转导的产物级分而不进行再循环。相对于用实施例1中描述的625G/10FR CCE方法实现的转导效率,该方法导致转导效率降低。

[0770] 在测试的另一种方法中,在建立细胞和载体颗粒的流化床之后,将T细胞和慢病毒载体颗粒在625G/10FR条件下孵育30分钟。然而,在孵育期间,流体路径中的流动被径向向外引导通过圆锥形外壳部分的尖端,而不是径向向内逆流通过圆锥形外壳部分的中心。该方法导致与用实施例1中描述的625G/10FR CCE方法实现的转导效率可比较的转导效率。

[0771] 在测试的另一种方法中,在2500G/40FR下建立细胞和载体颗粒的流化床,并在625G/10FR下孵育一分钟,然后反向流动(仍然在625G/10FR下),以迫使来自流化床的细胞和载体颗粒通过窄套管,沿着圆锥形外壳部分的长度从圆锥形外壳部分的尖端延伸到中心。经一分钟时间从套管收集细胞和病毒颗粒,然后用未收集的细胞和载体颗粒重新建立细胞和载体颗粒的流化床。在30分钟孵育中重复该程序。该方法导致与用实施例1中描述的625G/10FR CCE方法实现的转导效率可比较的转导效率。

[0772] 总之,这些结果证实,可以进行其他用于在圆锥形逆流离心机系统中转导的方法,包括非逆流方法或涉及从连续逆流离心机系统定期收获细胞的方法。

[0773] 本发明并不旨在限于具体公开的实施方案的范围,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。可以在不偏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。

序列

SEQ ID NO	序列	描述
1	ESKYGPPCPPCP	间隔子 (IgG4 铰链) (aa)
2	gaatctaagtagcgaccgcccctgcccccttgcct	间隔子 (IgG4 铰链) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK	铰链-CH3 间隔子
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLGLGK	铰链-CH2-CH3 间隔子
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEE KKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWRD KATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGS QSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQA PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREV NTSGFAPARPPPQGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSH EDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-铰链-Fc
6	LEGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIK HFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEKITG FLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSL GLRSLKEISDGDVIISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREVD KCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQ AHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLHPNC TYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMVGAALLLVVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的氨基酸 153-179)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747 的氨基酸 114-179)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747 的氨基酸 180-220)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL 变为 GG)

12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 的 氨基酸 214- 255)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3 $\zeta$
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3 $\zeta$
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3 $\zeta$
16	RKVCNGIGIGEFKDSLINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGD SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII RGRTKQHGGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCY ANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGC WGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCH PECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPYNGPKIPSIA TGMVGAALLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLTCDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) <sub>5</sub> -P-, 其中 P 是脯氨酸, G 是甘氨酸并且 S 是丝氨酸	接头
23	GSADDAKKDAAKKGKS	接头
24	atgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattctctgatccca	GMCSFR $\alpha$ 链 信号序列
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR $\alpha$ 链 信号序列
26	MALPVTALLPLALLHA	CD8 $\alpha$ 信号肽

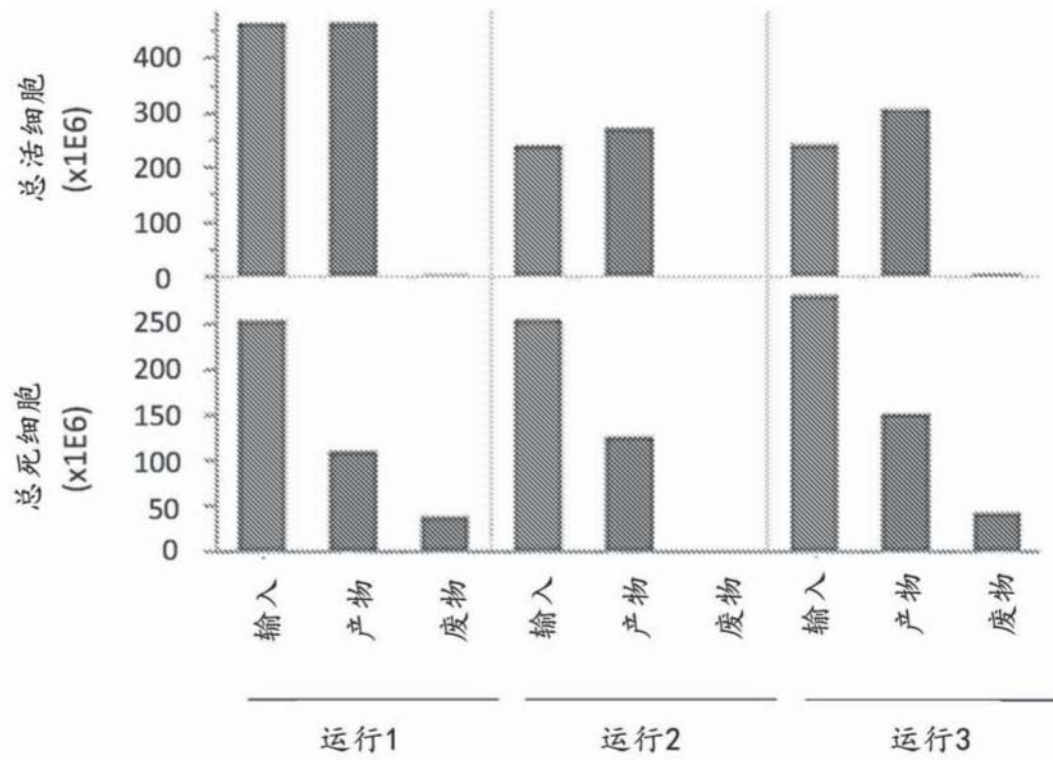


图1A

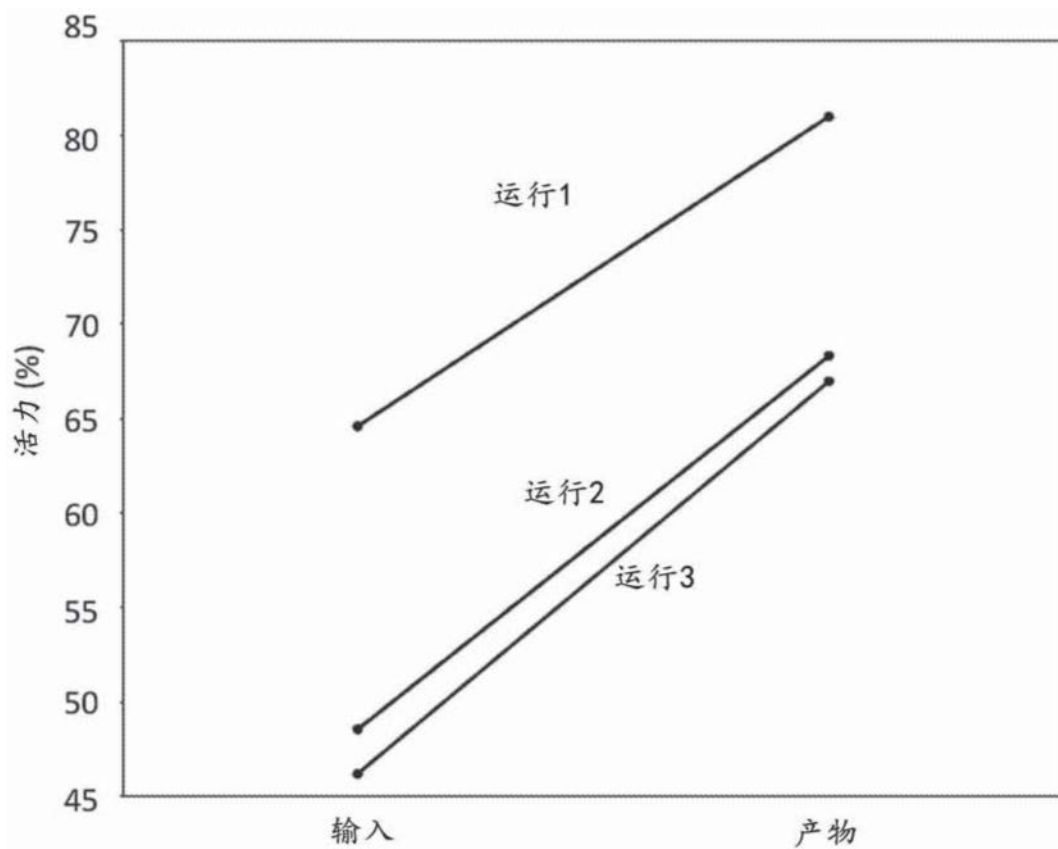


图1B

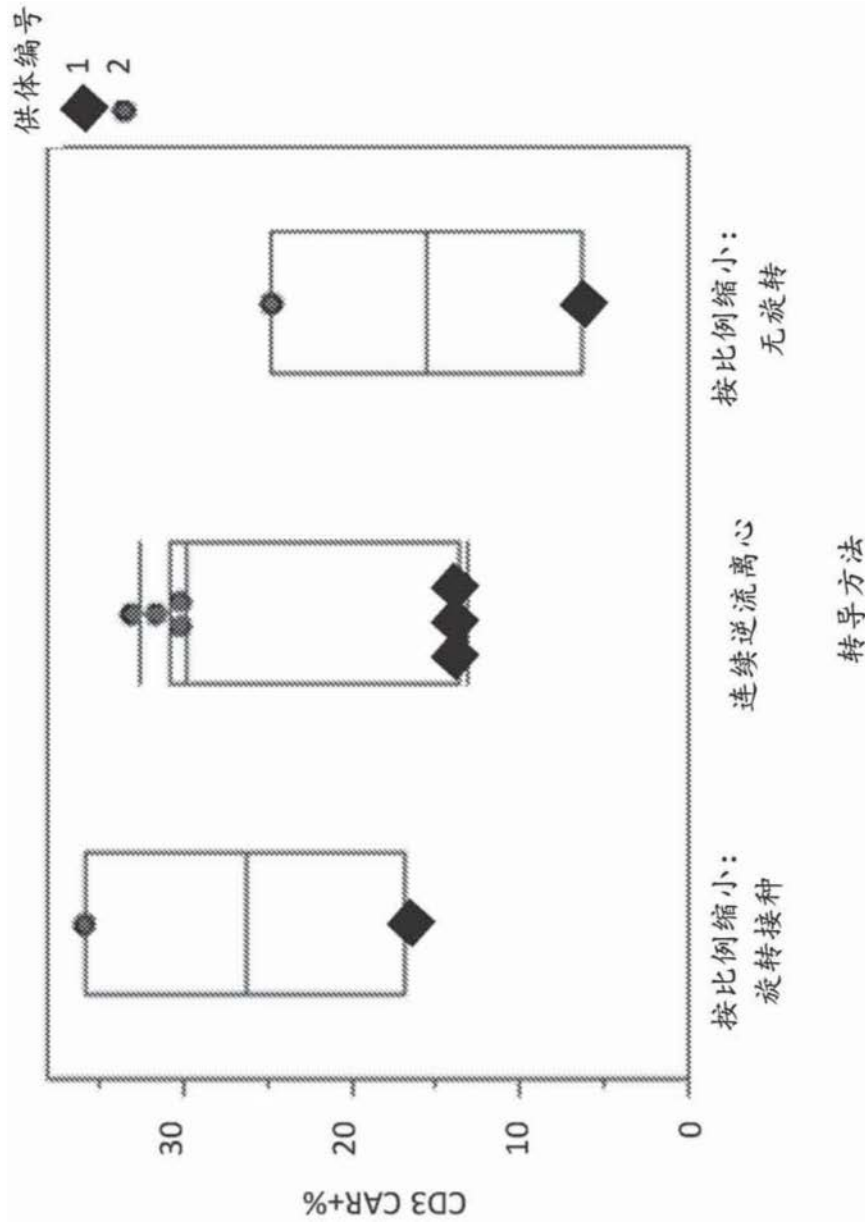


图2A

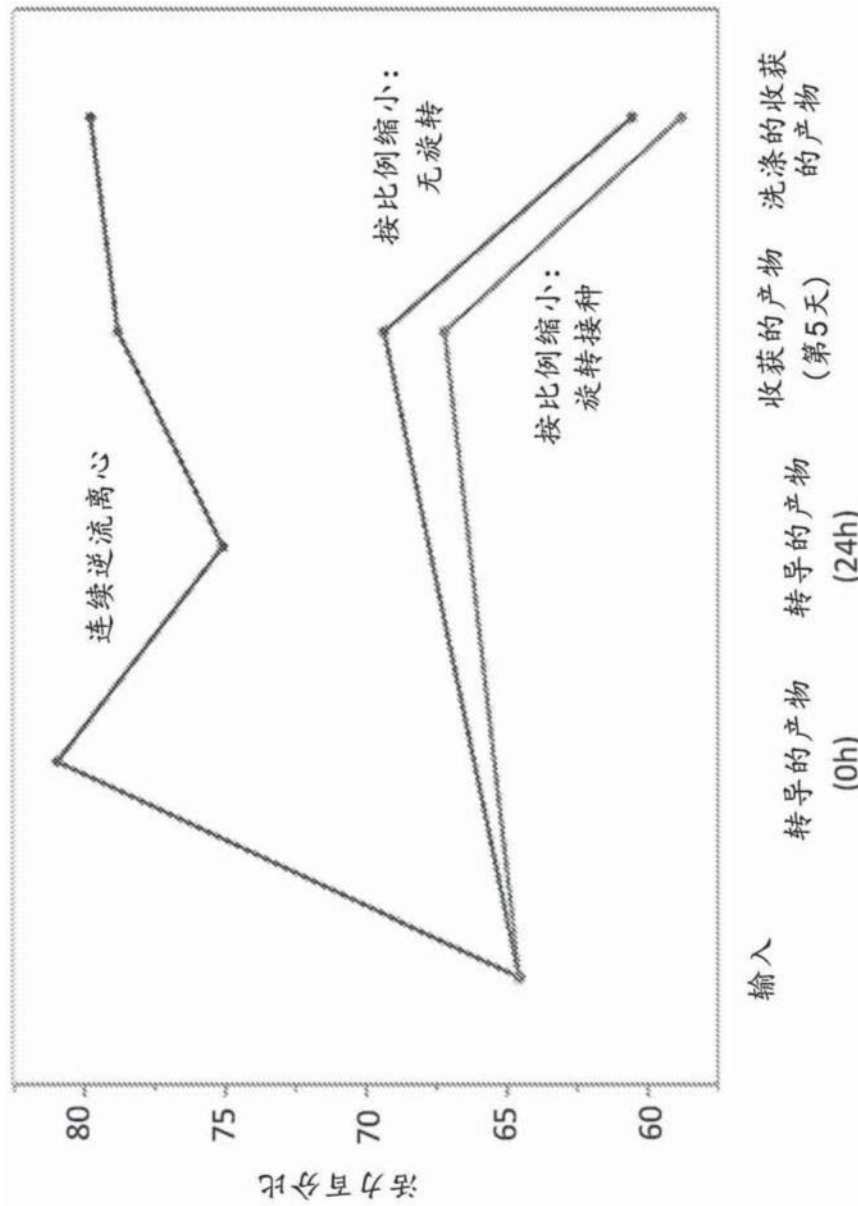


图2B

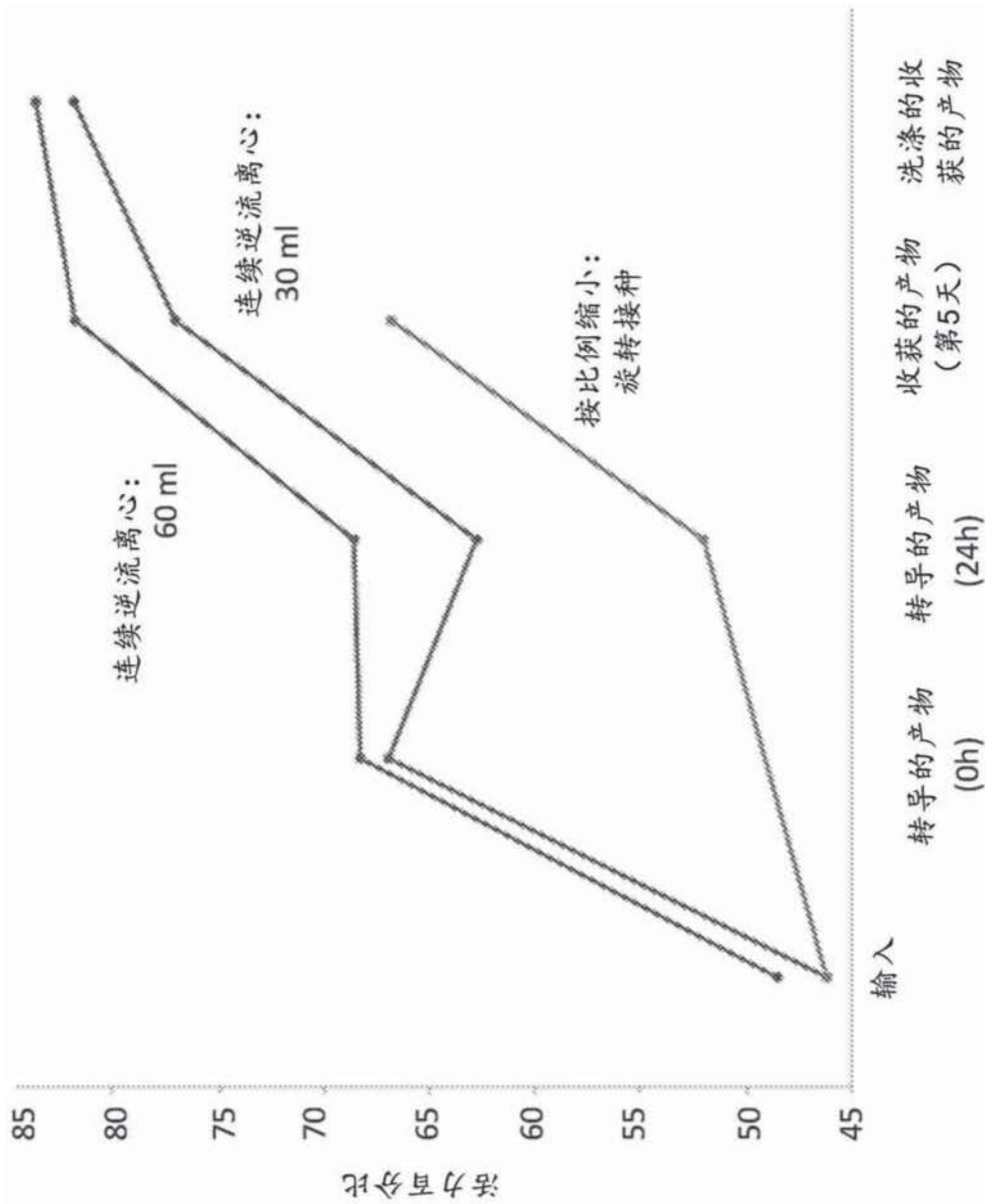


图3

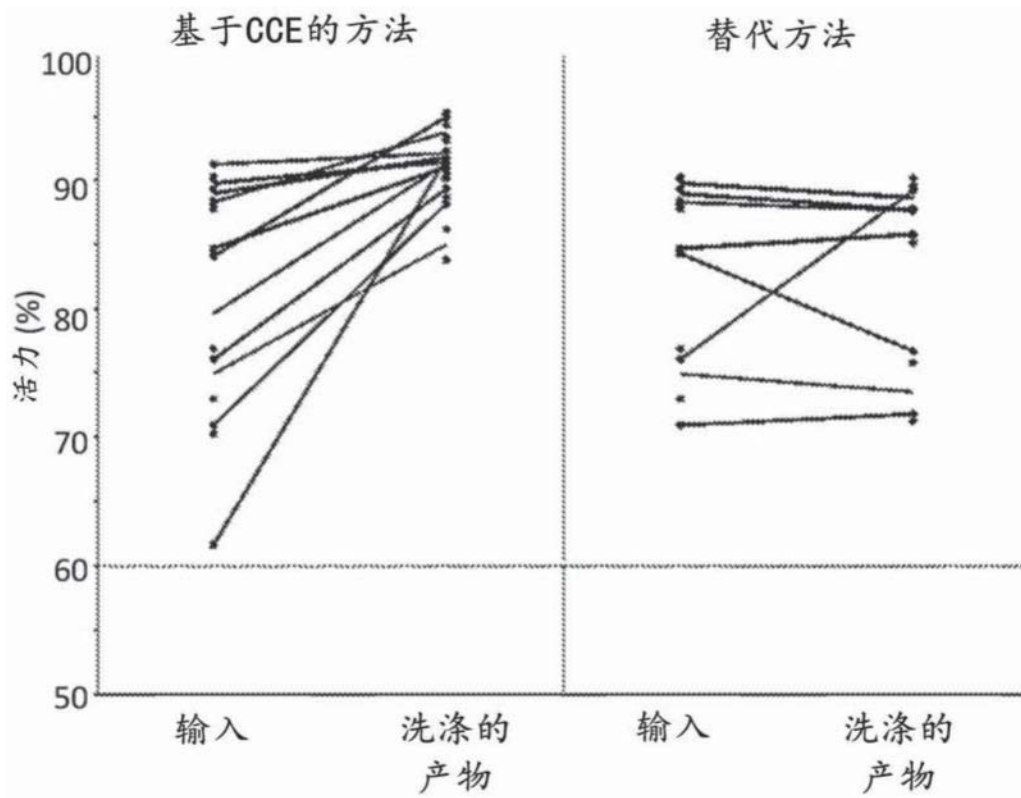


图4A

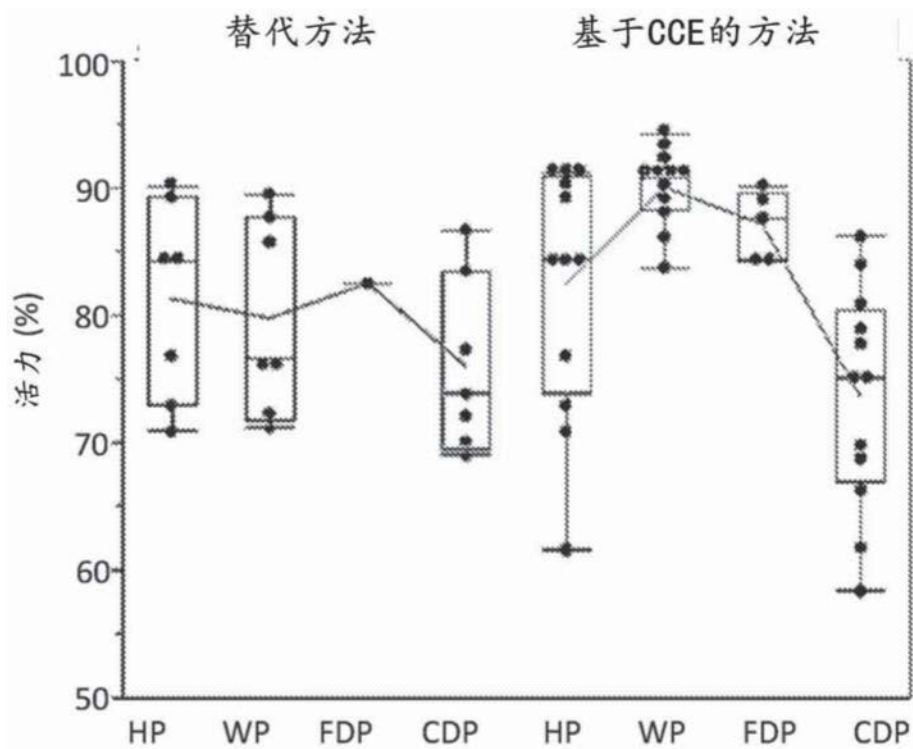


图4B

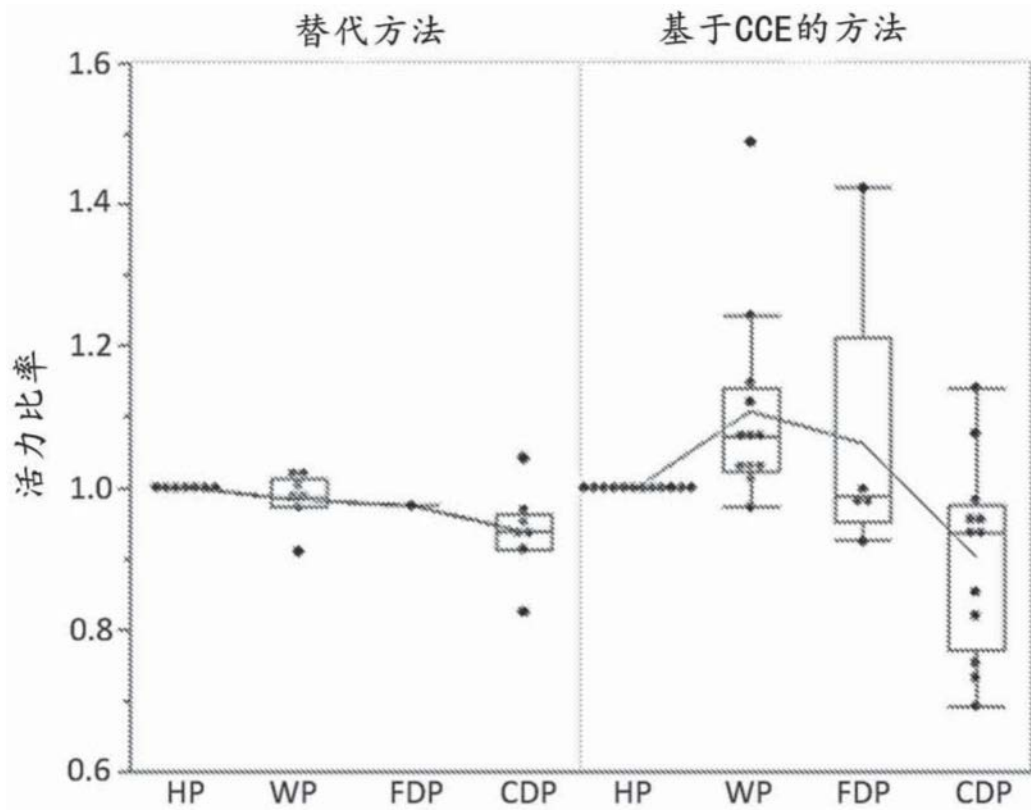


图4C

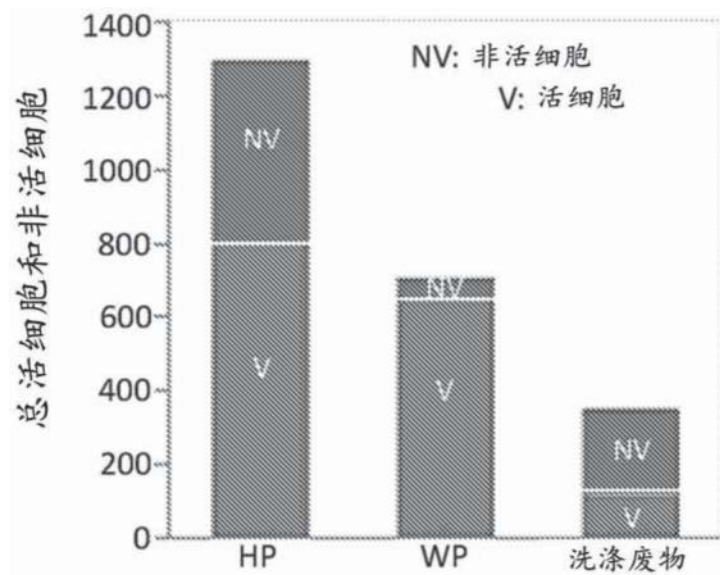


图4D

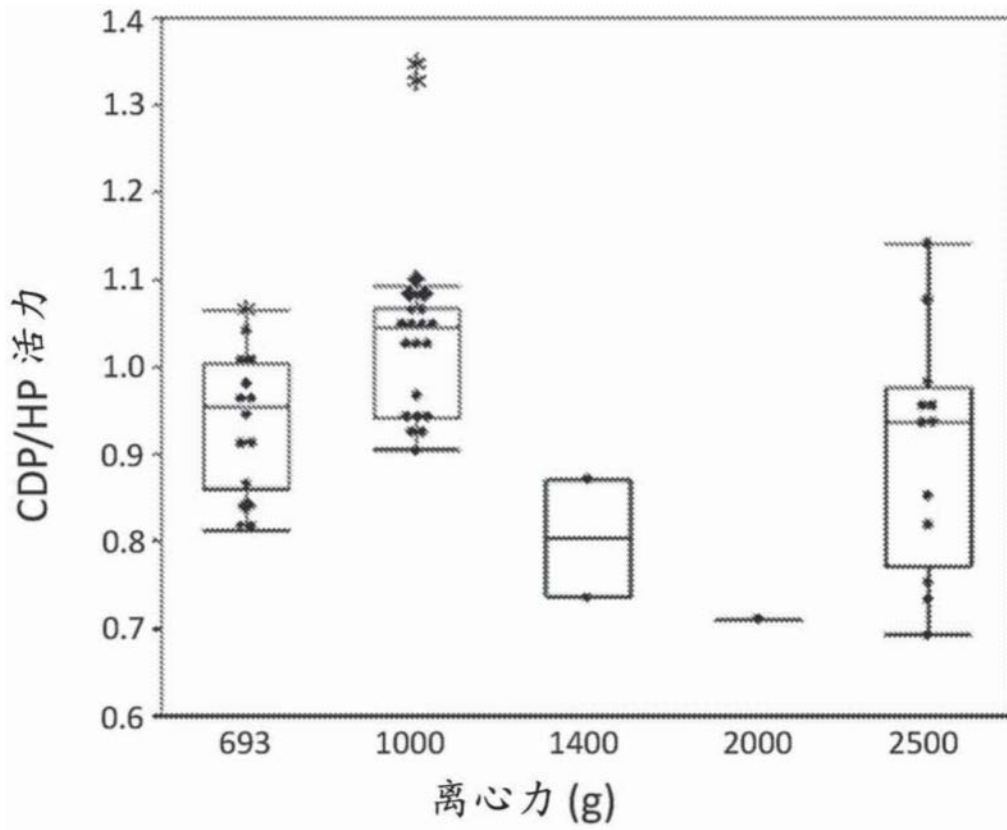


图4E

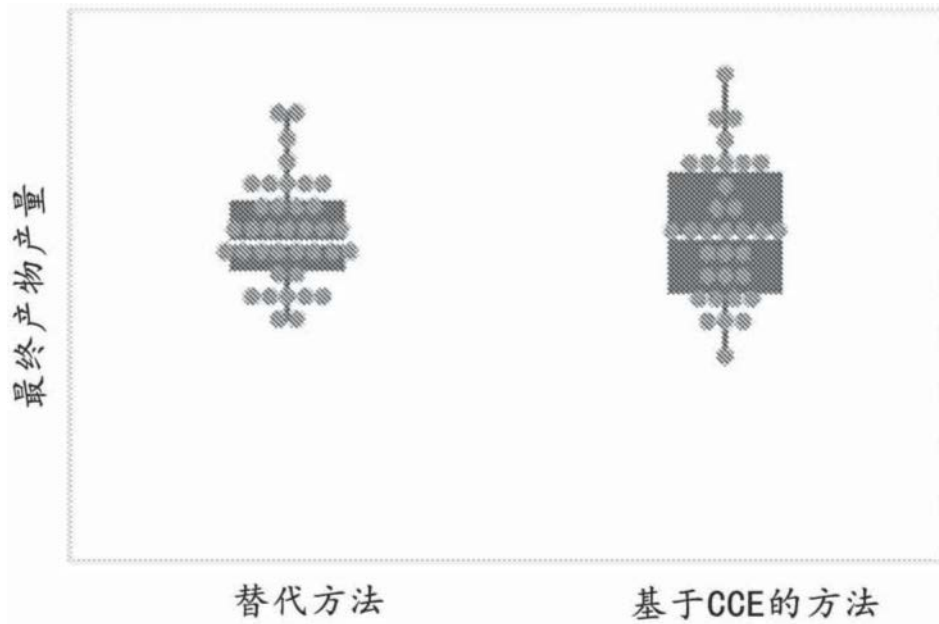


图4F

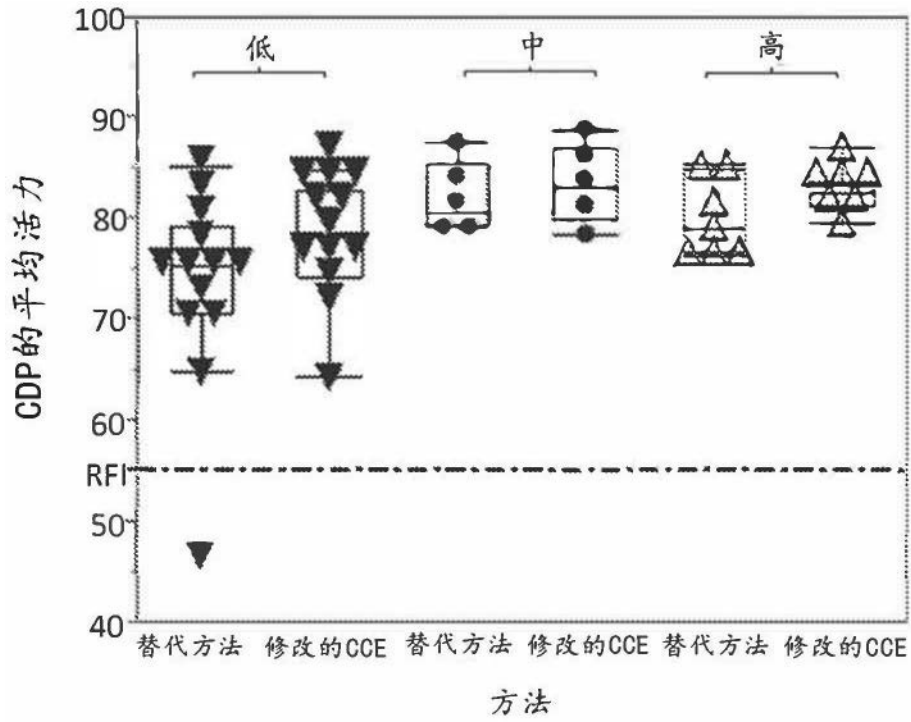


图4G

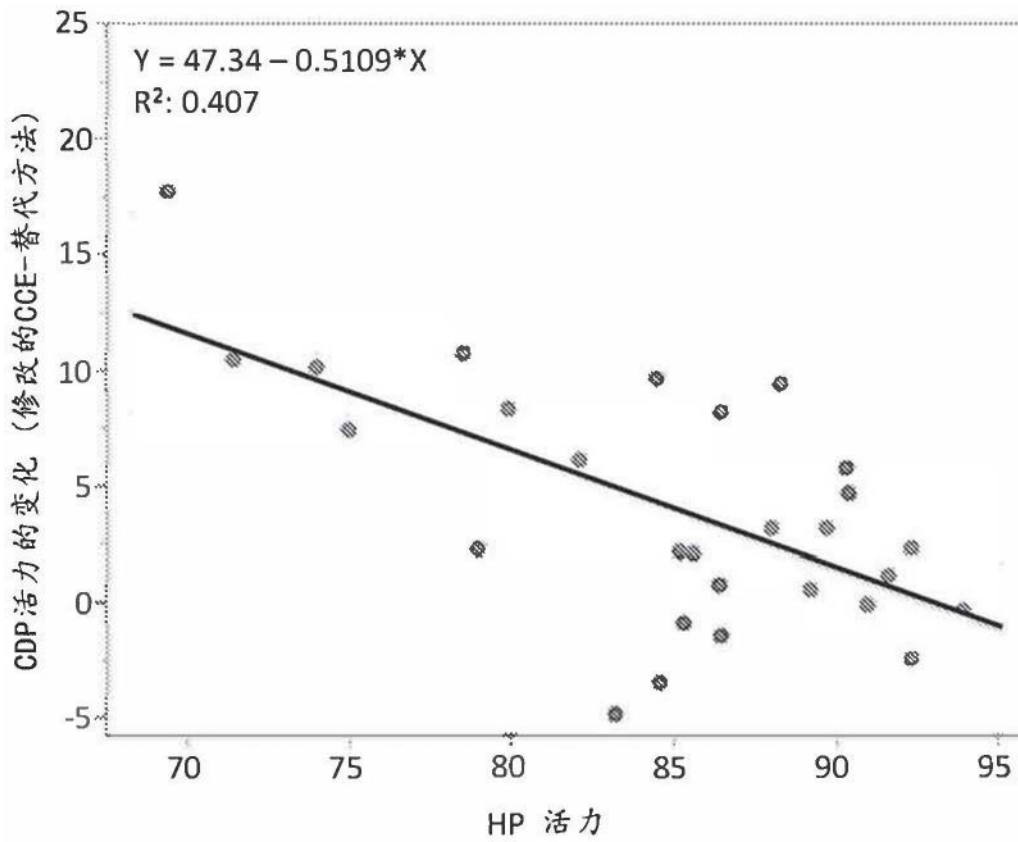


图4H

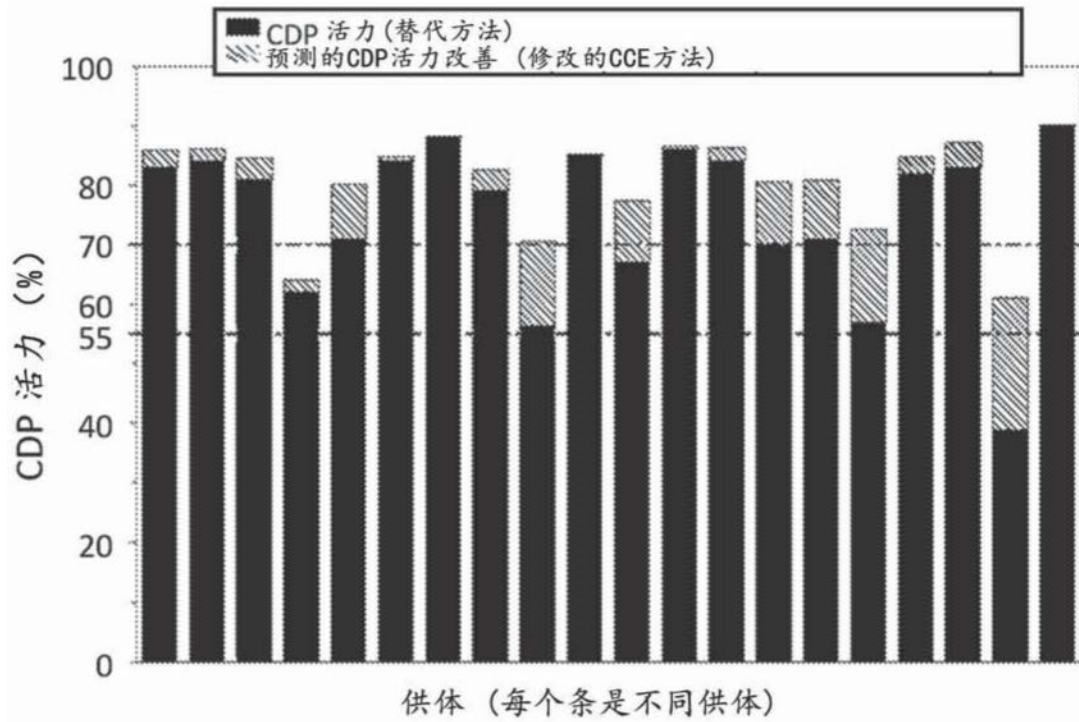


图4I

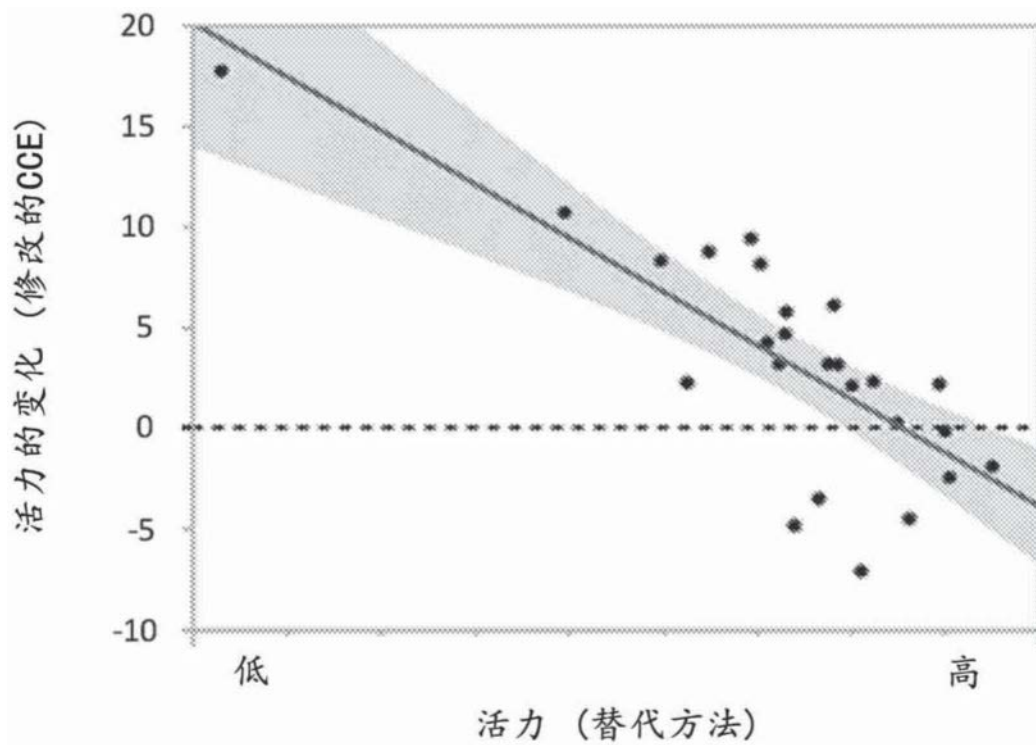


图4J

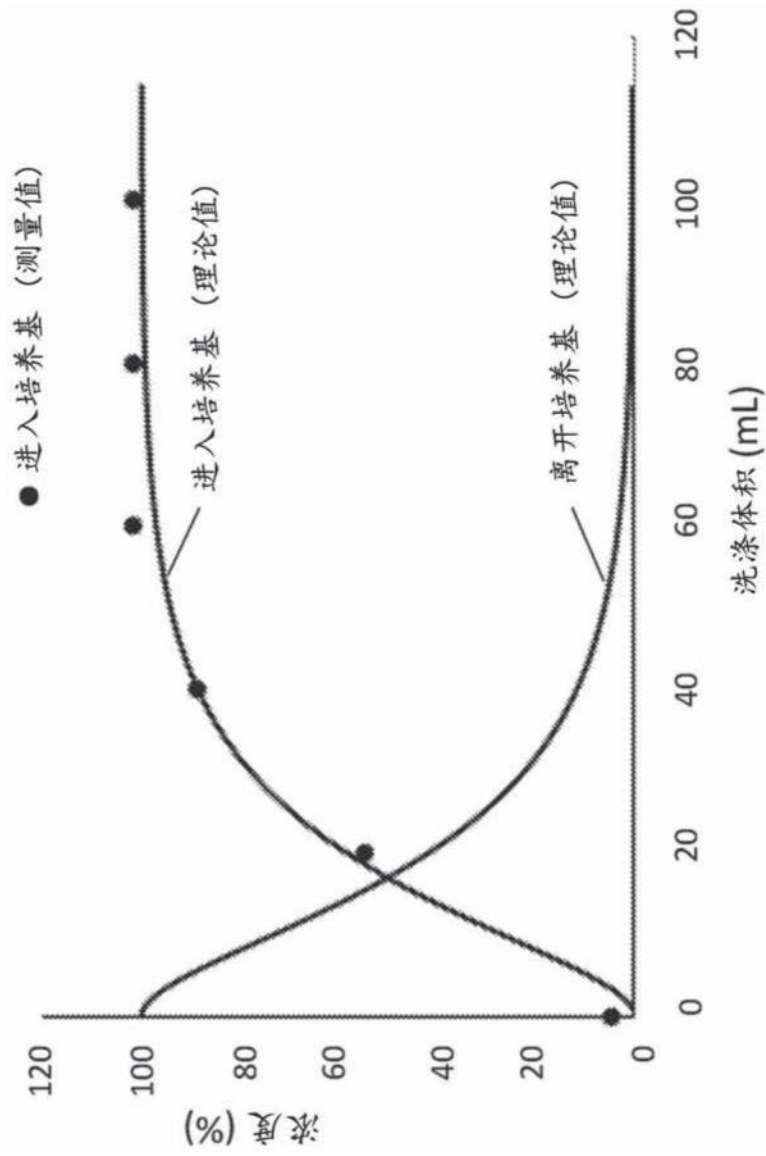


图4K

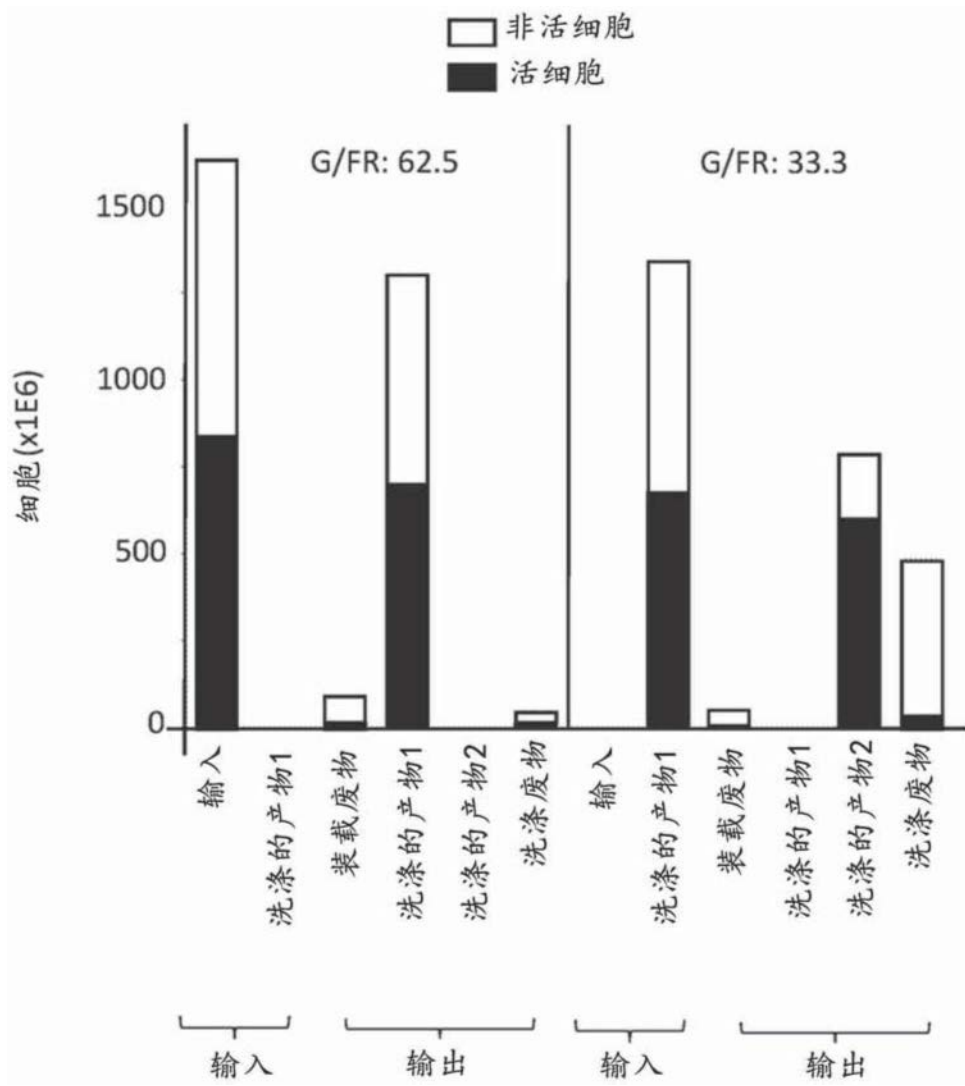


图5A

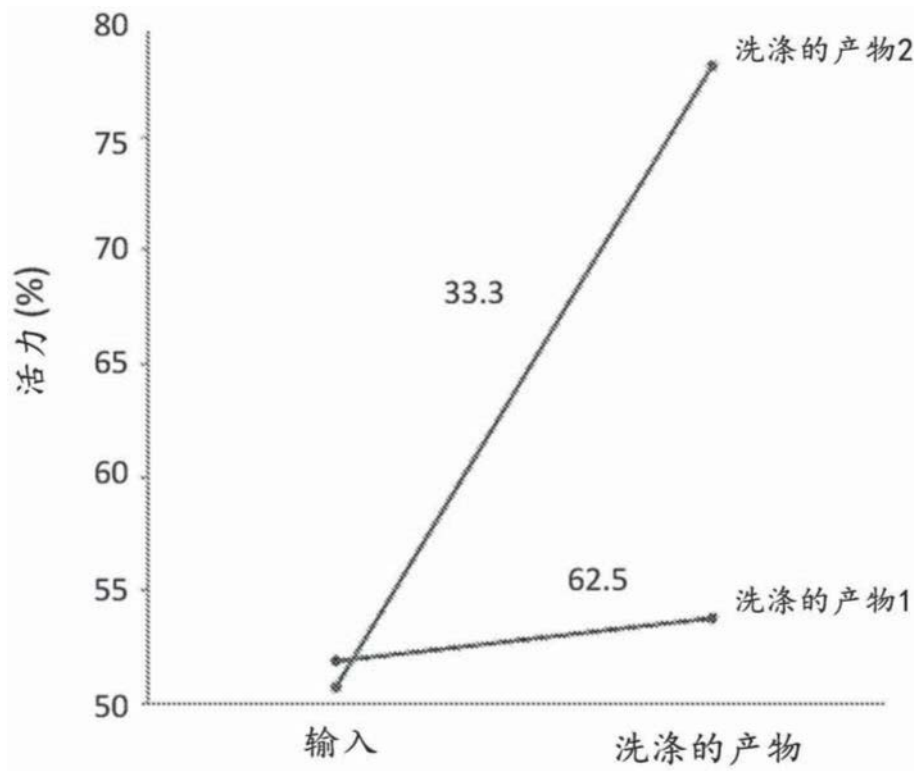


图5B

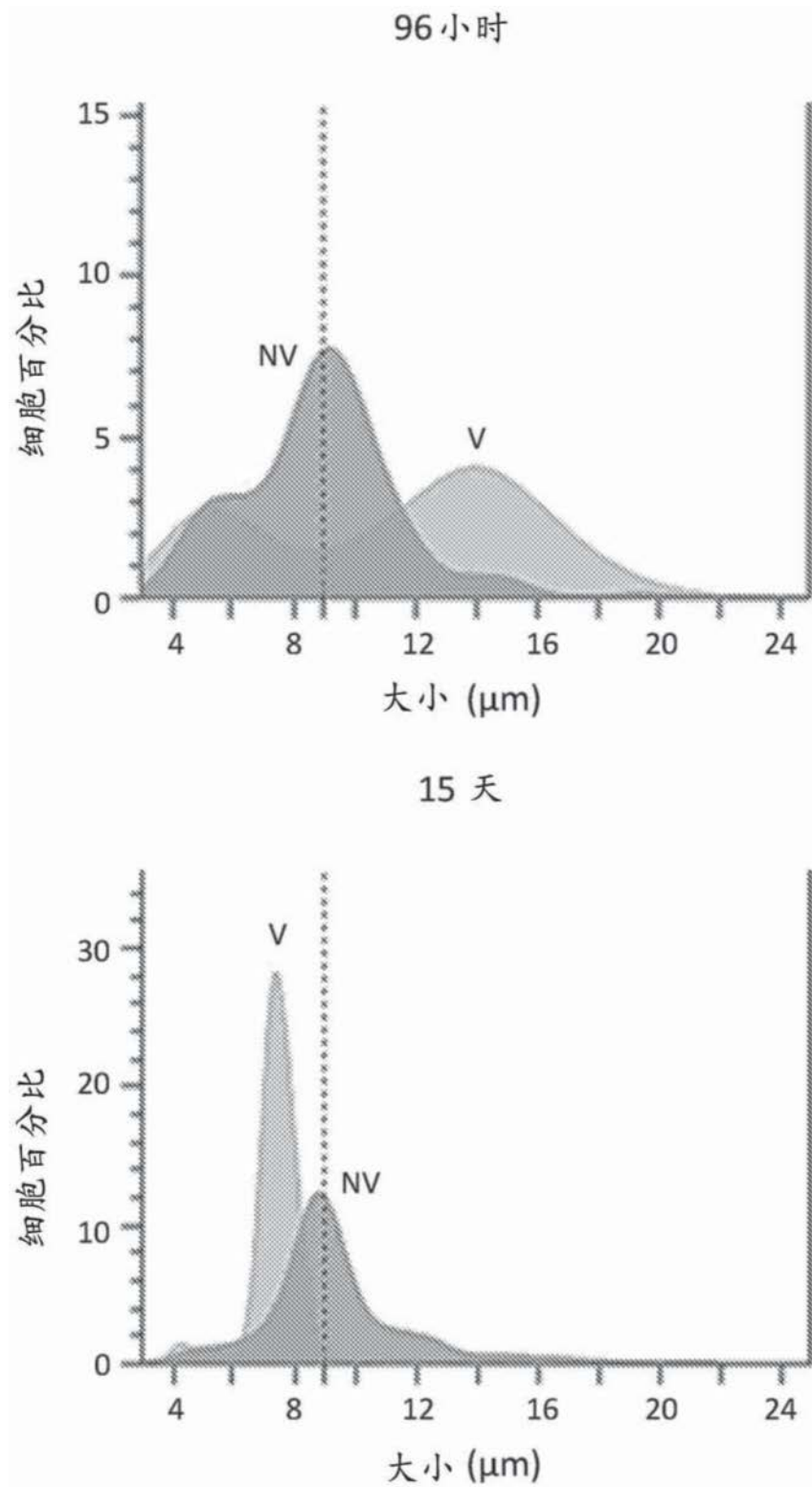


图5C

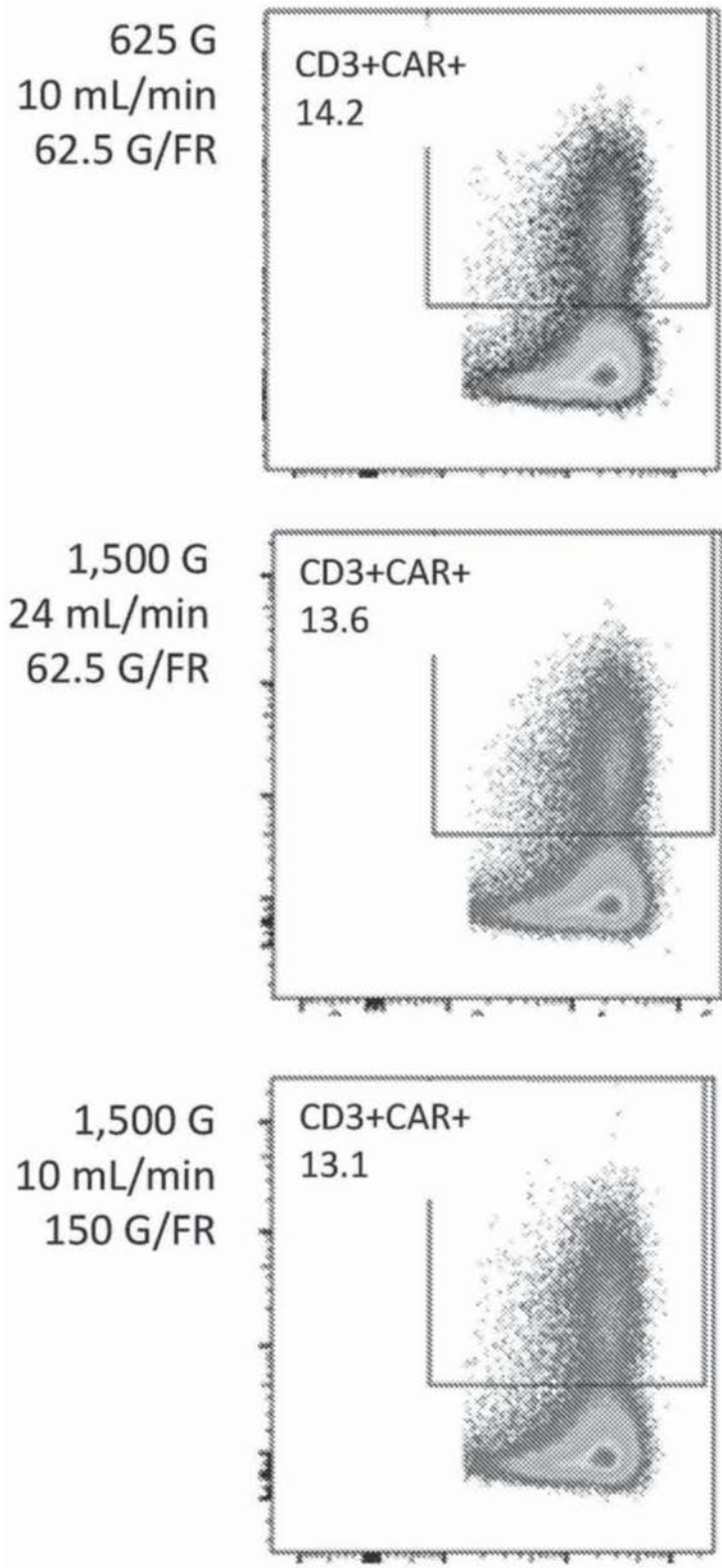


图6A

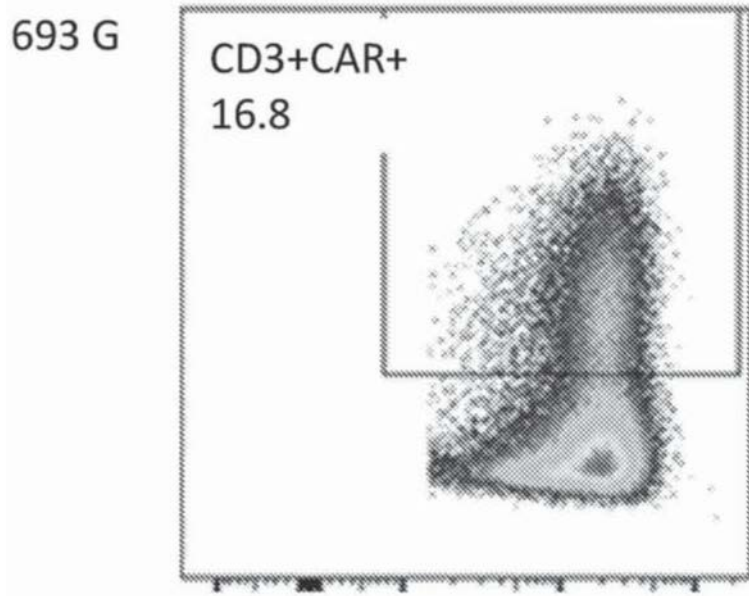


图6B

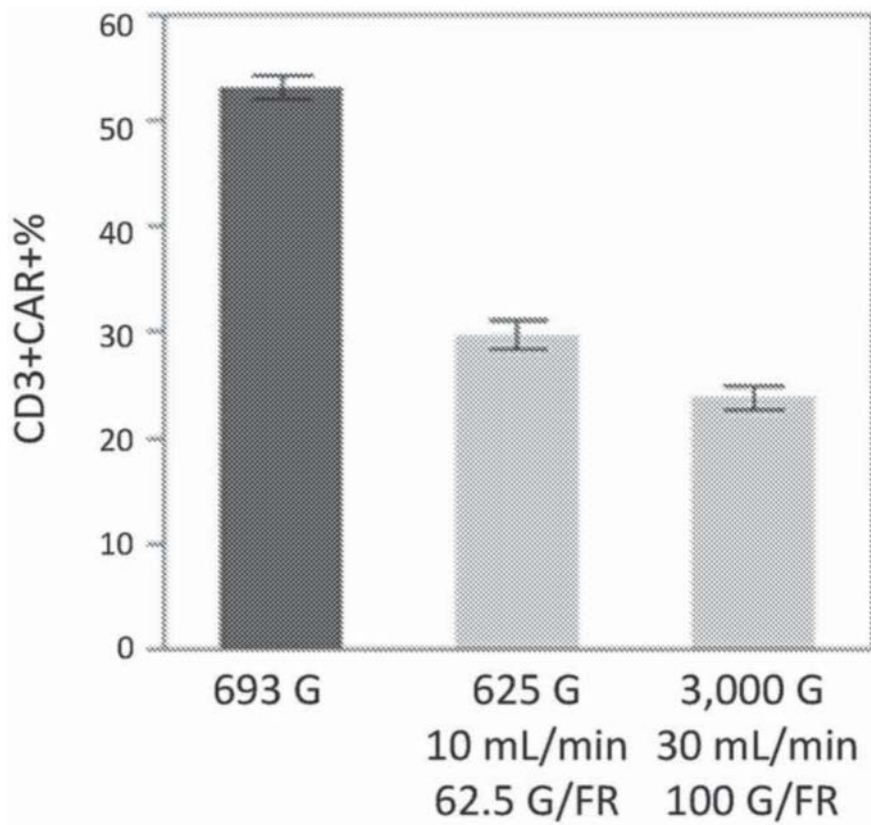


图6C

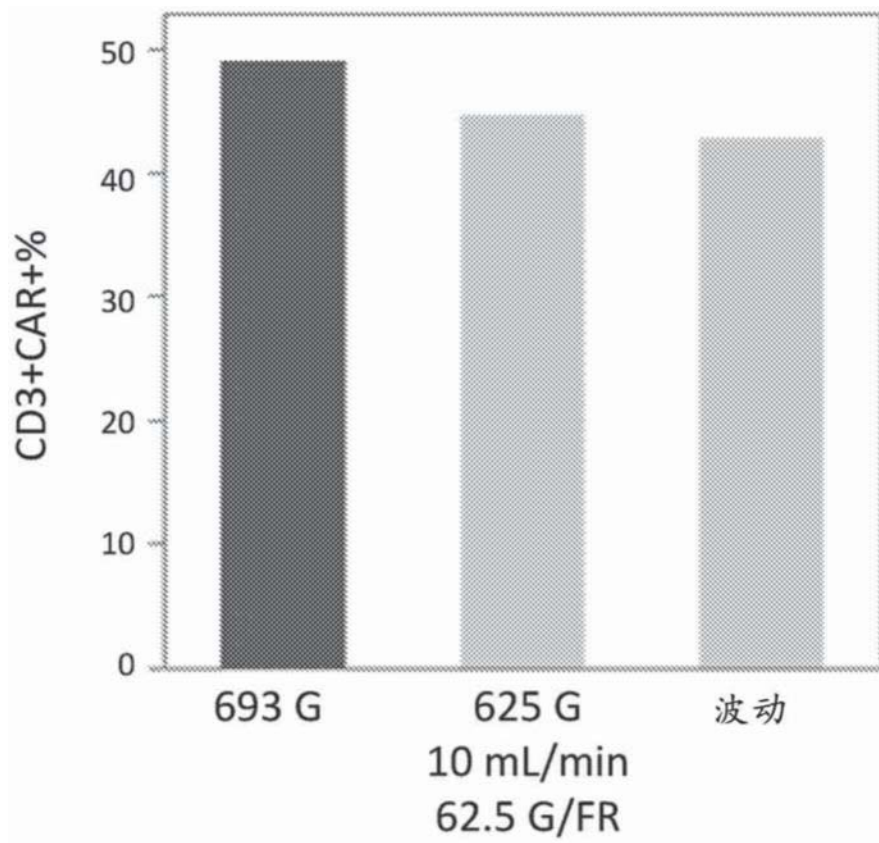


图6D

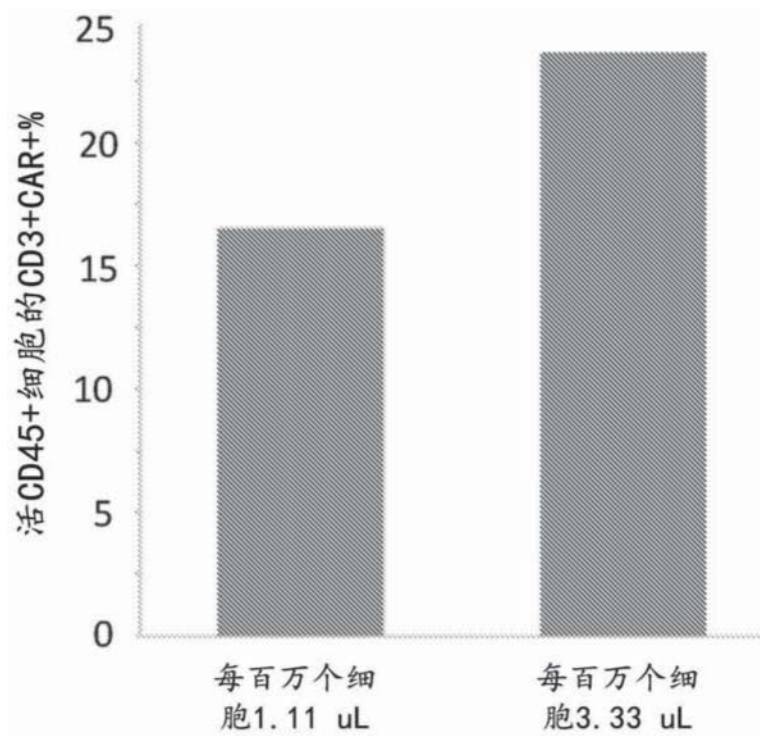


图7A

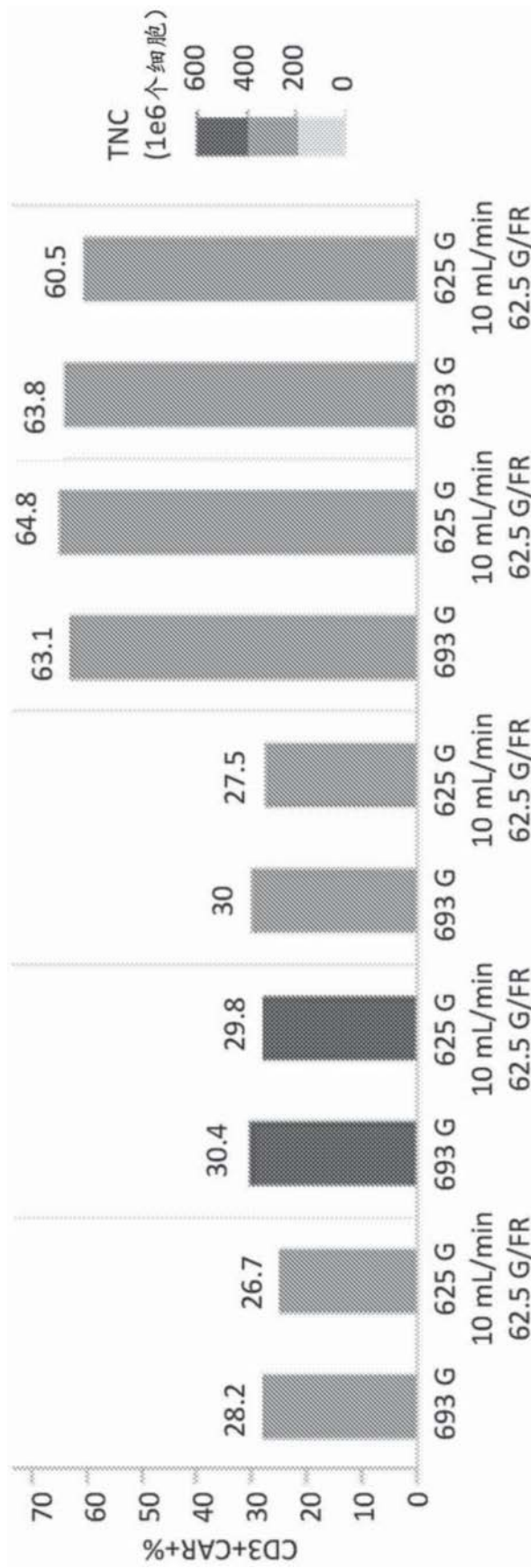


图7B

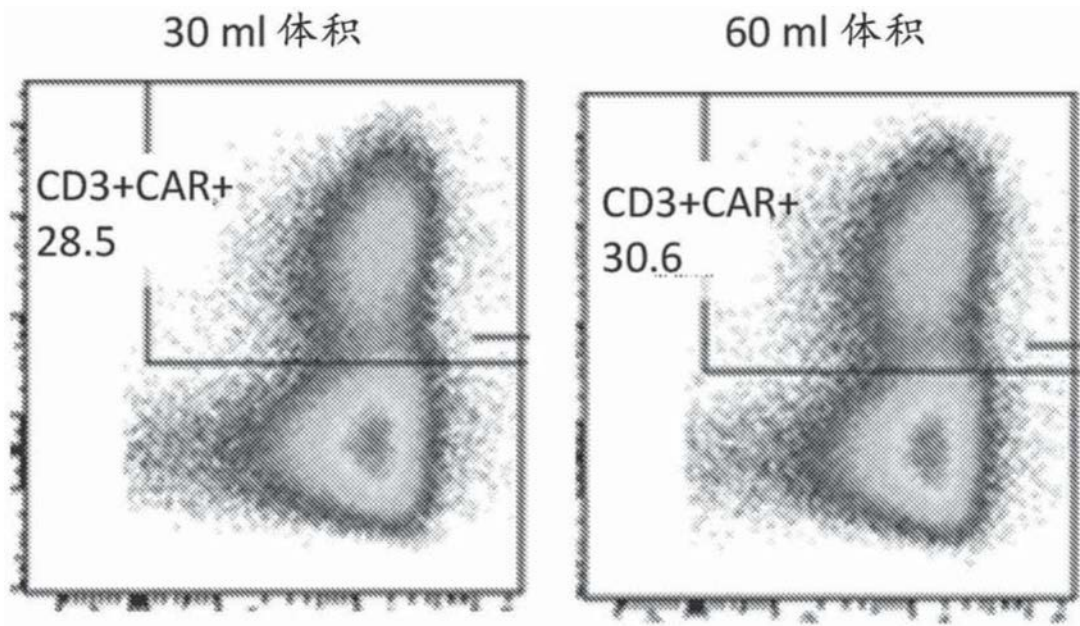


图8A

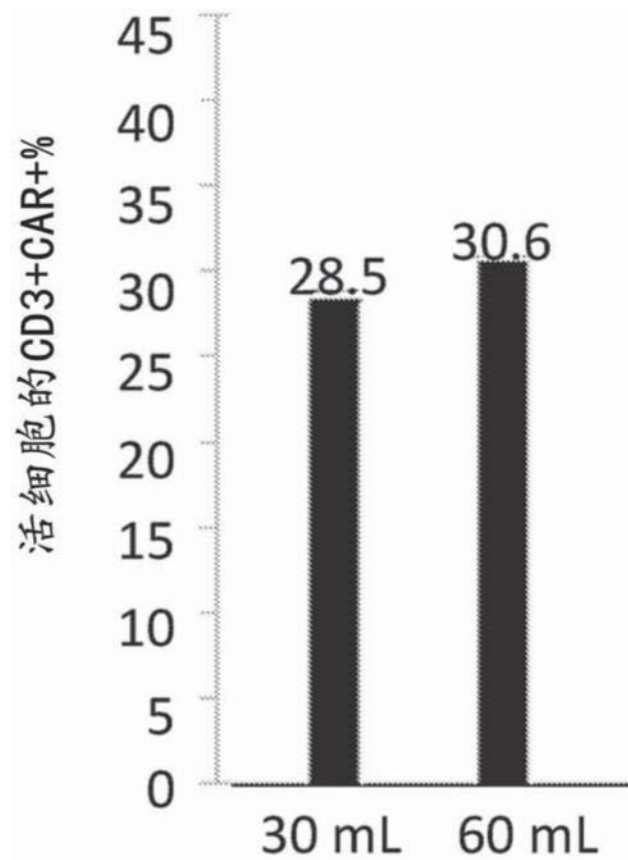


图8B

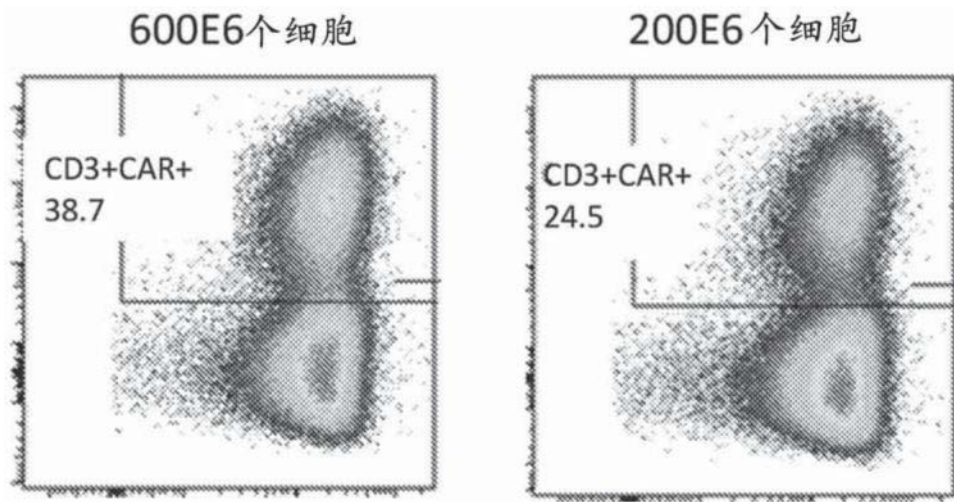


图9A

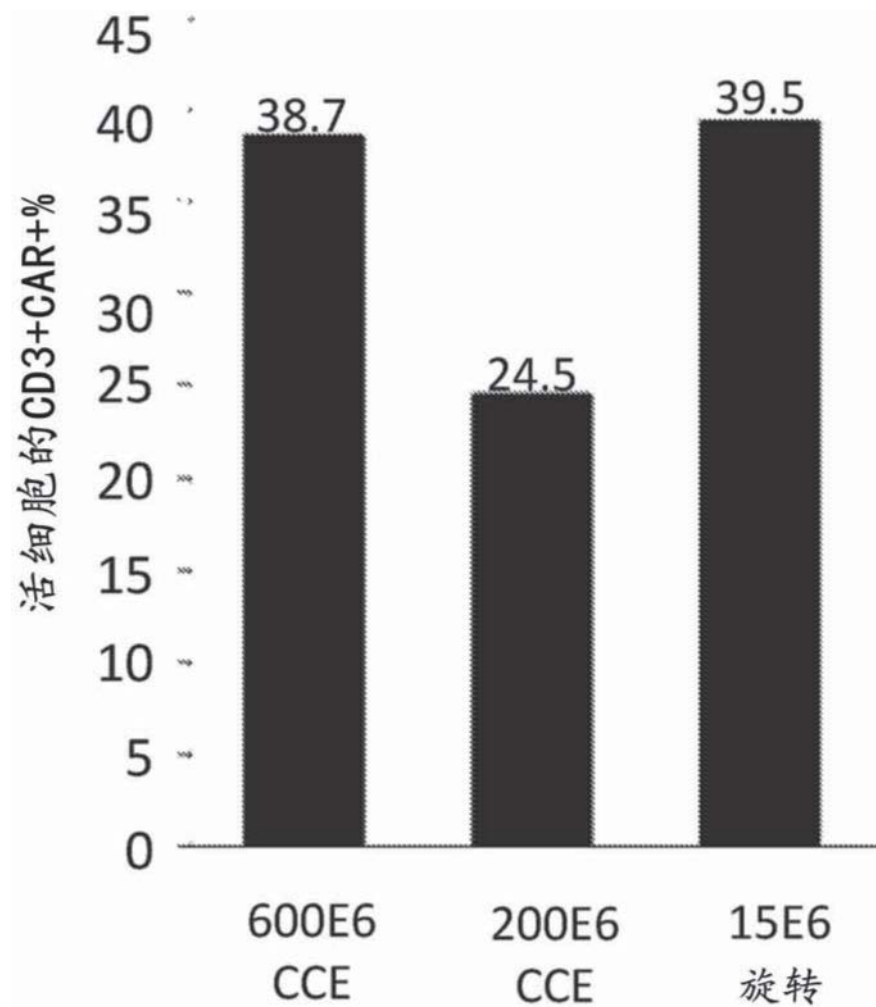


图9B

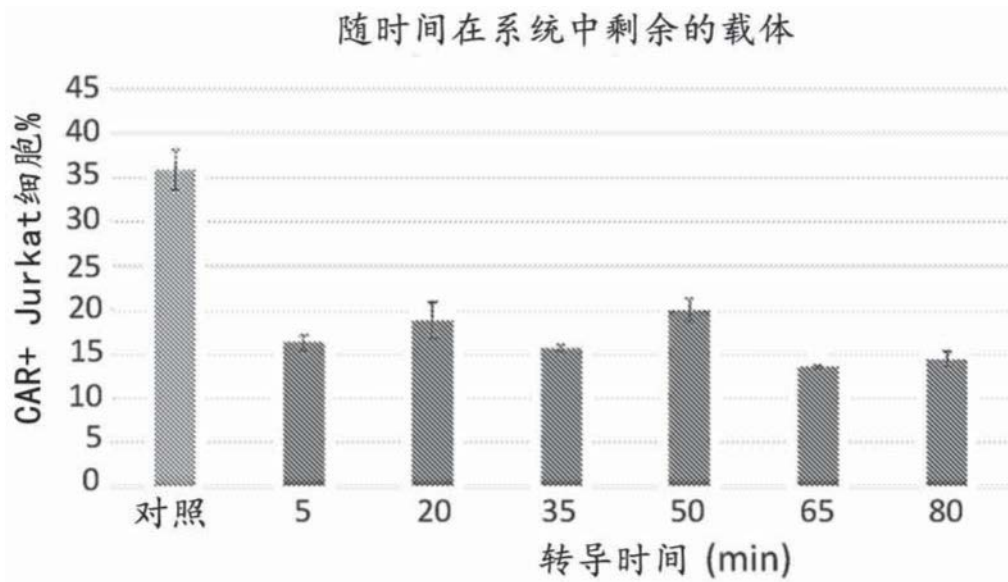


图10A

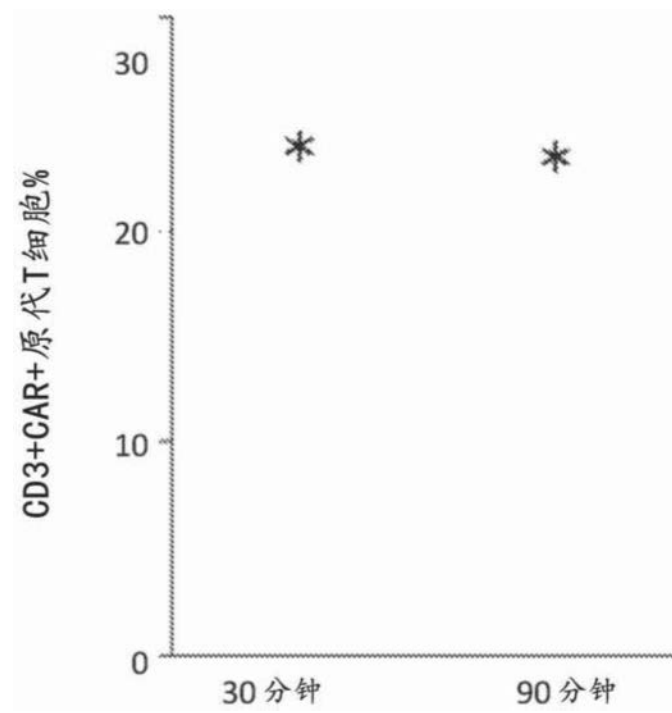


图10B

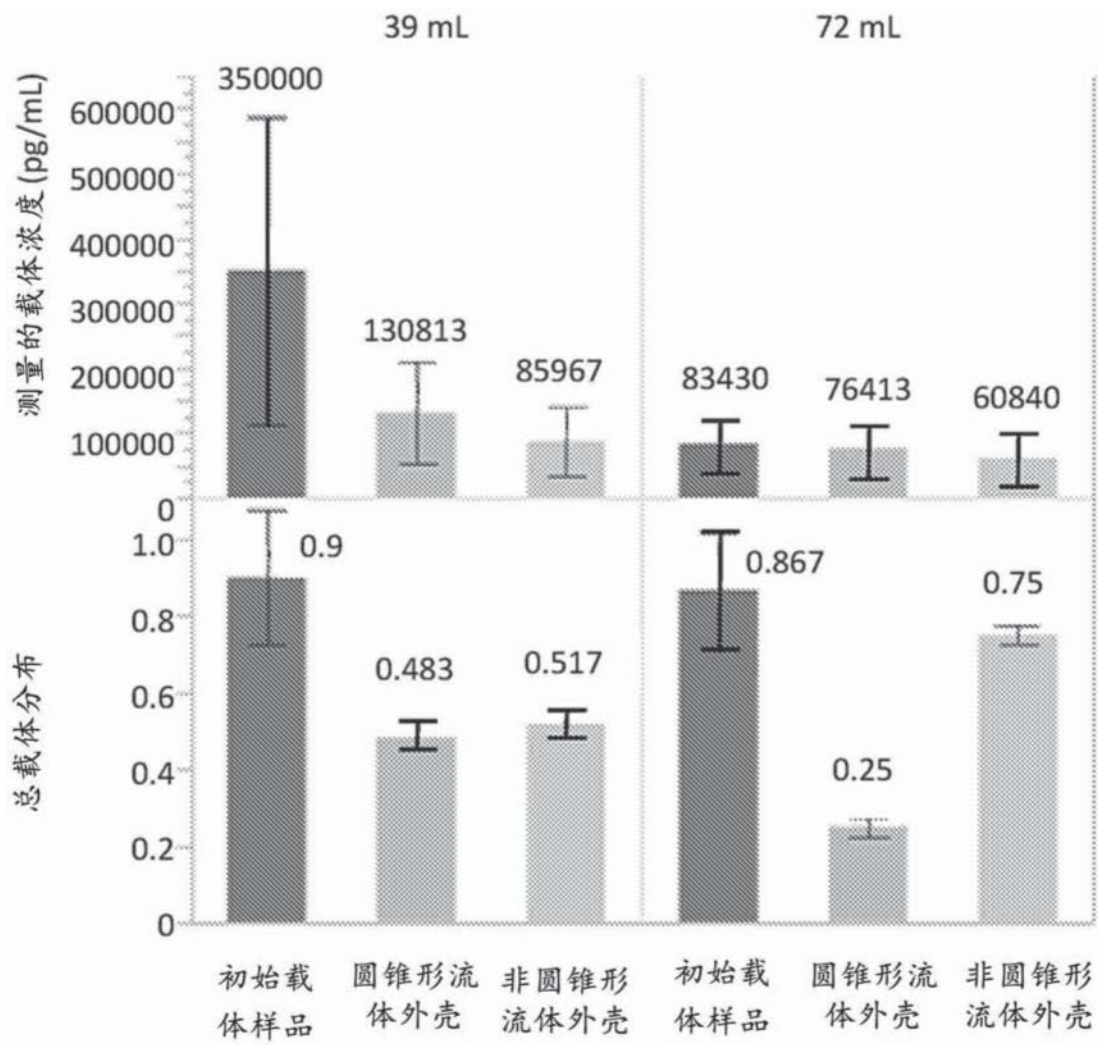


图11