(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202091686 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.30

(22) Дата подачи заявки
2015.12.07

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОБЛАСТОЗА С ПОМОЩЬЮ ИММУННЫХ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К BCMA

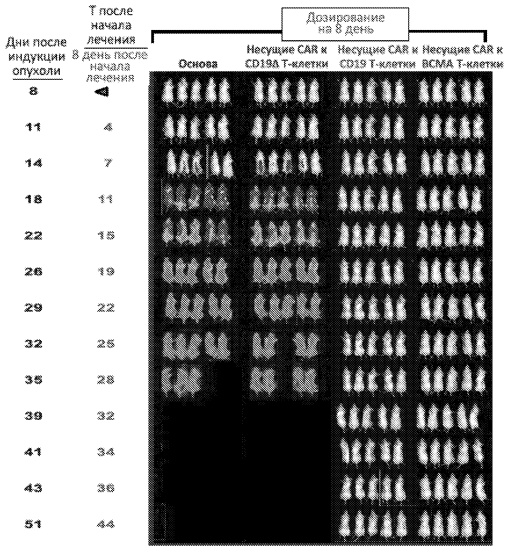
(31) **62/091,419; 62/200,505**
(32) **2014.12.12; 2015.08.03**
(33) **US**
(62) **201791310; 2015.12.07**

(71) Заявитель:
БЛУБЁРД БИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Морган Ричард, Фридман Кевин (US)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), которые специфически связываются с BCMA, полинуклеотиды, кодирующие их, векторы для экспрессии таких CAR, иммунные эффекторные клетки и композиции для адоптивной клеточной терапии, а также способ получения указанных клеток.



202091686 A2

202091686 A2

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОБЛАСТОЗА С ПОМОЩЬЮ ИММУННЫХ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩИХ ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К BCMA

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно Своду федеральных нормативных документов США, раздел 35, §119(e) на основании предварительной заявки на патент США № 62/200505, поданной 3 августа 2015 г., и предварительной заявки на патент США № 62/091419, поданной 12 декабря 2014 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Связанный с настоящей заявкой перечень последовательностей представлен в формате текстового файла вместо бумажной копии, и включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанный текстовый файл, содержащий перечень последовательностей, имеет название: BLBD_043_02WO_ST25.txt. Размер указанного текстового файла составляет 27 KB, он был создан 4 декабря 2015 г. и подан в электронной форме через систему EFS-Web одновременно с подачей настоящего описания.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники

Настоящее изобретение относится к усовершенствованным композициям и способам лечения связанных с B-клетками состояний. Более конкретно, настоящее изобретение относится к усовершенствованным химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающие фрагменты, иммунным эффекторным клеткам, генетически модифицированным для экспрессии указанных CAR, и применению указанных композиций для эффективного лечения связанных с B-клетками состояний.

Описание предыдущего уровня техники

В-лимфоциты, *т. е.* В-клетки, вовлечены в ряд значимых заболеваний. Аномальная физиология В-клеток может также приводить к развитию аутоиммунных заболеваний, в том числе, но не ограничиваясь указанным, системной красной волчанки (СКВ). Злокачественная трансформация В-клеток приводит к развитию раковым заболеваний, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, лимфом, например, множественной миеломы и неходжкинской лимфомы.

Значительное большинство пациентов, страдающих В-клеточными злокачественными новообразованиями, в том числе неходжкинской лимфомой (НХЛ) и множественной миеломой (ММ), вносят существенный вклад в уровень смертности от раковых заболеваний. Отклик на различные формы лечения при В-клеточных злокачественных новообразованиях неоднозначен. Применение традиционных способов лечения В-клеточных злокачественных новообразований, в том числе химиотерапии и радиационной терапии, ограничено токсическими побочными эффектами. Иммунотерапия терапевтическими антителами против CD19, против CD20, против CD22, против CD23, против CD52, против CD80 и против HLA-DR имела ограниченный успех, отчасти из-за неудовлетворительных фармакокинетических профилей, быстрой элиминации антител протеазами сыворотки и фильтрации в клубочках, ограниченности проникновения в участок локализации опухоли и уровней экспрессии целевого антигена на раковых клетках. Попытки применения генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), также имели ограниченный успех. Кроме того, терапевтическая эффективность определенного антигенсвязывающего домена, используемого в CAR, непредсказуема: в случае слишком сильного связывания указанного антигенсвязывающего домена несущие CAR Т-клетки индуцируют массовое высвобождение цитокинов, приводящее к потенциально летальной иммунной реакции, называемой «цитокиновым штормом»; в случае же слишком слабого связывания указанного антигенсвязывающего домена CAR Т-клетки не обеспечивают достаточной терапевтической эффективности для устранения раковых клеток.

Краткое описание

В настоящем изобретении в общем предложены усовершенствованные векторы для Т-клеточной терапии и способы их применения.

Согласно различным вариантам реализации предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: внеклеточный домен, который содержит антитело мыши против BCMA (антиген созревания В-клеток) или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают один или более эпитопов полипептида BCMA человека; трансмембранный домен, один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов, и первичный сигнальный домен.

Согласно конкретным вариантам реализации указанное антитело мыши против BCMA или указанный антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид BCMA человека, выбран(о) из группы, состоящей из: Ig верблюда, Ig NAR, Fab-фрагментов, Fab'-фрагментов, F(ab)'2-фрагментов, F(ab)'3-фрагментов, Fv, одноцепочечного Fv-антитела («scFv»), би-scFv, (scFv)2, минитело, диатела, триатела, тетратела, стабилизированного дисульфидными связями белка Fv («dsFv») и однодоменного антитела (sdAb, нанотела).

Согласно дополнительным вариантам реализации указанное антитело мыши против BCMA или указанный антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид BCMA человека, представляет собой scFv.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более областей CDR, представленных в любой из последовательностей SEQ ID NO: 1–3.

Согласно конкретным вариантам реализации указанное антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более областей CDR, представленных в любой из последовательностей SEQ ID NO: 4–6.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, соответствующую представленной в последовательности SEQ ID NO: 7.

Согласно конкретным вариантам реализации указанная последовательность вариабельной области легкой цепи содержит последовательности CDR, представленные в последовательностях SEQ ID NO: 1–3.

Согласно другим вариантам реализации указанное антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную в последовательности SEQ ID NO: 8.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанная последовательность вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательности CDR, представленные в последовательностях SEQ ID NO: 4–6.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный трансмембранный домен представлен полипептидом, выбранным из группы, состоящей из: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 и PD1.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный трансмембранный домен представлен полипептидом, выбранным из группы, состоящей из: CD8α; CD4, CD45, PD1 и CD154.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный трансмембранный домен представлен CD8α.

Согласно конкретным вариантам реализации указанные один или более костимулирующих сигнальных доменов представлены костимулирующей молекулой, выбранной из группы, состоящей из: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.

Согласно конкретным вариантам реализации указанные один или более костимулирующих сигнальных доменов представлены костимулирующей молекулой, выбранной из группы, состоящей из: CD28, CD134 и CD137.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанные один или более костимулирующих сигнальных доменов представлены костимулирующей молекулой, выбранной из группы, состоящей из: CD28, CD134 и CD137.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанные один или более костимулирующих сигнальных доменов представлены CD28.

Согласно конкретным вариантам реализации указанные один или более костимулирующих сигнальных доменов представлены CD134.

Согласно другим вариантам реализации указанные один или более костимулирующих сигнальных доменов представлены CD137.

Согласно некоторым вариантам реализации CAR содержит полипептид шарнирной области.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный полипептид шарнирной области содержит шарнирную область CD8α.

Согласно некоторым вариантам реализации CAR содержит спейсерную область.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный полипептид спейсерной области содержит области CH2 и CH3 IgG1 или IgG4.

Согласно конкретным вариантам реализации CAR содержит сигнальный пептид.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный сигнальный пептид содержит сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный пептид рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора 2 (GM-CSFR2) или сигнальный полипептид CD8α.

Согласно одному варианту реализации CAR содержит последовательность аминокислот, соответствующую представленной в последовательности SEQ ID NO: 9.

Согласно различным вариантам реализации предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, предусмотренный настоящим изобретением.

Согласно различным конкретным вариантам реализации предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, отличающийся тем, что указанная полинуклеотидная последовательность соответствует последовательности SEQ ID NO: 10.

Согласно различным определенным вариантам реализации предложен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, предусмотренный настоящим изобретением, или представленный в последовательности SEQ ID NO: 10.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный вектор представляет собой экспрессионный вектор.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный вектор представляет собой эписомный вектор.

Согласно конкретным вариантам реализации указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

Согласно другим вариантам реализации указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

Согласно одному варианту реализации вектор, кодирующий CAR к BCMA, содержит последовательность полинуклеотидов, представленную в последовательности SEQ ID NO: 36.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный лентивирусный вектор выбирают из группы, состоящей по существу из: вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1); вируса иммунодефицита человека 2 (ВИЧ-2), вируса висна-маэди (ВМВ); вируса артрита-энцефалита коз (АЭК); вируса инфекционной анемии лошадей (ИНАН); вируса иммунодефицита кошачьих (ВИК); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС); и вируса иммунодефицита обезьян (ВИО).

Согласно конкретным вариантам реализации вектор содержит левую (5') ретровирусную последовательность LTR, сигнал упаковки пси (Ψ), центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (cPPT/FLAP), элемент экспорта ретровируса;

промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим CAR согласно настоящему описанию; и правую (3') ретровирусную последовательность LTR.

Согласно другим вариантам реализации CAR содержит гетерологичную последовательность полиаденилирования.

Согласно некоторым вариантам реализации CAR содержит посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита B (HPRE) или посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный промотор последовательности 5' LTR заменяют на гетерологичный промотор.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный гетерологичный промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (ЦМВ, или CMV), промотор вируса саркомы Рауса (ВСР, или RSV) или промотор вируса обезьян 40 (SV40).

Согласно конкретным вариантам реализации указанная последовательность 5' LTR или 3' LTR представляет собой лентивирусную LTR.

Согласно конкретным вариантам реализации указанная последовательность 3' LTR содержит одну или более модификаций.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность 3' LTR содержит одно или более удалений.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность 3' LTR представляет собой самоинактивирующуюся (SIN) LTR.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста или сигнальную последовательность полиаденилирования β-глобина кролика.

Согласно дополнительным вариантам реализации полинуклеотид, кодирующий CAR, предусмотренный настоящим изобретением, содержит оптимизированную последовательность Козак.

Согласно дополнительным вариантам реализации промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим CAR, предусмотренный настоящим изобретением, выбран из группы, состоящей из: промотора немедленно-ранних генов цитомегаловируса (ЦМВ), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1-α), промотора фосфоглицераткиназы 1 (PGK), промотора убиквитина-С (UBQ-C), энхансера цитомегаловируса/промотора бета-актина курицы (CAG), энхансера вируса полиомы/промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса (MC1), промотора бета-актина (β-ACT), промотора вируса обезьян 40 (SV40) и промотора, содержащего энхансер миелопролиферативного вируса саркомы с удаленной областью отрицательного контроля и заменой на сайт связывания праймера dl587rev (MND-промотор).

Согласно различным вариантам реализации предложена иммунная эффекторная клетка, содержащая вектор, предусмотренный настоящим изобретением. Согласно различным вариантам реализации указанную иммунную эффекторную клетку трансдуцируют вектором, предусмотренным настоящим изобретением.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанная иммунная эффекторная клетка выбрана из группы, состоящей из: Т-лимфоцита и естественной киллерной (NK) клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации указанную иммунную эффекторную клетку трансдуцируют вектором по любому из пп. 28–46, и активируют и стимулируют в присутствии ингибитора PI3K-пути, с сохранением таким образом пролиферации трансдуцированных иммунных эффекторных клеток по сравнению с пролиферацией трансдуцированных иммунных эффекторных клеток, которые были активированы и стимулированы в отсутствие указанного ингибитора PI3K-пути.

Согласно конкретным вариантам реализации указанная иммунная эффекторная клетка, активируемая и стимулируемая в присутствии указанного ингибитора PI3K-пути, отличается повышенной экспрессией: i) одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из: CD62L, CD127, CD197 и CD38 или ii) всех перечисленных маркеров: CD62L, CD127, CD197 и CD38, по сравнению с иммунной эффекторной клеткой, активированной и стимулированной в отсутствие указанного ингибитора PI3K-пути.

Согласно одному варианту реализации указанный ингибитор PI3K представляет собой ZSTK474.

Согласно различным вариантам реализации предложена композиция, содержащая иммунную эффекторную клетку, предусмотренную настоящим изобретением, и физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно различным вариантам реализации предложен способ получения иммунной эффекторной клетки, содержащей CAR, предусмотренный настоящим изобретением, включающий введение в иммунную эффекторную клетку вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий указанный CAR.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанный способ дополнительно включает стимуляцию указанной иммунной эффекторной клетки и индукцию пролиферации указанной клетки путем приведения указанной клетки в контакт с антителами, которые связываются с CD3, и антителами, которые связываются с CD28; с получением таким образом популяции иммунных эффекторных клеток.

Согласно конкретным вариантам реализации указанную иммунную эффекторную клетку стимулируют и индуцируют ее пролиферацию перед введением указанного вектора.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные иммунные эффекторные клетки включают Т-лимфоциты.

Согласно конкретным вариантам реализации указанные иммунные эффекторные клетки включают NK-клетки.

Согласно конкретным вариантам реализации указанные клетки активируют и стимулируют в присутствии ингибитора PI3K-пути, с сохранением таким образом пролиферации трансдуцированных иммунных эффекторных клеток по сравнению с пролиферацией иммунных эффекторных клеток, которые активируют и стимулируют в отсутствие указанного ингибитора PI3K-пути.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные иммунные эффекторные клетки, активируемые и стимулируемые в присутствии указанного ингибитора PI3K-пути, отличаются повышенной экспрессией: i) одного или более маркеров, выбранных из

группы, состоящей из: CD62L, CD127, CD197 и CD38, или ii) всех перечисленных маркеров: CD62L, CD127, CD197 и CD38, по сравнению с иммунными эффекторными клетками, активируемыми и стимулируемыми в отсутствие указанного ингибитора PI3K-пути.

Согласно одному варианту реализации указанный ингибитор PI3K представляет собой ZSTK474.

Согласно различным вариантам реализации предложен способ лечения связанного с B-клетками состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей несущие CAR к BCMA Т-клетки, предусмотренные настоящим изобретением, и, необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно другим вариантам реализации указанное связанное с B-клетками состояние представляет собой множественную миелому, неходжкинскую лимфому, пролиферацию B-клеток неопределенного злокачественного потенциала, лимфоматоидный гранулематоз, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство, иммунорегуляторное расстройство, ревматоидный артрит, тяжелую миастению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, АНЦА-ассоциированный васкулит, синдром Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию и быстропрогрессирующий гломерулонефрит, болезнь тяжелых цепей, первичный или ассоциированный с иммуноцитами амилоидоз, или моноклональную гаммапатию неопределенного значения.

Согласно дополнительным вариантам реализации связанное с B-клетками состояние представляет собой B-клеточное злокачественное новообразование.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное B-клеточное злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому (ММ) или неходжкинскую лимфому (НХЛ).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная ММ выбрана из группы, состоящей из: манифестной множественной миеломы, вялотекущей множественной миеломы, плазмоклеточного лейкоза, несекреторной миеломы, IgD-миеломы, остеосклеротической миеломы, одиночной плазмоцитомы кости и экстрамедуллярной плазмацитомы.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная НХЛ выбрана из группы, состоящей из: лимфомы Беркитта, хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (ХЛЛ/МЛЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфобластного лейкоза из клеток-предшественников и мантийноклеточной лимфомы.

Согласно конкретным вариантам реализации указанное связанное с В-клетками состояние представляет собой злокачественное новообразование плазматических клеток.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанное связанное с В-клетками состояние представляет собой аутоиммунное заболевание.

Согласно дополнительным вариантам реализации указанное аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное связанное с В-клетками состояние представляет собой ревматоидный артрит.

Согласно конкретным вариантам реализации указанное связанное с В-клетками состояние представляет собой идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, или тяжелую миастению, или аутоиммунную гемолитическую анемию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1** показано приведено схематическое изображение конструкций CAR, направленного против антигена созревания В-клеток мыши (muBCMA).

На **фиг. 2а** представлено количество ИФН-γ, высвобождаемого несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, несущими CAR к BCMA10 Т-клетками и несущими CAR19Δ Т-

клетками после совместного культивирования указанных клеток в течение 24 часов с клетками K562, экспрессирующими BCMA.

На **фиг. 2b** приведено сравнение количества ИФН-γ, высвобождаемого несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, несущими CAR к BCMA10 Т-клетками и несущими CAR19Δ Т-клетками после совместного культивирования указанных клеток в течение 24 часов с клетками K562, не экспрессирующими BCMA, и с клетками K562, экспрессирующими BCMA.

На **фиг. 3** приведено количество воспалительных цитокинов в ростовых средах нетрансдуцированных контрольных Т-клеток, несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, несущих CAR к BCMA10 Т-клеток и несущих CAR19Δ Т-клеток, стимулированных за 10 дней до анализа.

На **фиг. 4** приведено количество воспалительных цитокинов, продуцируемых несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, несущими CAR к BCMA10 Т-клетками и несущими CAR19Δ Т-клетками в отсутствие антигенной стимуляции.

На **фиг. 5** показана экспрессия фенотипических маркеров активации в конце процесса получения несущих CAR против BCMA Т-клеток. Экспрессию HLA-DR и CD25 измеряли в несущих CAR к BCMA02 Т-клетках, несущих CAR к BCMA10 Т-клетках и несущих CAR19Δ Т-клетках.

На **фиг. 6** приведены уровни активации каспазы-3, необходимого для апоптоза этапа, имеющего большое значение для AICD в несущих CAR к BCMA10 и CAR к BCMA02 Т-клетках в отсутствие антигенной стимуляции.

На **фиг.** 7 приведено количество высвобождаемых воспалительных цитокинов в несущих CAR против BCMA02 и CAR к BCMA10 Т-клетках в среде, содержащей фетальную бычью сыворотку (ФБС), сыворотку человека с АВ-антигенами (HABS) или 100 нг/мл растворимого BCMA.

На **фиг. 8A** приведен объем опухолей у мышей NOD-*scid*-гамма (NSG) с экспериментальными подкожными опухолями множественной миеломы человека (RPMI-8226) размером ~100 мм^3. Мыши получали основу, 10^7 несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, 10^7 несущих CAR к BCMA10 Т-клеток или бортезомиб (велкейд).

На **фиг. 8B** приведен объем опухолей у мышей NOD-*scid*-гамма (NSG) с экспериментальными подкожными опухолями множественной миеломы человека (RPMI-8226) размером ~100 мм^3. Мыши получали основу, 10^7 несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, 10^7 несущих CAR к BCMA10 Т-клеток или бортезомиб (велкейд).

На **фиг. 9** показан уровень экспрессии BCMA на клетках линий лимфомы и лейкоза (кружки) и активность несущих CAR к BCMA Т-клеток в отношении каждой линии клеток (высвобождение ИФН-γ, квадраты). BCMA-отрицательные (BCMA-) линии опухолевых клеток: миелогенного лейкоза (K562), острого лимфобластного лейкоза (NALM-6 и NALM-16); мантийноклеточной лимфомы (REC-1); или ходжкинской лимфомы (HDLM-2) демонстрировали незначительное высвобождение или отсутствие высвобождения ИФН-γ. BCMA-положительные (BCMA+) линии опухолевых клеток: В-клеточного хронического лимфобластного лейкоза (MEC-1), мантийноклеточной лимфомы (JeKo-1), ходжкинской лимфомы (RPMI-6666), лимфомы Беркитта (клетки Daudi и клетки Ramos) и множественной миеломы (RPMI-8226) демонстрировали существенное высвобождение ИФН-γ.

На **фиг. 10A** показана активность *in vivo* основы, несущих CAR к CD19Δ Т-клеток, несущих CAR к CD19 Т-клеток и несущих CAR к BCMA Т-клеток в отношении экспрессирующих BCMA клеток лимфомы Беркитта (клеток Daudi) в модели на мышах NSG при введении мышам несущих CAR Т-клеток через 8 дней после индукции опухолей.

На **фиг. 10B** показана активность *in vivo* основы, несущих CAR к CD19Δ Т-клеток, несущих CAR к CD19 Т-клеток и несущих CAR к BCMA T Т-клеток в отношении экспрессирующих BCMA клеток лимфомы Беркитта (клеток Daudi) в модели на мышах NSG при введении мышам несущих CAR Т-клеток через 18 дней после индукции опухолей.

На **фиг. 11** показана выраженная активность *in vitro* несущих CAR к BCMA Т-клеток, наблюдавшаяся при 50% снижении экспрессии CAR против BCMA. (A) Популяции Т-клеток трансдуцировали 4×10^8 – 5×10^7 трансдуцирующих единиц лентивируса, кодирующего молекулу CAR против BCMA (множественность заражения (MOI): 5–40). Полученные популяции Т-клеток нормировали до содержания 26 ± 4% положительных по CAR против BCMA Т-клеток. (B) Показатель MFI нормированных несущих CAR

против BCMA Т-клеток варьировал от 885 до 1875 по оценке с применением проточно-цитометрического анализа. (C) Для клеток K562 и клеток K562-BCMA при совместном культивировании с нормированными несущими CAR против BCMA Т-клеткам и соотношении эффекторных (E; Т-клетки) и целевых (T; смесь клеток K562 и K562 BCMA в соотношении 1:1) клеток, составляющем 20:1 или 10:1, наблюдалась сопоставимая цитолитическая активность.

Фиг. 12 иллюстрирует надежность процесса получения несущих CAR против BCMA Т-клеток. (A) Продукты с несущими CAR против BCMA Т-клетками, полученные из клеток МКПК 11 индивидуальных доноров демонстрировали уровни размножения, сопоставимые с соответствующей культурой нетрансдуцированных донорных Т-клеток. (B) Продукты с несущими CAR против BCMA Т-клетками, полученными от 11 доноров, демонстрировали сопоставимую эффективность лентивирусной трансдукции (VCN). (C) Содержание положительных по CAR против BCMA Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии; у всех доноров наблюдалась сопоставимая экспрессия BCMA. (D) Продукты с несущими CAR против BCMA Т-клетками, полученными от 11 доноров, демонстрировали терапевтически релевантные уровни высвобождения ИФН-γ при воздействии экспрессирующими BCMA клетками K562.

На **фиг. 13** приведены диаграммы Венна, отражающие совместную экспрессию CD127, CD197 и CD38 в положительных по CD62L направленных против BCMA02 Т-клеток, культивированных в присутствии ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474 в течение десяти дней. В обработанных ZSTK474 культурах несущих CAR к BCMA02 Т-клеток наблюдалось увеличение процентного содержания клеток, коэкспрессирующих CD127, CD197 и CD38, по сравнению с культурами несущих CAR против BCMA Т-клеток, культивированных только с ИЛ-2.

На **фиг. 14** показано увеличение процентного содержания экспрессирующих CD8 несущих CAR к BCMA02 Т-клеток в культурах, обработанных ИЛ-2 и ZSTK474 (n=7), по сравнению с культурами, обработанными только ИЛ-2. Экспрессию CD8 определяли с применением флуоресцентно меченого антитела против CD8 и проточной цитометрии.

На **фиг. 15** приведено количество ИФН-γ, высвобождаемое несущими CAR к BCMA02 Т-клетками 14 доноров после культивирования только с ИЛ-2, или с ИЛ-2 и ZSTK474.

В конце периода культивирования эквивалентное количество несущих CAR к BCMA02 Т-клеток повторно культивировали в течение 24 часов в среде без добавок. Количество ИФН-γ, высвобождаемое за 24 часа, количественно определяли с помощью ИФА ELISA. Культивирование в ZSTK474 значимо не повышало высвобождение тонических цитокинов несущими CAR к BCMA02 Т-клетками по сравнению с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, культивированными только с ИЛ-2.

На **фиг. 16** показана противоопухолевая активность несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, обработанных ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474, или несущих усеченные не обеспечивающие полноценной сигнализации CAR против BCMA02 (tBCMA02) Т-клеток, обработанных ИЛ-2 и ZSTK474, в модели агрессивной опухоли Daudi. Полная регрессия опухолей наблюдалась у 50% мышей, которым вводили несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, обработанные ИЛ-2 и ZSTK474.

На **фиг. 17** показана противоопухолевая активность несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, обработанных ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474, в модели опухоли множественной миеломы (RPMI-8226). У животных, получавших лечение культивированными с ИЛ-2, или с ИЛ-2 и ZSTK474 несущими CAR к BCMA02 Т-клетки, наблюдалось полное предотвращение разрастания опухолей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ идентификаторов последовательностей

В **SEQ ID NO: 1–3** представлены примеры последовательностей аминокислот областей CDR легких цепей рецепторов CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением.

В **SEQ ID NO: 4–6** представлены примеры последовательностей аминокислот областей CDR тяжелых цепей рецепторов CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением.

В **SEQ ID NO:** 7 представлены примеры последовательности аминокислот легких цепей рецепторов CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением.

В **SEQ ID NO: 8** представлены примеры последовательностей аминокислот тяжелых цепей рецепторов CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением.

В **SEQ ID NO: 9** представлены примеры последовательностей аминокислот CAR к BCMA, предусмотренного настоящим изобретением.

В **SEQ ID NO: 10** представлены последовательности полинуклеотидов, которые кодируют примеры CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением.

В **SEQ ID NO: 11** представлена последовательность аминокислот BCMA человека.

В **SEQ ID NO: 12–22** представлена последовательность аминокислот различных линкеров.

В **SEQ ID NO: 23–35** представлена последовательность аминокислот сайты расщепления протеазой и сайты расщепления саморасщепляющихся полипептидов.

В **SEQ ID NO: 36** представлена последовательность полинуклеотидов вектора, кодирующего CAR к BCMA.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

A. Общая информация

Настоящее изобретение относится в общем к усовершенствованным композициям и способам для лечения связанных с B-клетками состояний. В настоящем документе термин «связанные с B-клетками состояния» относится к состояниям, включающим неадекватную B-клеточную активность, и B-клеточным злокачественным новообразованиям.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящее изобретение относится к усовершенствованной адоптивной клеточной терапии связанных с B-клетками состояний с применением генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток. Для улучшения иммунного распознавания и элиминации раковых клеток потенциально могут применяться генетические методы. Одной из перспективных стратегий является генноинженерное конструирование иммунных эффекторных клеток для экспрессии гибридных антигенных рецепторов (CAR), перенаправляющих цитотоксичность на раковые клетки. Однако существующие варианты адоптивной клеточной иммунотерапии для лечения B-клеточных расстройств сопряжены с серьезным риском нарушений гуморального иммунитета, поскольку указанные клетки

нацелены на антигены, экспрессируемые на всех или на большинстве В-клеток. Таким образом, такие варианты терапии не являются клинически желательными и, соответственно, в данной области техники сохраняется потребность в более эффективных, щадящих в отношении гуморального иммунитета вариантах терапии связанных с В-клетками состояний.

Усовершенствованные композиции и способы для адоптивной клеточной терапии согласно описанию в настоящем документе обеспечивают получение генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые могут легко быть размножены, демонстрируют долгосрочную персистентность *in vivo* и менее пагубно влияют на гуморальный иммунитет за счет нацеливания на В-клетки, экспрессирующие антиген созревания В-клеток (BCMA, также известный как CD269, или представитель суперсемейства факторов некроза опухоли 17; TNFRSF17).

BCMA представляет собой представитель суперсемейства факторов некроза опухоли (см., например, Thompson *et al., J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135, 2000, и Mackay *et al., Annu. Rev. Immunol*, 21: 231-264, 2003. BCMA связывает активирующий В-клетки фактор (BAFF) и индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL) (*см., например,* Mackay *et al.*, 2003 и Kalled *et al., Immunological Reviews*, 204: 43–54, 2005). Была описана экспрессия BCMA в незлокачественных клетках, в основном в плазматических клетках и субпопуляциях зрелых В-клеток (*см., например,* Laabi *et al.*, *EMBO J.*, 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi *et al., Nucleic Acids Res.*, 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled *et al.*, 2005; O'Connor *et al., J. Exp. Medicine,* 199(1): 91–97, 2004; и Ng *et al., J. Immunol.*, 73(2): 807-817, 2004. Мыши с дефицитом BCMA здоровы, их организм содержит нормальное количество В-клеток, однако выживаемость долгоживущих клеток плазмы нарушена (*см., например,* O'Connor *et al.*, 2004; Xu *et al., Mol. Cell. Biol,* 21(12): 4067-4074, 2001; и Schiemann *et al., Science,* 293(5537): 2111-2114, 2001). РНК BCMA была обнаружена повсеместно в клетках множественной миеломы и других лимфом, а белок BCMA был обнаружен рядом исследователей на поверхности плазматических клеток страдающих множественной миеломой пациентов (*см., например,* Novak *et al., Blood*, 103(2): 689-694, 2004; Neri e*t al., Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci *et al., Blood*, 105(10): 3945-3950, 2005; и Moreaux *et al., Blood*, 703(8): 3148-3157, 2004.

Согласно различным вариантам реализации рецепторы CAR, содержащие антитело мыши против последовательностей BCMA, высокоэффективны по сравнению с CAR к

BCMA, содержащими конкретные последовательности антител человека; демонстрируют устойчивое размножение *in vivo*; распознают В-клетки человека, экспрессирующие BMCA; демонстрируют цитотоксическую активность в отношении экспрессирующих BCMA В-клеток; и не проявляют признаков индукции цитокинового шторма, потенциально летального состояния, при котором цитокины, высвобождаемые активированными Т-клетками, вызывают резкий системный воспалительный ответ, инициирующий неинфекционную лихорадку.

Согласно одному варианту реализации предложен CAR, содержащий антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, трансмембранный домен, и один или большее число внутриклеточных сигнальных доменов.

Согласно одному варианту реализации предложена иммунная эффекторная клетка, генетически модифицированная для экспрессии CAR, предусмотренного настоящим изобретением. Т-клетки, экспрессирующие CAR, называются в настоящем документе CAR Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками.

Согласно различным вариантам реализации указанные генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные настоящим изобретением, вводят пациенту, страдающему связанным с В-клетками состоянием, например, аутоиммунным заболеванием, связанным с В-клетками, или В-клеточным злокачественным новообразованием.

При практической реализации настоящего изобретения применяются, если конкретным образом не указано иное, стандартные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, техники рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, соответствующие уровню техники, многие которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие техники подробно описаны в опубликованных источниках. См., например, руководства: Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, обновл. от июля 2008 г.); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford,

1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, например, в журнале *Advances in Immunology*.

B. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют значения, соответствующие общеизвестным для специалистов в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практической реализации или тестировании настоящего изобретения могут применяться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные представленным в настоящем документе, в настоящем документе описаны предпочтительные варианты реализации композиций, способов и материалов. Ниже приведены определения терминов, используемых для целей настоящего изобретения.

Формы единственного числа, в том числе предваряемые определением «указанный(ая,ое,ые)» используют в настоящем документе для обозначения одной или более чем одной (*т. е.* по меньшей мере одной, или одной или более) грамматических единиц указанного объекта. Например, «элемент» означает один элемент, или один или более элементов.

Указание альтернативы (*например,* употребление «или») следует понимать как обозначение одной, обеих или любой комбинации указанных альтернатив.

Термин «и/или» следует понимать как обозначение одной или обеих указанных альтернатив.

В настоящем документе термин «приблизительно», или «примерно» относится к количеству, уровню, величине, числу, частоте, проценту, размерности, размеру, значению, массе или длине, варьирующему(ей) до 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% относительно референсного количества, уровня, величины, числа, частоты, процента, размерности, размера, значения, массы или длины. Согласно

одному варианту реализации термин «приблизительно», или «примерно» относится к диапазону количества, уровня, величины, числа, частоты, процента, размерности, размера, значения, массы или длины, соответствующему ± 15%, ± 10%, ± 9%, ± 8%, ± 7%, ± 6%, ± 5%, ± 4%, ± 3%, ± 2% или ± 1% относительно референсного количества, уровня, величины, числа, частоты, процента, размерности, размера, значения, массы или длины.

Везде в тексте настоящего описания, за исключением случаев, когда контекст подразумевает иное, термины «включает», «содержит» и «содержащий» подразумевают включение означенного этапа или элемента, или группы этапов или элементов, без исключения любого другого этапа или элемента, или группы этапов или элементов. Под «состоящим из» подразумевают включение с ограничением элементами, перечисленными после выражения «состоящий из». Соответственно, выражение «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и другие элементы присутствовать не могут. Под «состоящим по существу из» подразумевают включение любых элементов, перечисленных после указанного выражения, и ограничение других элементов, не влияющих или не вносящих вклад в активность или действие, описанное в настоящем описании для перечисленных элементов. Соответственно, выражение «состоящий по существу из» показывает, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, однако отсутствуют другие элементы, способные по существу влиять на активность или действие перечисленных элементов.

Во всех разделах настоящего описания упоминание «одного варианта реализации», «варианта реализации», «конкретного варианта реализации», «родственного варианта реализации», «определенного варианта реализации», «дополнительного варианта реализации» или «дальнейшего варианта реализации» или их комбинаций означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описываемый(ая) в связи с указанным вариантом реализации, включен(а) по меньшей мере в один вариант реализации настоящего изобретения. Соответственно, перечисленные выше выражения, используемые где-либо в тексте указанного описания, не обязательно всегда относятся к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть скомбинированы любым подходящим образом в одном или более вариантах реализации. Следует также

понимать, что прямое раскрытие признака в одном варианте реализации служит основанием для исключения указанного признака в конкретном варианте реализации.

C. Химерные антигенные рецепторы

Согласно различным вариантам реализации предложены генетически сконструированные рецепторы, перенаправляющие цитотоксичность иммунных эффекторных клеток на В-клетки. Указанные генетически сконструированные рецепторы, называются в настоящем документе химерными антигенными рецепторами (CAR). CAR представляют собой молекулы, сочетающие специфичность антитела в отношении требуемого антигена (*например,* BCMA) с активирующим Т-клеточный рецептор внутриклеточным доменом, в форме гибридного белка, который демонстрирует специфическую направленную против BCMA клеточную иммунную активность. В настоящем документе термин «гибридный» или «химерный» относится к состоящим из частей разных белков или ДНК разного происхождения молекулам.

CAR, предусмотренные настоящим изобретением, содержат внеклеточный домен (также называемый связывающим доменом или антигенспецифическим связывающим доменом), который связывается с BCMA, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Активация антигенсвязывающего анти-BCMA-домена CAR с помощью BCMA на поверхности целевой клетки приводит к агрегации CAR и доставке активирующего стимула в CAR-содержащую клетку. Основной характеристикой рецепторов CAR является их способность к перенаправлению специфичности иммунных эффекторных клеток, с запуском таким образом пролиферации, продукции цитокинов, фагоцитоза или синтеза молекул, которые могут опосредовать клеточную смерть экспрессирующей целевой антиген клетки независимым от главного комплекса гистосовместимости (MHC) образом, задействуя способность к клеточно-специфическому таргетингу моноклональных антител, растворимых лигандов или клеточно-специфических корецепторов.

Согласно различным вариантам реализации CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который содержит специфический связывающий домен антитела мыши против BCMA; трансмембранный домен; один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов; и первичный сигнальный домен.

Согласно конкретным вариантам реализации CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который содержит антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент; один или более шарнирных доменов или спейсерные доменов; трансмембранный домен, включающий один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов; и первичный сигнальный домен.

1. Связывающий домен

Согласно конкретным вариантам реализации, предусмотренные настоящим изобретением CAR содержат внеклеточный связывающий домен, который включает антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с полипептидом BCMA человека, экспрессируемом на B-клетке. В настоящем документе термины «связывающий домен», «внеклеточный домен», «внеклеточный связывающий домен», «антигенспецифический связывающий домен» и «внеклеточный антигенспецифический связывающий домен» используются взаимозаменяемо; указанный домен обеспечивает способность CAR специфически связываться с представляющим интерес целевым антигеном, например, BCMA. Указанный связывающий домен происходит из естественного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Термины «специфическое сродство к связыванию», или «специфически связывает», или «специфически связываемый», или «специфическое связывание», или «специфически нацелен» в настоящем документе описывают связывание антитела против BCMA или его антигенсвязывающего фрагмента (или содержащего его CAR) с BCMA с более высоким сродством к связыванию (аффинностью), чем фоновое связывание. Связывающий домен (или содержащий связывающий домен CAR, или содержащий связывающий домен гибридный белок) «специфически связывается» с BCMA, если он связывается или соединяется с BCMA со сродством (аффинностью) или с константой K_a (*m. e.* равновесной константой связывания для конкретного связывающего взаимодействия, выраженной в единицах 1/M), например, превышающей или равной приблизительно 10^5 M^{-1}. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий домен (или содержащий его гибридный белок) связывается с мишенью с константой Ka, превышающей или равной приблизительно 10^6 M^{-1}, 10^7 M^{-1}, 10^8 M^{-1}, 10^9 M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1}, 10^{12} M^{-1} или 10^{13} M^{-1}. Термин «высокоаффинные» связывающие домены (или содержащие их одноцепочечные гибридные белки)

относится к связывающим доменам, отличающимся константой K_a, составляющей по меньшей мере 10^7 M^{-1}, по меньшей мере 10^8 M^{-1}, по меньшей мере 10^9 M^{-1}, по меньшей мере 10^{10} M^{-1}, по меньшей мере 10^{11} M^{-1}, по меньшей мере 10^{12} M^{-1}, по меньшей мере 10^{13} M^{-1} или более.

Как вариант, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации (K_d) конкретного связывающего взаимодействия в единицах М (*например,* от 10^{-5} М до 10^{-13} М, или менее). Аффинность полипептидных связывающих доменов и белков CAR в соответствии с настоящим изобретением может быть легко определена с применением стандартных техник, например, конкурентного ИФА ELISA (иммуноферментного твердофазного анализа), или посредством анализа связывания, или замещающего анализа с применением меченых лигандов, или с применением устройства поверхностного плазмонного резонанса, такого как Biacore T100, предлагаемого Biacore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси, или технологии оптических биосенсоров, например, системы EPIC или EnSpire, предлагаемых Corning и Perkin Elmer, соответственно (см. *также*, например, Scatchard *et al.* (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; патенты США №5283173; №5468614, а также эквивалентные).

Согласно одному варианту реализации специфическое сродство к связыванию приблизительно в 2 раза превышает фоновое связывание, приблизительно в 5 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 10 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 20 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 50 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 100 раз превышает фоновое связывание, или приблизительно в 1000 раз или более превышает фоновое связывание.

Согласно конкретным вариантам реализации внеклеточный связывающий домен CAR содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Термин «антитело» относится к связывающему агенту, который представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, специфически распознающую и связывающую эпитоп антигена, такого как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая кислота, содержащего антигенную детерминанту, такую как распознаваемые иммунной клеткой.

«Антиген (Ag)» относится к соединению, композиции или веществу, которое(ый, ая) может стимулировать синтез антител или Т-клеточный ответ у животного, в том числе

к композициям (например, композиции, включающей специфический связанный с раковым заболеванием белок), инъецируемым или проникающим в организм животного. Антиген вступает в реакции с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе индуцируемыми гетерологичными антигенами, такими как раскрытые в настоящем описании антигены. Согласно конкретным вариантам реализации целевой антиген представляет собой эпитоп полипептида BCMA.

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к области антигена, с которой связывается связывающий агент. Эпитопы могут быть образованы расположенными как последовательно, так и не последовательно аминокислотами, сближение которых обеспечивается третичной укладкой белка. Эпитопы, образованные последовательными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные за счет третичной укладки, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, чаще по меньшей мере 5, приблизительно 9, или приблизительно 8–10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Антитела включают антигенсвязывающие фрагменты, такие как Ig верблюдовых, Ig NAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, одноцепочечные Fv-белки («scFv»), би-scFv, $(scFv)_2$, минитела, диатела, триатела, тетратела, стабилизированные дисульфидными связями Fv-белки («dsFv»), однодоменные антитела (sdAb, нанотело) и фрагменты полноразмерных антител, отвечающие за связывание антигенов. Термин также включает генетически сконструированные формы, такие как гибридные антитела (например, гуманизированные антитела мыши), гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также: каталог и справочник Pierce (Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995, Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

Как будет понятно специалисту в данной области техники и согласно описанию в тексте настоящего документа, полное антитело содержит две тяжелых цепи и две легких цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области и первой, второй и третьей константных областей, а каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области

и константной области. Тяжелые цепи млекопитающих классифицируют на цепи $\alpha, \delta, \varepsilon, \gamma$ и μ. Легкие цепи млекопитающих классифицируют на λ или κ. Иммуноглобулины, содержащие тяжелые цепи $\alpha, \delta, \varepsilon, \gamma$ и μ, разделяют на классы иммуноглобулинов (Ig)A, IgD, IgE, IgG и IgM. Полное антитело имеет «Y»-образную форму. Основание «Y» состоит из второй и третьей константных областей (и, в случае IgE и IgM, четвертой константной области) двух тяжелых цепей, соединенных друг с другом; в шарнире формируются дисульфидные связи (межцепочечные). Тяжелые цепи γ, α и δ содержат константную область, состоящую из трех тандемных (расположенных на одной прямой) доменов Ig, и шарнирную область, обеспечивающую дополнительную гибкость; тяжелые цепи μ и ε содержат константную область, состоящую из четырех иммуноглобулиновых доменов. Вторая и третья константные области называются «доменом CH2» и «доменом CH3», соответственно. Каждое «плечо» Y включает вариабельную область и первую константную область одной тяжелой цепи, связанной с вариабельными и константными областями одной легкой цепи. Вариабельные области легких и тяжелых цепей отвечают за связывание антигенов.

Вариабельные области легких и тяжелых цепей содержат «каркасную» область, перемежаемую тремя гипервариабельными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями», или «областями CDR». Области CDR могут быть определены или идентифицированы с применением стандартных способов, например, на основании последовательности в соответствии с системой Kabat *et al* (Wu, TT and Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443 (1987); (см. источник: Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* U.S. Department of Health and Human Services, 1991, включенный в настоящий документ посредством ссылки), или на основании структуры в соответствии с системой Chothia *et al* (Choithia, C. and Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901-917 (1987), Choithia, C. *et al*, *Nature*, 342: 877–883 (1989)).

Последовательности каркасных областей разных легких или тяжелых цепей относительно консервативны у одного вида, например, у человека. Каркасная область антитела, то есть комбинация каркасных областей составляющих антитело легких и тяжелых цепей, служит для позиционирования и выравнивания областей CDR в трехмерном пространстве. Области CDR отвечают в первую очередь за связывание с

эпитопом антигена. Области CDR каждой цепи, как правило, называются CDR1, CDR2 и CDR3; нумерация начинается последовательно с N-конца; для конкретной области CDR также, как правило, указывают цепь, в составе которой она локализована. Соответственно, области CDR, расположенные в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, называются CDRH1, CDRH2, и CDRH3, а области CDR, расположенные в вариабельном домене легкой цепи антитела, называются CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Антитела с разной специфичностью (*m. e.* содержащие разные комбинирующие сайты для разных антигенов) содержат разные CDR. Хотя антитела различаются между собой именно областями CDR, лишь ограниченное число положений аминокислот в составе областей CDR непосредственно вовлечено в связывание антигена. Указанные положения в составе областей CDR называют определяющими специфичность остатками (SDR). Иллюстративные примеры областей CDR легких цепей, которые подходят для конструирования гуманизированных CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленными, последовательности CDR, представленные в SEQ ID NO: 1–3. Иллюстративные примеры областей CDR тяжелых цепей, которые подходят для конструирования гуманизированных CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь указанными, последовательности CDR, представленные в SEQ ID NO: 4–6.

Термины «VH» или «VH» относятся к вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, в том числе антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела согласно описанию в настоящем документе. Термины «VL» или «VL» относятся к вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, в том числе антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела согласно описанию в настоящем документе.

«Моноклональное антитело» представляет собой антитело, продуцированное одним клоном B-лимфоцитов или клеткой, которая была трансфицирована генами легких и тяжелых цепей одного антитела. Моноклональные антитела получают с применением способов, известных специалистам в данной области техники, например, путем получения гибридных продуцирующих антитела клеток посредством слияния клеток миеломы с иммунными клетками селезенки. Моноклональные антитела включают гуманизированные моноклональные антитела.

«Гибридное антитело» содержит каркасные остатки одного вида, например, человека, и области CDR (которые, как правило, обеспечивают связывание антигена) другого вида, например, мыши. Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации CAR, предусмотренный настоящим изобретением, содержит антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой гибридное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

«Гуманизированное» антитело представляет собой иммуноглобулин, включающий каркасную область человека и одну или более CDR не принадлежащего человеку иммуноглобулина (например, принадлежащего мыши, крысе, или синтетического иммуноглобулина). Указанный не являющийся человеком иммуноглобулин, являющийся источником областей CDR, называют «донором», а иммуноглобулин человека, являющийся источником каркаса, называют «акцептором».

Согласно конкретным вариантам реализации антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент включает, не ограничиваясь перечисленными, Ig верблюда (антитело верблюдовых (VHH)), Ig NAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, одноцепочечное Fv-антитело («scFv»), бис-scFv, (scFv)2, минитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидными связями белок Fv («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело).

«Ig верблюда» или «VHH верблюдовых» в настоящем документе относится к самой маленькой из известных антигенсвязывающих единиц антитела тяжелой цепи (Koch-Nolte, *et al*, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Термин «антитело тяжелой цепи», или «антитело верблюдовых» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. *et al*, J. Immunol. Methods 231:25–38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; патент США №6005079).

«IgNAR», «иммуноглобулиновый новый антигенный рецептор», относится к классу антител иммунного репертуара акул, которые состоят из гомодимеров одного вариабельного домена нового антигенного рецептора (VNAR) и пяти константных доменов нового антигенного рецептора (CNAR). Рецепторы IgNAR относятся к имеющим наименьшие размеры известным белковым каркасам на основе иммуноглобулинов, они высокостабильны и обеспечивают эффективное связывание. Присущая им стабильность может объясняться как (i) несущим Ig-каркасом,

содержащим существенное количество заряженных и гидрофильных поверхностных остатков по сравнению с стандартными доменами VH и VL из антител мыши; и (ii) стабилизацией структурных характеристик петель определяющей комплементарность области (CDR), в том числе за счет межпетлевых дисульфидных мостиков и паттернов внутрипетлевых водородных связей.

При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые «Fab»-фрагментами, каждый из которых содержит один сайт связывания антигена, и остаточный фрагмент Fc («fragment crystallizable»), название которого отражает его способность к легкой кристаллизации. При обработке пепсином образуется F(ab′)2-фрагмент, который содержит два антиген-комбинирующих сайта, и также способен к перекрестному связыванию антигенов.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт связывания антигена. Согласно одному варианту реализации двуцепочечный вариант Fv состоит из димера, включающего один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи, прочно связанные нековалентной связью. В одноцепочечных видах Fv (scFv) один вариабельный домен тяжелой цепи и один вариабельный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером таким образом, что легкие и тяжелые цепи могут соединяться с формированием «димерной» структуры, аналогичной структуре в двуцепочечных видах Fv. Именно в указанной конфигурации взаимодействие трех гипервариабельных областей (HVR) каждого вариабельного домена определяет сайт связывания антигена на поверхности димера VH-VL. В совокупности, шесть HVR обеспечивают антигенсвязывающую специфичность антитела. Однако даже одиночный вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфические в отношении антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с меньшим сродством, чем полноразмерный сайт связывания.

Fab-фрагмент содержит вариабельные домены тяжелых и легких цепей, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab′-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбоксильном конце тяжелой цепи домена CH1, в том числе одного или более цистеинов шарнирной области антитела. В настоящем документе «Fab′-SH» соответствует Fab′, в котором остаток(ки) цистеина константных

доменов несут свободную тиольную группу. F(ab′)2-фрагменты антител исходно были получены в виде пар Fab′-фрагментов, между которым расположены шарнирные цистеины. Известны также другие виды химического связывания фрагментов антител.

Термин «диатела» относится к фрагментам антител с двумя сайтами связывания антигенов, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (VH-VL). За счет использования линкера, слишком короткого для спаривания двух доменов, расположенных на одной и той же цепи, указанные домены вынужденно спариваются с комплементарными доменами другой цепи с образованием двух сайтов связывания антигена. Диатела могут быть бивалентными или биспецифическими. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 1993/01161; в источниках: Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003); и Hollinger *et al.*, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в источнике: Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129-134 (2003).

«Однодоменное антитело», или «sdAb», или «нанотело» относится к фрагменту антитела, который состоит из вариабельной области тяжелой цепи антитела (домен VH) или вариабельной области легкой цепи антитела (домен VL) (Holt, L., *et al*, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490).

«Одноцепочечные Fv» или «scFv» фрагменты антитела содержат домены антитела VH и VL, при этом указанные домены расположены в одной полипептидной цепи в любой ориентации (*например,* VL-VH или VH-VL). Обычно полипептид scFv дополнительно содержит между доменами VH и VL полипептидный линкер, обеспечивающий формирование требуемой для связывания антигена структуры scFv. Общую информацию о scFv можно найти, например, в источнике: Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

Согласно предпочтительным вариантам реализации CAR, предусмотренный настоящим изобретением, содержит антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой scFv мыши. Одноцепочечные антитела могут быть клонированы из генов V-области гибридом, специфических в отношении нужной мишени. Получение таких гибридом в настоящее время является рутинным процессом. Техника, подходящая для клонирования вариабельной области тяжелой цепи (VH) и

вариабельной области легкой цепи (VL) была описана, например, в источнике: Orlandi *et al., PNAS,* 1989; 86: 3833-3837.

Согласно конкретным вариантам реализации антигенспецифический связывающий домен представляет собой scFv мыши, который связывает полипептид BCMA человека. Иллюстративные примеры вариабельных областей тяжелых цепей, которые подходят для конструирования рецепторов CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь указанными, последовательности аминокислот, представленные в последовательности SEQ ID NO: 8. Иллюстративные примеры вариабельных областей легких цепей, которые подходят для конструирования рецепторов CAR к BCMA, предусмотренных настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь указанными, последовательности аминокислот, представленные в последовательности SEQ ID NO: 7.

BCMA-специфические связывающие домены, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно содержат одну, две, три, четыре, пять или шесть областей CDR. Такие CDR могут представлять собой не принадлежащие человеку CDR или измененные не принадлежащие человеку CDR, выбранные из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи, и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации BCMA-специфический связывающий домен содержит (a) вариабельную область легкой цепи, которая включает CDRL1 легкой цепи, CDRL2 легкой цепи и CDRL3 легкой цепи, и (b) вариабельную область тяжелой цепи, которая включает CDRH1 тяжелой цепи, CDRH2 тяжелой цепи и CDRH3 тяжелой цепи.

2. Линкеры

Согласно некоторым вариантам реализации предусмотренные настоящим изобретением рецепторы CAR могут содержать линкерные остатки между различными доменами, например, добавленные для обеспечения надлежащего пространственного разделения и конформации молекулы. Согласно конкретным вариантам реализации указанный линкер представляет собой соединяющую последовательность вариабельной области. «Соединяющая последовательность вариабельной области» представляет собой последовательность аминокислот, соединяющую домены V_H и V_L, и выполняет спейсерную функцию, согласующуюся с взаимодействием двух связывающих субдоменов, таким образом, что итоговый полипептид сохраняет специфическое

сродство к связыванию той же самой целевой молекулы, что и антитело, которое содержит те же вариабельные области легких и тяжелых цепей. Предусмотренный настоящим изобретением CAR может содержать один, два, три, четыре, или пять или более линкеров. Согласно конкретным вариантам реализации длина линкера составляет от приблизительно 1 до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, или соответствует любому промежуточному числу аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации длина указанного линкера составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот.

Иллюстративные примеры линкеров включают полимеры глицина $(G)_n$; полимеры глицина-серина $(G_{1-5}S_{1-5})_n$, где n соответствует целому числу и составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5; полимеры глицина-аланина; полимеры аланина-серина; и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Полимеры глицина и глицина-серина являются относительно неструктурированными, и, соответственно, могут быть способны функционировать в качестве нейтральной связи между доменами гибридных белков, таких как рецепторы CAR, описанные в настоящем документе. Показатели Φ и Ψ для глицина значимо превышают даже показатели для аланина; глицин в значительно меньшей степени пространственно ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкция CAR согласно конкретным вариантам реализации может включать полностью или частично гибкие линкеры, так что указанный линкер может содержать гибкий линкер, а также один или более фрагментов, которые уменьшают гибкость структуры, для получения требуемой структуры CAR.

Другие примеры линкеров включают, не ограничиваясь перечисленными, следующие последовательности аминокислот: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 12); TGEKP (SEQ ID NO: 13) (см., например, Liu *et al.*, PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 14) (Pomerantz *et al.* 1995, выше); $(GGGGS)_n$, где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 15) (Kim *et al.*, PNAS 93, 1156-1160 (1996.); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 16) (Chaudhary *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 17) (Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 18);

LRQRDGERP (SEQ ID NO: 19); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 20); LRQKD(GGGS)$_2$ERP (SEQ ID NO: 21). Как вариант, гибкие линкеры могут быть получены с применением рационального конструирования в компьютерной программе, позволяющей моделировать как сайты связывания ДНК, так и собственно пептиды (Desjarlais & Berg, *PNAS* 90:2256-2260 (1993), *PNAS* 91:11099-11103 (1994), или с применением способов фагового дисплея. Согласно одному варианту реализации линкер содержит следующую последовательность аминокислот: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 22) (Cooper *et al., Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003)).

3. Спейсерный домен

Согласно конкретным вариантам реализации за связывающим доменом CAR расположены один или более «спейсерных доменов», то есть областей, отделяющих антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего межклеточного контакта, связывания антигена и активации (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419). Шарнирный домен может происходить из естественного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Согласно некоторым вариантам реализации спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, одну или более константных областей тяжелых цепей, например, CH2 и CH3. Спейсерный домен может включать последовательность аминокислот шарнирной области встречающейся в природе или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

Согласно одному варианту реализации спейсерный домен содержит домены CH2 и CH3 иммуноглобулина IgG1 или IgG4.

4. Шарнирный домен

За связывающим доменом CAR обычно следуют один или более «шарнирных доменов», которые участвуют в пространственном отделении антигенсвязывающего домена от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего межклеточного контакта, связывания антигена и активации. CAR обычно содержит один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным доменом (TM). Шарнирный домен происходить из естественного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный

домен может включать последовательность аминокислот встречающейся в природе или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

Термин «измененная шарнирная область» относится к (a) встречающейся в природе шарнирной области, в которой изменено до 30% аминокислот (*например,* заменено или удалено до 25%, 20%, 15%, 10% или 5% аминокислот), (b) части встречающейся в природе шарнирной области, содержащей по меньшей мере 10 аминокислот (*например,* по меньшей мере 12, 13, 14 или 15 аминокислот), в которой изменено до 30% аминокислот (*например,* заменено или удалено до 25%, 20%, 15%, 10% или 5% аминокислот), или (c) части встречающейся в природе шарнирной области, содержащей коровую шарнирную область (длина которой может составлять 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации один или более остатков цистеина во встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина могут быть заменены одним или более остатками других аминокислот (*например,* одним или более остатками серина). Измененная шарнирная область иммуноглобулина в альтернативном или дополнительном варианте может содержать вместо остатка пролина шарнирной области иммуноглобулина дикого типа остаток другой аминокислоты (*например,* остаток серина).

Другие иллюстративные шарнирные домены, подходящие для использования в CAR согласно описанию в настоящем документе, включают шарнирную область, происходящую из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, например, CD8α, CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области указанных молекул дикого типа, или могут быть изменены. Согласно другому варианту реализации шарнирный домен содержит шарнирную область CD8α.

5. Трансмембранный (TM) Домен

«Трансмембранный домен» представляет собой часть рецептора CAR, которая соединяет внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный сигнальный домен, и заякоривает CAR в плазматической мембране иммунной эффекторной клетки. TM-домен происходит из естественного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. TM-домен может происходить из (*т. е.* содержать по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и)) альфа-, бета- или зета-цепи T-

клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD 154 и PD1. Согласно конкретному варианту реализации ТМ-домен является синтетическим и содержит в основном гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

Согласно одному варианту реализации предусмотренный настоящим изобретением CAR содержат ТМ-домен, происходящий из CD8α. Согласно другому варианту реализации предусмотренный настоящим изобретением CAR содержит ТМ-домен, происходящий из CD8α, и короткий олигопептидный или полипептидный линкер, предпочтительно имеющий длину от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, соединяющий указанный ТМ-домен и внутриклеточный сигнальный домен рецептора CAR. В частности, подходящим является линкер на основе глицина и серина.

6. Внутриклеточный Сигнальный домен

Согласно конкретным вариантам реализации предусмотренные настоящим изобретением CAR содержат внутриклеточный сигнальный домен. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части рецептора CAR, которая принимает участие в передаче сигнала, возникающего в результате эффективного связывания CAR к BCMA с полипептидом BCMA человека, внутрь иммунной эффекторной клетки для стимуляции функции эффекторной клетки, например, активации, синтеза цитокинов, пролиферации и цитотоксической активности, в том числе высвобождения цитотоксических факторов в связанную CAR целевую клетку, или других клеточных ответов, обусловленных связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR.

Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции иммунной эффекторной клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может быть представлена цитолитической активностью или хелперной активностью, в том числе секрецией цитокинов. Соответственно, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал для эффекторной функции и направляет выполнение клеткой специализированной функции. Хотя, как правило, может быть использован полноразмерный внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях использование полноразмерного домена не является обязательным. В случае использования усеченной части внутриклеточного сигнального домена, такая

усеченная часть может быть использована вместо полноразмерного домена при условии, что она способна передавать сигнал для эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» подразумевает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала для эффекторной функции.

Известно, что сигналы, генерируемые посредством TCR, сами по себе недостаточны для полной активации Т-клетки, и требуется также вторичный, или костимулирующий сигнал. Соответственно, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя отдельными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичными сигнальными доменами, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (*например,* комплекс TCR/CD3), и костимулирующими сигнальными доменами, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный, или костимулирующий сигнал. Согласно предпочтительным вариантам реализации CAR, предусмотренный настоящим изобретением, содержит внутриклеточный сигнальный домен, который содержит один или более «костимулирующих сигнальных доменов» и «первичный сигнальный домен».

Первичные сигнальные домены регулируют первичную активацию комплекса TCR либо путем стимуляции, либо путем ингибирования. Первичные сигнальные домены, которые действуют путем стимуляции, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активационные мотивы, или ITAM.

Иллюстративные примеры ITAM, содержащих первичные сигнальные домены, в частности, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают ITAM, происходящие из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации CAR содержит первичный сигнальный домен CD3ζ и один или более костимулирующих сигнальных доменов. Внутриклеточные первичные сигнальные и костимулирующие сигнальные домены могут быть в любом порядке последовательно присоединены к карбоксильному концу трансмембранного домена.

Рецепторы CAR, предусмотренные настоящим изобретением, содержат один или более костимулирующих сигнальных доменов для повышения эффективности и улучшения размножения Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. В настоящем документе

термин «костимулирующий сигнальный домен», или «костимулирующий домен» относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигенов или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Иллюстративные примеры таких костимулирующих молекул включают CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70. Согласно одному варианту реализации CAR содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из первичных сигнальных доменов CD28, CD137, и CD134 и CD3ζ.

Согласно другому варианту реализации CAR содержит костимулирующие сигнальные домены CD28 и CD137, и первичный сигнальный домен CD3ζ.

Согласно еще одному варианту реализации CAR содержит костимулирующие сигнальные домены CD28 и CD134, и первичный сигнальный домен CD3ζ.

Согласно одному варианту реализации CAR содержит костимулирующие сигнальные домены CD137 и CD134, и первичный сигнальный домен CD3ζ.

Согласно конкретным вариантам реализации, предусмотренные настоящим изобретением CAR содержат антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с полипептидом BCMA, экспрессируемым на В-клетках.

Согласно одному варианту реализации CAR содержит scFv-фрагмент антитела мыши против BCMA, который связывает полипептид BCMA; трансмембранный домен, происходящий из полипептида, выбранного из группы, состоящей из: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154 и PD1; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующих молекул, выбранных из группы, состоящей из: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274

(PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

Согласно одному варианту реализации CAR содержит scFv-фрагмент антитела мыши против BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из: шарнира IgG1 CH2/CH3, шарнира IgG4 CH2/CH3 и шарнира CD8α; трансмембранный домен, происходящий из полипептида, выбранного из группы, состоящей из: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD 154 и PD1; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующих молекул, выбранных из группы, состоящей из: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

Согласно одному варианту реализации CAR содержит scFv-фрагмент антитела мыши против BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из: шарнира IgG1 CH2/CH3, шарнира IgG4 CH2/CH3 и шарнира CD8α; трансмембранный домен, происходящий из полипептида, выбранного из группы, состоящей из: альфа-, бета- или зета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD 154 и PD1; короткий олигопептидный или полипептидный линкер, длина которого составляет предпочтительно от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, соединяющий ТМ-домен с внутриклеточным сигнальным доменом CAR; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующих молекул, выбранных из группы, состоящей из: CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

Согласно конкретному варианту реализации CAR содержит scFv-фрагмент антитела мыши против BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, включающий полипептид шарнира IgG1 CH2/CH3 и полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер длиной от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3ζ.

Согласно конкретному варианту реализации CAR содержит scFv-фрагмент антитела мыши против BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, включающий полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер, длина которого составляет от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD134; и первичный сигнальный домен CD3ζ.

Согласно конкретному варианту реализации CAR содержит scFv-фрагмент антитела мыши против BCMA, который связывает полипептид BCMA; шарнирный домен, включающий полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, содержащий полипептидный линкер, длина которого составляет от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28; и первичный сигнальный домен CD3ζ.

Кроме того, дизайн предусмотренных настоящим изобретением CAR обеспечивает улучшенное размножение, долгосрочную персистентность и удовлетворительные цитотоксические свойства Т-клеток, экспрессирующих указанные рецепторы CAR, по сравнению с немодифицированными Т-клетками или Т-клетками, модифицированными для экспрессии других рецепторов CAR.

D. Полипептиды

Настоящее изобретение предусматривает, в том числе, полипептиды CAR и их фрагменты, содержащие их клетки и композиции, и векторы, экспрессирующие полипептиды. Согласно предпочтительным вариантам реализации предложен полипептид, содержащий один или более CAR, согласно представленным в последовательности SEQ ID NO: 9.

Термины «полипептид», «фрагмент полипептида», «пептид» и «белок» используются взаимозаменяемо, если не указано иное, и соответствуют стандартным значениям, *т. е.* последовательности аминокислот. Полипептиды не ограничены конкретной длиной, например, они могут содержать последовательность полноразмерного белка или фрагмент полноразмерного белка, и могут включать полипептиды с посттрансляционными модификациями, такими как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п., а также другими модификациями, известными в данной области техники, как встречающимися в природе, так и не встречающимися в природе. Согласно различным вариантам реализации предусмотренные настоящим изобретением полипептиды CAR содержат сигнальную (или лидерную) последовательность на N-конце белка, которая котрансляционно или посттрансляционно направляет перенос белка. Иллюстративные примеры подходящих сигнальных последовательностей, подходящих для применения в рецепторах CAR согласно описанию в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленными, сигнальную последовательность тяжелой цепи IgG1 и сигнальную последовательность CD8α. Полипептиды могут быть получены с применением любых из множества хорошо известных рекомбинантных и/или синтетических техник. Предусмотренные настоящим изобретением полипептиды, в частности, включают рецепторы CAR согласно настоящему описанию, или последовательности, содержащие удаления, добавления и/или замены одной или более аминокислот рецептора CAR согласно описанию в настоящем документе.

Термины «выделенный пептид» или «выделенный полипептид» и т.п. в настоящем документе относятся к выделенной и/или очищенной *in vitro* из клеточной среды молекуле пептида или полипептида, лишенной связи с другими компонентами клетки, *т. е.* значимо не связанной с веществами *in vivo*. Аналогичным образом, «выделенная клетка» относится к клеткам, которые были получены из ткани или органа *in vivo* и по существу не содержат внеклеточного матрикса.

Полипептиды включают «варианты полипептидов». Варианты полипептидов могут отличаться от встречающегося в природе полипептида одной(им) или более заменами, удалениями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть получены синтетическим путем, например, путем модификации одной или более из вышеперечисленных последовательностей

полипептидов. Например, согласно конкретным вариантам реализации может быть желательным повышение сродства к связыванию и/или улучшение других биологических свойств рецепторов CAR путем введения одной(го) или более замен, удалений, добавлений и/или вставок в связывающий домен, шарнир, TM-домен, костимулирующий сигнальный домен или первичный сигнальный домен полипептида CAR. Предпочтительно, полипептиды согласно настоящему изобретению включают полипептиды, отличающиеся по меньшей мере приблизительно 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, или 99% идентичностью аминокислот.

Полипептиды включают «фрагменты полипептидов». Фрагменты полипептидов относятся к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным, содержит удаление на аминоконце, удаление на карбоксильном конце, и/или удаление или замену во внутренней последовательности относительно встречающегося в природе или полученного рекомбинантным способом полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации фрагмент полипептида может содержать цепь аминокислот, длина которой составляет от по меньшей мере 5 до приблизительно 500 аминокислот. Следует понимать, что согласно некоторым вариантам реализации длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. В частности, подходящие фрагменты полипептидов включают функциональные домены, в том числе антигенсвязывающие домены или фрагменты антител. В случае антитела мыши против BCMA подходящие фрагменты включают, не ограничиваясь перечисленными: область CDR, область CDR3 тяжелой или легкой цепи; вариабельную область тяжелой или легкой цепи; часть цепи антитела или вариабельной области, включающую две области CDR; и т.п.

Полипептид может также быть соединен внутри рамки или конъюгирован с линкером или другой последовательностью для упрощения синтеза, очищения или идентификации указанного полипептида (*например,* поли-His), или для улучшения связывания указанного полипептида с твердой подложкой.

Как отмечалось выше, полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть изменены различным образом, в том числе путем замены аминокислот, удалений аминокислот, усечений и вставок. Способы осуществления таких манипуляций

общеизвестны в данной области техники. Например, варианты последовательности аминокислот референсного полипептида могут быть получены путем введения мутаций в ДНК. Способы осуществления мутагенеза и изменения последовательностей нуклеотидов хорошо известны в данной области техники. См., например, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), патент США № 4873192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и цитируемые в них источники. Руководство по осуществлению подходящих замен аминокислот, не влияющих на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в модели Dayhoff и др. (Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)).

Согласно некоторым вариантам реализации вариант содержит консервативные замены. «Консервативная замена» представляет собой замену, при которой аминокислоту заменяют другой аминокислотой, отличающейся аналогичными свойствами, так что специалист в области химии пептидов может предположить, что вторичная структура и гидропатические характеристики указанного полипептида по существу не изменяются. Структура полинуклеотидов и полипептидов согласно настоящему изобретению может подвергаться модификациям, однако при этом они могут быть представлены функциональной молекулой, которая кодирует вариант или производное полипептида с требуемыми характеристиками. В тех случаях, когда требуется изменить последовательность аминокислот полипептида для получения эквивалента, или же для получения усовершенствованного варианта полипептида согласно настоящему изобретению, специалист в данной области техники, например, может изменить один или более кодонов кодирующей последовательности ДНК, например, в соответствии с таблицей 1.

ТАБЛИЦА 1. Аминокислотные кодоны

Аминокислоты	**Однобуквенный код**	**Трехбуквенный код**	**Кодоны**			
Аланин	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCU

Цистеин	C	Cys	UGC	UGU				
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAC	GAU				
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA	GAG				
Фенилаланин	F	Phe	UUC	UUU				
Глицин	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGU		
Гистидин	H	His	CAC	CAU				
Изолейцин	I	Iso	AUA	AUC	AUU			
Лизин	K	Lys	AAA	AAG				
Лейцин	L	Leu	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Метионин	M	Met	AUG					
Аспарагин	N	Asn	AAC	AAU				
Пролин	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCU		
Глутамин	Q	Gln	CAA	CAG				

Аргинин	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Серин	S	Ser	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Треонин	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACU		
Валин	V	Val	GUA	GUC	GUG	GUU		
Триптофан	W	Trp	UGG					
Тирозин	Y	Tyr	UAC	UAU				

При определении остатков аминокислот, которые могут быть заменены, встроены или удалены без потери биологической активности, можно использовать компьютерные программы, хорошо известные в данной области техники, такие как программное обеспечение DNASTAR™. Предпочтительно, изменения аминокислот во вариантах белков согласно описанию в настоящем документе представляют собой консервативные изменения аминокислот, *m. e.* замены на аналогичным образом заряженные или незаряженные аминокислоты. Консервативное изменение аминокислоты включает замену на одну аминокислоту из семейства родственных по боковым цепям аминокислот. Встречающиеся в природе аминокислот обычно разделяют на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в класс ароматических аминокислот. Подходящие консервативные замены аминокислот в пептидах или белках известны специалистам в данной области техники и обычно могут быть осуществлены без изменения биологической активности итоговой молекулы. Специалистам в данной области

техники будет понятно, что, в общем случае, одиночные замены аминокислот в некритических областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см., например, Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Примеры консервативных замен описаны в предварительной заявке на патент США № 61/241647, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

При осуществлении таких изменений может учитываться индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот для обеспечения интерактивной биологической функции белка хорошо известна в данной области техники (см. источник: Kyte and Doolittle, 1982, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Каждой аминокислоте было присвоено значение индекса гидропатичности на основании характеристик гидрофобности и заряда (Kyte and Doolittle, 1982). Указанные значения: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

В данной области техники известно, что определенные аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты с аналогичным индексом или показателем гидропатичности с получением белка, обладающего аналогичной биологической активностью, *т. е.* с получением биологически функционально эквивалентного белка. При осуществлении таких изменений предпочтительна замена на аминокислоты, отличия индексов гидропатичности которых находятся в пределах ±2, предпочтительнее – в пределах ±1, еще более предпочтительно – в пределах ±0,5. В данной области техники также известно, что эффективная замена сходных аминокислот может осуществляться на основании гидрофильности.

Согласно подробному описанию в патенте США №4554101 остаткам аминокислот были присвоены следующие значения показателей гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 ± 1); глутамат (+3,0 ± 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (–0,4); пролин (–0,5 ± 1); аланин (–0,5); гистидин (–0,5); цистеин (–1,0); метионин (–1,3); валин (–1,5); лейцин (–1,8); изолейцин (–1,8); тирозин (–2,3); фенилаланин (–2,5); триптофан (–3,4). Следует понимать, что

аминокислота может быть заменена на другую аминокислоту, имеющую аналогичный показатель гидрофильности, с сохранением биологической эквивалентности, в частности, иммунологической эквивалентности белка. При осуществлении таких изменений предпочтительной является замена на аминокислоты, отличия показателя гидрофильности которых не превышают ±2, предпочтительнее – не превышают ±1, еще более предпочтительно – не превышают ±0,5.

Согласно описанию выше, замены аминокислот могут осуществляться на основании относительного сходства заместителей боковых цепей аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и т.п.

Варианты полипептидов также включают гликозилированные формы, агрегированные конъюгаты с другими молекулами и ковалентные конъюгаты с неродственными фрагментами химических соединений (*например,* пегилированные молекулы). Ковалентные варианты могут быть получены путем соединения функциональных групп с группами, локализованными в цепи аминокислот, или с N-концевым или С-концевым остатком, как известно в данной области техники. Варианты также включают аллельные варианты, видовые варианты и мутеины. Варианты также включают усечения или удаления областей, который не влияют на функциональную активность белков.

Согласно одному варианту реализации, если необходима экспрессия двух или более полипептидов, кодирующие их последовательности полинуклеотидов могут быть разделены последовательностью IRES согласно описанию в тексте настоящего документа. Согласно другому варианту реализации два или более полипептида могут быть экспрессированы в виде гибридного белка, который содержит одну или более последовательностей саморасщепляющихся полипептидов.

Полипептиды согласно настоящему изобретению включают гибридные полипептиды. Согласно предпочтительным вариантам реализации предложены гибридные полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие гибридные полипептиды, например, рецепторы CAR. «Гибридные полипептиды» и «гибридные белки» относятся к полипептиду, содержащему по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, или десять или более полипептидных сегментов. В гибридных полипептидах, как правило, С-конец соединен с N-концом, хотя может быть также

соединен С-конец с С-концом, N-конец с N-концом, или N-конец с С-концом. Полипептиды гибридного белка могут располагаться в любом порядке или в определенном порядке. Гибридные полипептиды или гибридные белки могут также включать консервативно модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, субпоследовательности и межвидовые гомологи, при условии, что сохраняется нужная транскрипционная активность гибридного полипептида. Гибридные полипептиды могут быть получены с применением способов химического синтеза или посредством химического связывания двух фрагментов; или могут в целом быть получены с применением других стандартных техник. Лигированные последовательности ДНК, содержащие гибридный полипептид, функционально связывают с подходящими элементами контроля транскрипции или трансляции согласно описанию в тексте настоящего документа.

Согласно одному варианту реализации партнер для гибридизации содержит последовательность, способствующую большей экспрессии белка (экспрессионный энхансер) по сравнению экспрессией природного рекомбинантного белка. Другие партнеры для гибридизации могут быть выбраны таким образом, чтобы повышать растворимость белка, или обеспечивать нацеливание белка в требуемые внутриклеточные компартменты, или облегчать транспорт гибридного белка через мембрану клетки.

Гибридные полипептиды могут дополнительно содержать сигнал расщепления полипептида между всеми полипептидными доменами, описанными в настоящем документе. Кроме того, полипептидный сайт может быть помещен в любую линкерную пептидную последовательность. Примеры сигналов расщепления полипептидов включают сайты распознавания для расщепления полипептидов, такие как сайты расщепления протеазами, сайты расщепления нуклеазами (*например,* редкие сайты распознавания рестрикционными ферментами, сайты распознавания саморасщепляющегося рибозима) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (см. deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Подходящие сайты расщепления протеазами и саморасщепляющиеся пептиды известны специалистам в данной области техники (*см., например,* Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.* (2004) Nature Biotech. 5, 589-594). Примеры сайтов расщепления протеазами включают, не ограничиваясь перечисленными, сайты

расщепления потивирусными протеазами NIa (*например,* вируса гравировки табака протеаза), потивирусными протеазами HC, потивирусными протеазами P1 (P35), байовирусными протеазами NIa, байовирусными РНК-2-кодируемыми протеазами, афтовирусными протеазами L, энтеровирусными протеазами 2A, риновирусными протеазами 2A, пикорнавирусными протеазами 3C, комовирусными протеазами 24K, неповирусными протеазами 24K, RTSV (сферического вируса риса тунгро) 3C-подобной протеазой, 3C-подобной протеазой PYVF (вируса желтой пятнистости пастернака), гепарином, тромбином, фактором Xa и энтерокиназой. Ввиду высокой строгости условий расщепления, согласно одному варианту реализации предпочтительными являются сайты расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака), например, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 23), например, ENLYFQG (SEQ ID NO: 24) и ENLYFQS (SEQ ID NO: 25), где X представляет собой любую аминокислоту (расщепление TEV происходит между Q и G, или Q и S).

Согласно конкретному варианту реализации саморасщепляющиеся пептиды включают последовательности таких полипептидов, полученные из потивирусных и кардиовирусных 2A-пептидов, FMDV (вируса энтеровирусного везикулярного стоматита), вируса конского ринита A, вируса Thosea asigna и тешовируса свиней.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный сайт саморасщепляющегося полипептида включает 2A-сайт или 2A-подобный сайт, последовательность или домен (Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041).

ТАБЛИЦА 2. Примеры сайтов 2A включают следующие последовательности:

SEQ ID NO: 26	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 27	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 28	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO:	NFDLLKLAGDVESNPGP

29	
SEQ ID NO: 30	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 31	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 32	VTELLYRMKRAETYCPRPLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQT
SEQ ID NO: 33	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 34	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 35	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

Согласно предпочтительным вариантам реализации полипептид, предусмотренный настоящим изобретением, включает полипептид CAR.

E. Полинуклеотиды

Согласно предпочтительным вариантам реализации предложен полинуклеотид, кодирующий один или более полипептидов CAR, например, SEQ ID NO: 10. В настоящем документе термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к матричной РНК (мРНК), РНК, геномной РНК (гРНК), плюс-цепи РНК (РНК(+)), минус-цепи РНК (РНК(-)), геномной ДНК (гДНК), комплементарной ДНК (кДНК) или рекомбинантной ДНК. Полинуклеотиды включают однонитевые и двунитевые полинуклеотиды. Предпочтительно, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению включают полинуклеотиды или варианты, отличающиеся по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей каким-либо референсным

последовательностям, описанным в настоящем документе (*см., например,* перечень последовательностей); при этом, как правило, у указанного варианта сохраняется по меньшей мере один вид биологической активности референсной последовательности. Согласно различным иллюстративным вариантам реализации настоящее изобретение предусматривает, в том числе, полинуклеотиды, содержащие экспрессионные векторы, вирусные векторы и плазмиды для переноса, а также содержащие их композиции и клетки.

Согласно конкретным вариантам реализации в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере приблизительно 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 или 2000 или более последовательных остатков аминокислот полипептида согласно настоящему изобретению, а также все продукты промежуточной длины. Легко понять, что «продукты промежуточной длины» в указанном контексте означает любую длину в диапазоне между указанными значениями, например, 6, 7, 8, 9 и т.п., 101, 102, 103 и т.п.; 151, 152, 153 и т.п.; 201, 202, 203 и т.п.

В настоящем документе термины «вариант полинуклеотида», «вариант» и т.п. относятся к полинуклеотидам, последовательности которых в существенной степени идентичны референсной последовательности полинуклеотидов, или полинуклеотиды, которые гибридизуются с референсной последовательностью в жестких условиях, определенных здесь и далее в настоящем документе. Указанные термины включают полинуклеотиды, в которых, по сравнению с референсным полинуклеотидом, добавлены или удалены, или заменены на другие нуклеотиды один или более нуклеотидов. При этом в данной области техники хорошо известно, что при внесении в референсный полинуклеотид определенных изменения, в том числе мутаций, добавлений, удалений и замен, измененный полинуклеотид может сохранять биологическую функцию или активность референсного полинуклеотида.

Используемые в настоящем документе термины «идентичность последовательностей» или, например, «идентичная на 50% последовательность», относятся к степени идентичности расположения нуклеотидов или аминокислот в указанных последовательностях в рамках окна сравнения. Соответственно, «процент идентичности последовательностей» может быть рассчитан путем сравнения двух последовательностей после оптимального выравнивания, в рамках окна сравнения, для

определения числа положений, где в обеих последовательностях располагаются идентичные основания нуклеиновых кислот (*например,* A, T, C, G, I) или идентичные остатки аминокислот (*например,* Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met), с получением числа совпадающих положений, деления указанного числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (*т. е.* на размер окна) и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей. Включены нуклеотиды и полипептиды, отличающиеся по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей относительно любых референсных последовательностей, описанных в настоящем документе, как правило, с сохранением у варианта полипептида по меньшей мере одного вида биологической активности референсного полипептида.

Термины, используемые для описания взаимосвязи последовательностей двух или более полинуклеотидов или полипептидов включают термины «референсная последовательность», «окно сравнения», «идентичность последовательностей», «процент идентичности последовательностей» и «существенная идентичность». Длина «референсной последовательности» составляет по меньшей мере 12, но часто 15–18, и часто по меньшей мере 25 мономерных единиц, включающих нуклеотиды и остатки аминокислот. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов может содержать (1) сходную для указанных двух полинуклеотидов последовательность (т. е. только часть полной последовательности полинуклеотидов) и (2) различающуюся в указанных двух полинуклеотидах последовательность, сравнение последовательностей двух (или более) полинуклеотидов выполняют, как правило, путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов в рамках «окна сравнения» для идентификации и сравнения областей локального сходства последовательностей. Термин «окно сравнения» относится к условному сегменту, включающему по меньшей мере 6 смежных положений, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 100, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150 положений, внутри которого последовательность сравнивают с референсной последовательностью, содержащей такое же число смежных положений, после проведения оптимального выравнивания указанных двух последовательностей. Для оптимального выравнивания двух последовательностей окно сравнения может содержать приблизительно 20% или менее добавлений или удалений (т. е. пропусков) относительно референсной

последовательности (которая не содержит добавлений или удалений). Оптимальное выравнивание последовательностей в окне сравнения может быть проведено с применением компьютеризованных вариантов алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, версия 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США) или путем осмотра, и выбора наилучшего варианта выравнивания (*m. e.* дающего максимальный процент гомологии на протяжении окна сравнения), полученного с использованием любых из множества способов. Можно также упомянуть программы семейства BLAST, например, описанные в источнике: Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Подробное описание анализа последовательностей можно найти в разделе 19.3 в источнике: Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.

В настоящем документе термин «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который был выделен из последовательностей, фланкирующих его во встречающемся в природе состоянии, например, фрагменту ДНК, который был отделен от последовательностей, как правило, смежных с указанным фрагментом. «Выделенный полинуклеотид» также относится к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, не существующему в природе и полученному человеком.

Термины для описания ориентации полинуклеотидов включают: 5' (как правило, конец полинуклеотида, содержащий свободную фосфатную группу) и 3' (как правило, конец полинуклеотида содержащий свободную гидроксильную (OH) группу). Последовательности полинуклеотидов могут быть записаны в направлении 5'→3', или 3'→5'. В случае ДНК и мРНК цепь 5'→3' называют «смысловой» цепью, «плюс-цепью» или «кодирующей» цепью, поскольку ее последовательность идентична последовательности прематричной РНК (пре-мРНК) [за исключением урацила (U) в РНК вместо тимина (T) в ДНК]. В случае ДНК и мРНК комплементарная цепь 3'→5', транскрибируемая РНК-полимеразой, называется «матрицей», «антисмысловой» цепью, «минус-цепью» или «некодирующей» цепью. В настоящем документе термин «обратная ориентация» относится к последовательности 5'→3', записанной в направлении 3'→5', или последовательности 3'→5', записанной в направлении 5'→3'.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к полинуклеотидам (*т. е.* последовательности нуклеотидов), взаимосвязанным за счет принципа спаривания оснований. Например, комплементарной цепью для последовательности ДНК 5' A G T C A T G 3' является цепь 3' T C A G T A C 5'. Последнюю последовательность часто записывают как обратный комплемент, начиная с 5'-конца слева и заканчивая 3'-концом справа: 5' C A T G A C T 3'. Последовательность, одновременно являющуюся и собственным обратным комплементов, называют палиндромной последовательностью. Комплементарность может быть «частичной», в этом случае только некоторые основания нуклеиновых кислот соответствуют принципу спаривания оснований. Также может наблюдаться «полная», или «тотальная» комплементарность нуклеиновых кислот.

Кроме того, специалистам в данной области техники будет понятно, что ввиду вырожденности генетического кода существует множество последовательностей нуклеотидов, которые кодируют полипептид согласно описанию в настоящем документе, либо его фрагмент или вариант. Некоторые из указанных полинуклеотидов отличаются минимальной степенью гомологии в отношении последовательности нуклеотидов какого-либо встречающегося в природе гена. Тем не менее, настоящим изобретением предусмотрены, в частности, полинуклеотиды, состав которых варьирует за счет различий в использовании кодонов, например, полинуклеотиды, кодон-оптимизированные для применения у человека и/или примата. Кроме того, могут также применяться аллели генов, содержащих предложенные в настоящем изобретении последовательности полинуклеотидов. Аллели представляют собой эндогенные гены, измененные в результате одной или более мутаций, например, в результате удалений, добавлений и/или замен нуклеотидов.

Термин «кассета с нуклеиновой кислотой» в настоящем документе относится к генетическим последовательностям в составе вектора, с которых может экспрессироваться РНК, а затем белок. Кассета с нуклеиновой кислотой содержит представляющий интерес ген, например, ген CAR. Кассета с нуклеиновой кислотой расположена и ориентирована в последовательности вектора таким образом, что нуклеиновая кислота из указанной кассеты может быть транскрибирована в РНК, и при необходимости транслирована в белок или полипептид, подвергаться надлежащим посттрансляционным модификациям, необходимым для обеспечения активности в

трансформированной клетке, и транслоцироваться в подходящий компартмент для осуществления биологической активности путем нацеливания на подходящие внутриклеточные компартменты или секреции во внеклеточные компартменты. Предпочтительно, 3'-конец и 5'-конец указанной кассеты сконструированы таким образом, чтобы обеспечивать легкое встраивание в вектор, например, на обоих концах указанной кассеты содержатся сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения указанная кассета с нуклеиновой кислотой содержит последовательность химерного антигенного рецептора, применяемого для лечения В-клеточного злокачественного новообразования. Указанная кассета может быть выделена и встроена в плазмиду или вирусный вектор в виде единого целого.

Согласно конкретным вариантам реализации полинуклеотиды включают по меньшей мере один представляющий интерес полинуклеотид. В настоящем документе термин «представляющий интерес полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид (*т. е.* представляющий интерес полипептид), встроенный в экспрессионный вектор, который требуется экспрессировать. Вектор может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 представляющих интерес полинуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации представляющий интерес полинуклеотид кодирует полипептид, который обеспечивает терапевтический эффект при лечении или предотвращении заболевания или расстройства. Представляющие интерес полинуклеотиды и кодируемые ими полипептиды включают как полинуклеотиды, которые кодируют полипептиды дикого типа, так и их функциональные варианты и фрагменты. Согласно конкретным вариантам реализации функциональный вариант отличается по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 99% идентичностью соответствующей референсной последовательности полинуклеотида или полипептида дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации функциональный вариант или фрагмент отличается по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% биологической активности соответствующего полипептида дикого типа.

Согласно одному варианту реализации представляющий интерес полинуклеотид не кодирует полипептид, однако служит в качестве матрицы для транскрипции микроРНК, миРНК или мшРНК, рибозима или другой ингибиторной РНК. Согласно

различным другим вариантам реализации полинуклеотид включает представляющий интерес полинуклеотид, кодирующий CAR и один или более дополнительных представляющих интерес полинуклеотидов, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, ингибирующую последовательность нуклеиновой кислоты, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными: миРНК, микроРНК, мшРНК и рибозим.

В настоящем документе термины «миРНК», или «малая интерферирующая РНК» относятся к короткой последовательности полинуклеотидов, которая опосредует процесс специфического в отношении последовательности посттранскрипционного сайленсинга генов, трансляционного ингибирования, транскрипционного ингибирования или эпигенетической РНК-интерференции у животных (Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25–33; Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et al.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et al.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13, 139-141; и Strauss, 1999, *Science*, 286, 886). Согласно некоторым вариантам реализации миРНК содержит первую цепь и вторую цепь, содержащую такое же число нуклеозидов; однако первая и вторая цепи разнесены таким образом, что два концевых нуклеозида на первой и на второй цепях не спарены с остатком на комплементарной цепи. В некоторых случаях два неспаренных нуклеозида представлены остатками тимидина. Указанная миРНК должна включать область, в достаточной степени гомологичную целевому гену, и содержать достаточное число нуклеотидов для того, чтобы указанная миРНК или ее фрагмент могли опосредовать понижающую регуляцию целевого гена. Соответственно, миРНК включает область, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК. Абсолютная комплементарность миРНК и мишени не является обязательной, однако соответствие должно быть достаточным, чтобы позволять миРНК или продукту ее расщепления направлять специфический сайленсинг последовательности, например, за счет расщепления целевой РНК в ходе РНК-интерференции. Комплементарность, или степень гомологии целевой цепи, имеет наибольшее значение для антисмысловой цепи. Хотя часто необходима абсолютная комплементарность, в частности, в антисмысловой цепи, некоторые варианты реализации включают одно или более, однако предпочтительно 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 или меньшее число несовпадений с целевой РНК. Указанные несовпадения допустимы главным образом в концевых областях, и, при их наличии, предпочтительно расположены в концевой(ых) области или областях, например, в пределах 6, 5, 4 или 3 5'-концевых и/или 3'-концевых нуклеотидов. Необходимо лишь, чтобы смысловая цепь

была комплементарна антисмысловой цепи в достаточной степени для сохранения общей двуцепочечной структуры молекулы.

Кроме того, миРНК может быть модифицирована или может включать аналоги нуклеозидов. Одноцепочечные области миРНК могут быть модифицированы или могут включать аналоги нуклеозидов, например, неспаренную область или области со шпилечной структурой, например, область, соединяющая две комплементарных области, может содержать модификации или аналоги нуклеозидов. Также могут быть полезны модификации, направленные на стабилизацию одного или более из 3'- или 5'-концов миРНК, например, для защиты от экзонуклеаз, или способствующие входу агента в виде антисмысловой миРНК в RISC. Модификации могут включать C3 (или C6, C7, C12) аминолинкеры, тиольные линкеры, карбоксильные линкеры, ненуклеотидные спейсеры (C3, C6, C9, C12, спейсеры с удаленными основаниями, триэтиленгликоль, гексаэтиленгликоль), специфические биотиновые или флуоресцеиновые реагенты в форме фосфорамидитов и имеющие дополнительную DMT-защищенную гидроксильную группу, что обеспечивает неоднократное связывание при синтезе РНК. Длина каждой нити миРНК может составлять 30, 25, 24, 23, 22, 21 или 20 нуклеотидов или менее. Предпочтительно длина указанной нити составляет по меньшей мере 19 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять от 21 до 25 нуклеотидов. Предпочтительные миРНК содержат дуплексную область из 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов, и один или более липких концов из 2–3 нуклеотидов, предпочтительно один или два липких конца из 2–3 3'-выступающих нуклеотидов.

В настоящем документе термин «микроРНК» относится к малым некодирующим РНК длиной 20–22 нуклеотида, как правило, вырезаемым из самогибридизирующихся структур пре-РНК размером ~70 нуклеотидов, известных как пре-микроРНК. микроРНК негативно регулируют свои мишени посредством одного из двух способов в зависимости от степени комплементарности указанной микроРНК и мишени. Во-первых, микроРНК которые связываются с кодирующими белки последовательностями мРНК с абсолютной или практически абсолютной комплементарностью, индуцируют путь РНК-опосредованной интерференции (РНК-интерференция). микроРНК, осуществляющие регуляторные эффекты посредством связывания с комплементарными не полностью сайтами в составе нетранслируемых 3'-областей

(UTR) их мРНК-мишеней, подавляют экспрессию целевых генов пост-транскрипционно, предположительно, на уровне трансляции, задействуя комплекс RISC, аналогичный или, возможно, идентичный комплексу RISC, задействованному в пути РНК-интерференции. В соответствии с версией трансляционного контроля, микроРНК, задействующие указанный механизм, снижают уровни белков, соответствующих их целевым генам, однако при этом уровни мРНК указанных генов изменяются в минимальной степени. микроРНК включают как встречающиеся в природе микроРНК, так и сконструированные искусственным путем микроРНК, которые могут быть нацелены на любую специфическую последовательность мРНК. Например, согласно одному варианту реализации специалист может сконструировать короткие шпилечные РНК- конструкции, экспрессируемые в виде первичных транскриптов микроРНК человека (*например,* miR-30 или miR-21). В шпилечную конструкцию указанного дизайна добавляют сайт процессинга ферментом Drosha, что, как было показано, значительно повышает эффективность нокдауна (Pusch *et al.*, 2004). «Стебель» шпильки состоит из 22 нуклеотидов дцРНК (*например,* антисмысловой последовательности с абсолютной комплементарностью нужной мишени) и петлю размером 15–19 нуклеотидов из микроРНК человека. Добавление петли микроРНК и фланкирующих последовательностей miR30 с любой стороны или с обеих сторон шпильки приводит к более чем 10-кратному повышению уровня процессинга ферментами Drosha и Dicer экспрессированных шпилек по сравнению с стандартными конструкциями мшРНК без микроРНК. Повышение уровней процессинга ферментами Drosha и Dicer приводит к увеличению синтеза миРНК/микроРНК и большей активности экспрессированных шпилек.

В настоящем документе термины «мшРНК» или «короткая шпилечная РНК» относятся к двуцепочечной структуре, образованной одной самокомплементарной цепью РНК. Конструкции мшРНК, содержащие последовательность нуклеотидов, идентичную части либо кодирующей, либо некодирующей последовательности целевого гена, являются предпочтительными для ингибирования. Последовательности РНК, содержащие вставки, удаления и одиночные точечные мутации относительно целевой последовательности, также, как было обнаружено, эффективны для ингибирования. Предпочтительными являются последовательности ингибиторной РНК, идентичные части целевого гена более чем на 90%, или даже идентичные на 100%. Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации длина образующей дуплекс

части мшРНК составляет по меньшей мере 20, 21 или 22 нуклеотидов, например, соответствует по размеру РНК-продуктам, синтезируемым при Dicer-зависимом расщеплении. Согласно некоторым вариантам реализации длина указанной конструкции мшРНК составляет по меньшей мере 25, 50, 100, 200, 300 или 400 оснований. Согласно некоторым вариантам реализации длина указанной конструкции мшРНК составляет 400–800 оснований. Конструкции мшРНК в значительной степени толерантны к вариациям последовательности и размера петли.

В настоящем документе термин «рибозим» относится к каталитически активной молекуле РНК, способной к сайт-специфическому расщеплению целевой мРНК. Было описано несколько подтипов рибозимов, например, рибозимы вида «головка молотка» и шпилечные рибозимы. Каталитическая активность и стабильность рибозима могут быть повышены путем замены дезоксирибонуклеотидов на рибонуклеотиды в сайтах, не обладающих каталитической активностью. Несмотря на то, что для разрушения конкретных мРНК возможно применение рибозимов, которые расщепляют мРНК в участках сайт-специфического распознавания последовательностей, предпочтительно применение рибозимов вида «головка молотка». Рибозимы вида «головка молотка» расщепляют мРНК в положениях, определяемых фланкирующими областями, которые образуют комплементарные пары оснований с целевой мРНК. Единственным требованием является содержание в целевой мРНК следующей последовательности из двух оснований: 5′-UG-3′. Конструирование и получение рибозимов вида «головка молотка» хорошо известно в данной области техники.

Предпочтительный способ доставки представляющего интерес полинуклеотида, который содержит миРНК, микроРНК, мшРНК или рибозим, включает одну или более регуляторные последовательности, такие как, например, сильный конститутивный промотор pol III, например, промотор U6 мяРНК человека, промотор U6 мяРНК мыши, промотор H1 РНК человека и мыши, промотор tRNA-val человека или сильный конститутивный промотор pol II, согласно описанию в тексте настоящего документа.

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, независимо от длины собственно кодирующей последовательности, могут быть скомбинированы с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты рестрикции ферментами, сайты

множественного клонирования, внутренние сайты связывания рибосомы (IRES), сайты распознавания рекомбиназой (*например,* сайты LoxP, FRT и Att), кодоны терминации, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, описанные в различных разделах в настоящем документе или известные в данной области техники; таким образом, их общая длина может существенно варьировать. Соответственно, предполагается, что возможно применение фрагмента полинуклеотида практически любой длины, причем общая длина, предпочтительно, ограничена легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК.

Получение полинуклеотидов, манипуляции с полинуклеотидами и/или экспрессия полинуклеотидов могут осуществляться с применением любых из множества общепринятых техник, известных и доступных в данной области техники. Для экспрессии требуемого полипептида кодирующая указанный полипептид последовательность нуклеотидов может быть встроена в подходящий вектор. Примерами векторов являются плазмиды, автономно реплицирующиеся последовательности и транспозируемые элементы. Дополнительные примеры векторов включают, без ограничения, плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома на основе P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, подходящих для применения в качестве векторов, включают, без ограничения, ретровирусы (в том числе лентивирус), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы (*например,* вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (*например,* SV40). Примерами экспрессионных векторов являются векторы pClneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусами переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. Согласно конкретным вариантам реализации кодирующие последовательности гибридных белков согласно описанию в настоящем документе могут быть лигированы в такие экспрессионные векторы для экспрессии указанного гибридного белка в клетках млекопитающих.

Согласно одному варианту реализации вектор, кодирующий CAR, предусмотренный настоящим изобретением, содержит последовательность полинуклеотидов, представленную в последовательности SEQ ID NO: 36.

Согласно конкретным вариантам реализации указанный вектор представляет собой эписомный вектор или вектор, поддерживаемый экстрахромосомно. В настоящем документе термин «эписомный» относится к вектору, способному реплицироваться без интеграции в хромосомную ДНК хозяина и без постепенной утраты при делении клетки-хозяина, и также означает, что указанный вектор реплицируется экстрахромосомно или эписомально. Указанный вектор конструируют таким образом, что он содержит последовательность, кодирующую точку начала репликации ДНК, или «ori», из лимфотропного герпесвируса или гамма-герпесвируса, аденовируса, SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, или дрожжей, в частности, точку начала репликации лимфотропного герпесвируса или гамма-герпесвируса, соответствующую oriP EBV. Согласно конкретному аспекту указанный лимфотропный герпесвирус может представлять собой вирус Эпштейна-Барр (EBV), герпесвирус саркомы Капоши (KSHV), вирус герпеса саймири (HS) или вирус болезни Марека (MDV). Вирус Эпштейна-Барр (EBV) и герпесвирус саркомы Капоши (KSHV) также являются примерами гамма-герпесвирусов. Как правило, клетка-хозяин содержит трансактиваторный белок вирусной репликации, активирующий репликацию.

«Контрольные элементы» («элементы контроля») или «регуляторные последовательности», присутствующие в экспрессионном векторе, представляют собой нетранслируемые области вектора – точку начала репликации, селекционные кассеты, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность Козак), интроны, последовательность полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемые области, которые взаимодействуют с белками клетки-хозяина при осуществлении транскрипции и трансляции. Эффективность и специфичность таких элементов может варьировать. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина может применяться любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, в том числе универсальные промоторы и индуцируемые промоторы.

Согласно конкретным вариантам реализации векторы для применения при практической реализации настоящего изобретения, в том числе, но не ограничиваясь

перечисленными, экспрессионные векторы и вирусные векторы, содержат экзогенные, эндогенные или гетерологичные последовательности контроля, такие как промоторы и/или энхансеры. «Эндогенная» последовательность контроля представляет собой последовательность контроля, в естественных условиях соединенную с определенным геном в геноме. «Экзогенная» последовательность контроля представляет собой последовательность контроля, помещенную непосредственно рядом с геном посредством генетической манипуляции (*m. e.* молекулярно-биологических техник) таким образом, что транскрипцию указанного гена направляет присоединенный энхансер/промотор. «Гетерологичная» последовательность контроля представляет собой экзогенную последовательность, которая относится не к тому виду, к которому относится клетка, с которой проводят генетические манипуляции.

Термин «промотор» в настоящем документе относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК- полимераза. РНК-полимераза инициирует и транскрибирует полинуклеотиды, функционально связанные с промотором. Согласно конкретным вариантам реализации промоторы, функционирующие в клетках млекопитающих, содержат богатую АТ область, расположенную на расстоянии приблизительно 25–30 оснований в 5'-направлении от сайта инициации транскрипции, и/или другую последовательность, расположенную на расстоянии 70–80 оснований в 5'-направлении от начала транскрипции, область CNCAAT, где е N может представлять собой любой нуклеотид.

Термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать повышенную транскрипцию и в некоторых случаях способные функционировать независимо от их ориентации относительно другой последовательности контроля. Энхансер может функционировать совместно с промоторами и/или другими энхансерными элементами, или дополнять их действие. Термин «промотор/энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные выполнять функции как промотора, так и энхансера.

Термин «функционально связанный» относится к расположению описываемых компонентов в непосредственной близости, при этом взаимосвязанных таким образом, что обеспечивается их надлежащее функционирование. Согласно одному варианту реализации термин относится к функциональной связи последовательности контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер) и второй

последовательности полинуклеотидов, например, представляющего интерес полинуклеотида, при этом указанная последовательность контроля экспрессии направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В настоящем документе термин «конститутивная последовательность контроля экспрессии» относится к промотору, энхансеру или промотору/энхансеру, который обеспечивает непрерывную или последовательную транскрипцию функционально связанной последовательности. Конститутивная последовательность контроля экспрессии может представлять собой либо «универсальный» промотор, энхансер или промотор/энхансер, обеспечивающий экспрессию в широком диапазоне типов клеток и тканей, либо «клеточно-специфический», «специфический в отношении типа клеток», «специфический в отношении линии клеток» или «тканеспецифический» промотор, энхансер или промотор/энхансер, обеспечивающий экспрессию, ограниченную определенным диапазоном типов клеток и тканей, соответственно.

Иллюстративные универсальные последовательности контроля экспрессии, подходящие для применения согласно конкретным вариантам реализации согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными, немедленный ранний промотор цитомегаловируса (ЦМВ), промотор вируса обезьян 40 (SV40) (*например,* ранний или поздний), LTR- промотор вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназный), промоторы H5, P7.5 и P11 вируса осповакцины, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), белка раннего ответа на факторы роста 1 (EGR1), ферритина H (FerH), ферритина L (FerL), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), фактора инициации трансляция эукариот 4A1 (EIF4A1), белка теплового шока-5 массой 70 кДа (HSPA5), белка 1 семейства белков теплового шока-β массой 90 кДа (HSP90B1), белков теплового шока 70 кДа (HSP70), β-кинезина (β-KIN), локус ROSA 26 человека (Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477–1482 (2007)), промотор убиквитина C (UBC), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), энхансер цитомегаловируса/промотор β-актина курицы (CAG), промотор β-актина и промотор, содержащий энхансер миелопролиферативного вируса саркомы с удаленной областью отрицательного контроля заменой на сайт связывания праймера dl587rev (MND-промотор) (Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995)).

Согласно одному варианту реализации вектор для применения в настоящем изобретении включает MND-промотор.

Согласно одному варианту реализации вектор для применения в настоящем изобретении включает промотор EF1a, содержащий первый интрон гена EF1a человека.

Согласно одному варианту реализации вектор в настоящем изобретении включает промотор EF1a, в котором отсутствует первый интрон гена EF1a человека.

Согласно конкретному варианту реализации может быть желательным экспрессировать полинуклеотид, содержащий CAR, под контролем специфического Т-клеточного промотора.

В настоящем документе «условная экспрессия» может относиться к любому типу условной экспрессии, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, индуцируемой экспрессии; репрессируемой экспрессии; экспрессии в клетках или тканях, отличающихся конкретным физиологическим, биологическим или болезненным состоянием и т.п. Указанное определение не подразумевает исключения специфической для типа клеток или ткани экспрессии. Определенные варианты реализации настоящего изобретения предусматривают условную экспрессию представляющего интерес полинуклеотида, *например,* экспрессию, контролируемую путем воздействия на клетку, ткань, организм и т.п. лечением или условиями, приводящими к экспрессии полинуклеотида, или приводящими к повышению или снижению экспрессии полинуклеотида, кодируемого представляющим интерес полинуклеотидом.

Иллюстративные примеры индуцируемых промоторов/систем включают, не ограничиваясь перечисленными, индуцируемые стероидами промоторы, такие как промоторы генов, кодирующих рецепторы глюкокортикоидов или эстрогенов (индуцируемые путем лечения/обработки соответствующим гормоном), промотор металлотионеина (индуцируемый путем лечения/обработки различными тяжелыми металлами), промотор MX-1 (индуцируемый интерфероном), регулируемая мифепристоном система «GeneSwitch» (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), кумат-индуцируемый генный переключатель (WO 2002/088346), тетрациклин-зависимые регуляторные системы и т.п.

Условная экспрессия может также обеспечиваться с применением сайт-специфической ДНК-рекомбиназы. В соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения вектор содержит по меньшей мере один сайт (как правило, два сайта) рекомбинации, опосредованной сайт-специфической рекомбиназой. В настоящем документе термины «рекомбиназа» или «сайт-специфическая рекомбиназа» включают эксцизионные белки или интеграционные белки, ферменты, кофакторы или связанные белки, которые вовлечены в реакции рекомбинации, включающие один или более сайтов рекомбинации (*например,* два, три, четыре, пять, семь, десять, 12, 15, 20, 30, 50 и т.п.), которые могут представлять собой белки дикого типа (см. Landy, Current Opinion in Biotechnology 3:699-707 (1993)), или их мутантные формы, производные (*например,* гибридные белки, содержащие последовательности белков рекомбинации или их фрагменты), фрагменты и варианты. Иллюстративные примеры рекомбиназ, подходящих для применения согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленными: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, ФС31, Cin, резольвазу Tn3, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 и ParA.

Векторы могут содержать один или более сайтов рекомбинации любой из широкого спектра сайт-специфических рекомбиназ. Следует понимать, что целевой сайт сайт-специфической рекомбиназы присутствует в качестве дополнительного, наряду любым(и) сайтов(ами), необходимым(и) для интеграции вектора, например, ретровирусного вектора или лентивирусного вектора. В настоящем документе термины «последовательность рекомбинации», «сайт рекомбинации» или «сайт сайт-специфической рекомбинации» относятся к конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, которую распознает и связывает рекомбиназа.

Например, одним из сайтов рекомбинации рекомбиназой Cre является loxP, который представляет собой последовательность размером 34 пар оснований, содержащую два инвертированных повтора размером 13 пар оснований (которые служат в качестве сайтов связывания рекомбиназой), фланкирующих коровую последовательность размером 8 пар оснований (*см. фиг.* 1 в источнике: Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Другие примеры сайтов loxP включают, не ограничиваясь перечисленными: lox511 (Hoess *et al.*, 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer *et al.*, 2002), lox71 (Albert *et al.*, 1995) и lox66 (Albert *et al.*, 1995).

Подходящие сайты распознавания рекомбиназой FLP включают, не ограничиваясь перечисленными: FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F_1, F_2, F_3 (Schlake and Bode, 1994), F_4, F_5 (Schlake and Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE) (Senecoff *et al.*, 1988).

Другими примерами последовательностей распознавания являются последовательности attB, attP, attL и attR, распознаваемые рекомбиназным ферментом интегразой λ, например, phi-c31. Сайт-специфическая рекомбиназа (SSR) φC31 опосредует рекомбинацию только между гетеротипными сайтами attB (длиной 34 п.о.) и attP (длиной 39 п.о.) (Groth *et al.*, 2000). Сайты attB *и* attP, названные так, поскольку они представляют собой сайты присоединения («attachment sites») фаговой интегразы в бактериальных и фаговых геномах; соответственно, оба указанных сайта содержат неабсолютные инвертированные повторы, предположительно, связываемые гомодимерами φC31 (Groth *et al.*, 2000). Итоговые сайты, attL и attR, фактически инертны в отношении дальнейшей φC31-опосредованной рекомбинации (Belteki *et al.*, 2003), что делает указанную реакцию необратимой. Что касается катализирующих вставок, было обнаружено, что несущая attB ДНК встраивается в геномный сайт attP легче, чем сайт attP в геномный сайт attB (Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). Соответственно, типичные стратегии включают размещение в определенном локусе посредством гомологичной рекомбинации несущего attP «сайта докинга» (сайта стыковки), который затем связывается со встраиваемой несущей attB последовательностью.

В настоящем документе термин «участок внутренней посадки рибосомы», или «IRES» относится к элементу, который способствует непосредственному входу рибосомы в кодон инициации внутреннего цистрона (кодирующей белок области), такой как ATG, таким образом обеспечивая кэп-независимую трансляцию гена. *См., например,* Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) и Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. Согласно конкретным вариантам реализации векторы, предусмотренные настоящим изобретением, включают один или более представляющих интерес полинуклеотидов, которые кодируют один или более полипептидов. Согласно конкретным вариантам реализации для достижения эффективной трансляции каждого из совокупности полипептидов последовательности полинуклеотидов могут быть разделены одной или более последовательностей IRES

или последовательностей полинуклеотидов, кодирующих саморасщепляющиеся полипептиды.

В настоящем документе термин «последовательность Козак» относится к короткой последовательности нуклеотидов, значительно облегчающей начальное связывание мРНК с малой субъединицей рибосомы и повышающей трансляцию. Консенсусная последовательность Козак представлена последовательностью (GCC)RCCATGG, где R представляет собой пурин (A или G) (Kozak, 1986. *Cell.* 44(2):283-92, и Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). Согласно конкретным вариантам реализации векторы, предусмотренные настоящим изобретением, содержат полинуклеотиды, содержащие консенсусную последовательность Козак и кодирующие требуемый полипептид, например, CAR.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в полинуклеотиде или в клетке, несущей указанный полинуклеотид, задействован «суицидальный» ген, в том числе индуцируемый «суицидальный» ген для снижения риска непосредственной токсичности и/или неконтролируемой пролиферации. Согласно конкретным аспектам «суицидальный» ген не является иммуногенным для хозяина, несущего указанный полинуклеотид или клетку. Конкретным примером подходящего для применения «суицидального» гена является каспаза-9 или каспаза-8, или цитозиндезаминаза. Каспаза-9 может быть активирована с применением специфического химического индуктора димеризации (CID).

Согласно некоторым вариантам реализации векторы содержат генные сегменты, обуславливающие чувствительность иммунных эффекторных клеток согласно настоящему изобретению, например, Т-клеток, к отрицательной селекции in vivo. Под «отрицательной селекцией» подразумевается, что инфузированная клетка может быть элиминирована в результате изменения условий, в которых находится индивидуум in vivo. Фенотип для отрицательной селекции может быть получен за счет встраивания гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, соединению. Гены для отрицательной селекции известны в данной области техники, и включают в том числе следующие: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа I (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной

аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT) и бактериальной цитозиндезаминазы (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

Согласно некоторым вариантам реализации генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, содержат полинуклеотид, дополнительно содержащий маркер для положительной селекции, позволяющий осуществлять отбор из клеток фенотипа для отрицательной селекции *in vitro*. Маркер для положительной селекции может представлять собой ген, который после введения в клетку-хозяина экспрессирует доминантный фенотип, обеспечивающий положительную селекцию клеток, несущих указанный ген. Гены указанного типа известны в данной области техники, и включают, в том числе, ген гигромицин-В фосфотрансферазы (hph), который придает устойчивость к гигромицину В, ген аминогликозидфосфотрансферазы (neo или aph) из Tn5, кодирующий устойчивость к антибиотику с G418, ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), ген аденозиндезаминазы (ADA) и ген множественной лекарственной устойчивости (MDR).

Предпочтительно, маркер для положительной селекции и элемент отрицательной селекции соединены таким образом, что утрата элемента отрицательной селекции также неизбежно сопровождается утратой маркера для положительной селекции. Еще более предпочтительно, маркеры для положительной и отрицательной селекции соединяют таким образом, что утрата одного неизбежно приводит к утрате другого. Примером гибридного полинуклеотида, экспрессионный продукт которого представлен полипептидом, обеспечивающим описанные выше необходимые как для положительной, так и для отрицательной селекции свойства, является гибридный ген гигромицинфосфотрансферазы/тимидинкиназы (HyTK). Экспрессия указанного гена дает полипептид, обеспечивающий устойчивость к гигромицину В для положительной селекции in vitro и чувствительность к ганцикловиру для отрицательной селекции in vivo. см. Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 1 1:3374-3378, 1991. Кроме того, согласно предпочтительным вариантам реализации полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, кодирующие гибридные рецепторы, входят в состав ретровирусных векторов, содержащих гибридный ген, в частности, придающий устойчивость к гигромицину В для положительной селекции in vitro и чувствительность к ганцикловиру для отрицательной селекции in vivo, например, в состав ретровирусного вектора HyTK, описанного у Lupton, S. D. et al. (1991), выше.

См. также PCT-публикации US91/08442 и PCT/US94/05601, S. D. Lupton, где описано применение бифункциональных селектируемых гибридных генов, полученных путем соединения доминантных маркеров для положительной селекции с маркерами для отрицательной селекции.

Предпочтительные маркеры для положительной селекции происходят из генов, выбранных из группы, состоящей из hph, nco, и gpt, а предпочтительные маркеры для отрицательной селекции происходят из генов, выбранных из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT и gpt. В частности, предпочтительными маркерами являются бифункциональные селектируемые гибридные гены, при этом маркер для положительной селекции происходит из hph или neo, а маркер для отрицательной селекции происходит из гена цитозиндезаминазы или тимидинкиназы (TK), или представлен индуцируемыми «суицидальными» генами.

F. Вирусные векторы

Согласно конкретным вариантам реализации клетку (*например,* иммунную эффекторную клетку) трансдуцируют ретровирусным вектором, например, лентивирусным вектором, кодирующим CAR. Например, иммунную эффекторную клетку трансдуцируют вектором, кодирующим CAR, который содержит антитело мыши против BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий полипептид BCMA, с внутриклеточным сигнальным доменом CD3ζ, CD28, 4–1BB, Ox40, или любые их комбинации. Соответственно, указанные трансдуцированные клетки могут запускать опосредованный CAR цитотоксический ответ.

Ретровирусы представляют собой стандартный инструмент для доставки генов (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455-460). Согласно конкретным вариантам реализации ретровирус применяют для доставки полинуклеотида, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), в клетку. В настоящем документе термин «ретровирус» относится к РНК-вирусу, который осуществляет обратную транскрипцию собственной геномной РНК с образованием линейной двуцепочечной ДНК-копи, а затем с помощью ковалентных связей интегрирует собственную геномную ДНК в геном хозяина. После встраивания в геном хозяина вирус называется «провирусом». Провирус служит матрицей для РНК-полимеразы II и направляет экспрессию молекул РНК, кодирующих

структурные белки и ферменты, необходимые для образования новых вирусных частиц.

Иллюстративные примеры ретровирусов, подходящих для применения согласно конкретным вариантам реализации, включают, не ограничиваясь перечисленными: вирус лейкоза мышей Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошачьих (FLV), спумавирус, вирус лейкоза мышей Френда, вирус стволовых клеток мышей (MSCV), вирус саркомы Рауса (RSV)) и лентивирус.

В настоящем документе термин «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Иллюстративные примеры лентивирусов включают, не ограничиваясь перечисленными: ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; в том числе ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2); вирус висна-маэди (ВМВ); вирус артрита-энцефалита коз (АЭК); вирус инфекционной анемии лошадей (ИНАН); вирус иммунодефицита кошачьих (ВИК); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС); и вирус иммунодефицита обезьян (ВИО). Согласно одному варианту реализации предпочтительными являются остовы векторов на основе ВИЧ (*т. е.* последовательность цис-действующих элементов ВИЧ). Согласно конкретным вариантам реализации для доставки в клетку полинуклеотида, содержащего CAR, используют лентивирус.

Ретровирусные векторы и, более конкретно, лентивирусные векторы могут применяться при практической реализации конкретных вариантов настоящего изобретения. Соответственно, предполагается, что термин «ретровирус», или «ретровирусный вектор» в настоящем документе включает «лентивирус» и «лентивирусные векторы», соответственно.

Термин «вектор» применяют в настоящем документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Переносимая нуклеиновая кислота обычно соединена, например, встроена в указанную векторную молекулу нуклеиновой кислоты. Вектор может включать последовательности, направляющие автономную репликацию в клетке, или может включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. Подходящие векторы включают, например, плазмиды (*например,*

ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. Подходящие вирусные векторы включают, например, ретровирусы и лентивирусы с дефектной репликацией.

Как будет очевидно специалисту в данной области техники, термин «вирусный вектор» широко используется для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (*например,* плазмиды для переноса), включающей происходящие из вирусов элементы нуклеиновых кислот, которые, как правило, облегчают перенос указанной молекулы нуклеиновой кислоты или ее интеграцию в геном клетки, либо вирусной частицы, которая опосредует перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы, как правило, включают различные вирусные компоненты, а иногда также компоненты клетки-хозяина, помимо нуклеиновой(ых) кислот(ы).

Термин «вирусный вектор» может относиться либо к вирусу или вирусной частице, способной к переносу нуклеиновой кислоты в клетку, либо собственно к переносимой нуклеиновой кислоте. Вирусные векторы и плазмиды для переноса содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, изначально происходящие из вируса. Термин «ретровирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащему(ей) структурные и функциональные генетические элементы, или их части, изначально происходящие из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащему(ей) структурные и функциональные генетические элементы, или их части, в том числе области LTR, изначально происходящие из лентивируса. Термин «гибридный вектор» относится к вектору, LTR или другой нуклеиновой кислоте, содержащей как ретровирусные, например, лентивирусные последовательности, так и не лентивирусные вирусные последовательности. Согласно одному варианту реализации гибридный вектор относится к вектору или плазмиде для переноса, содержащему(ей) ретровирусные, *например,* лентивирусные последовательности для обратной транскрипции, репликации, интеграции и/или упаковки.

Согласно конкретным вариантам реализации термины «лентивирусный вектор», «лентивирусный экспрессионный вектор» могут применяться для обозначения лентивирусных плазмид для переноса и/или инфекционных лентивирусных частиц. Следует понимать, что в настоящем документе при упоминании таких элементов, как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные

нуклеиновые кислоты и т.п., подразумевается, что последовательности указанных элементов присутствуют в форме РНК в лентивирусных частицах согласно настоящему изобретению и в форме ДНК в ДНК-плазмидах согласно настоящему изобретению.

На каждом конце провируса располагаются структуры, называемые «длинными концевыми повторами», или «LTR». Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам, состоящим из пар оснований, расположенных на концах ретровирусных ДНК, которые в условиях естественных последовательностей представляют собой прямые повторы и содержат области U3, R и U5. Области LTR обычно выполняют фундаментальные функции, связанные с экспрессией ретровирусных генов (*например,* такие как стимуляция, инициация и полиаденилирование генных транскриптов) и вирусной репликацией. LTR содержит многочисленные регуляторные сигналы, включающие элементы контроля транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. Вирусная область LTR разделена на три области, называемые U3, R и U5. Область U3 содержит энхансерные и промоторные элементы. Область U5 представлена последовательностью между сайтом связывания праймера и областью R, и содержит последовательность полиаденилирования. Область R (область повтора) фланкирована областями U3 и U5. Область LTR состоит из областей U3, R и U5, и присутствует как на 5'-, так и на 3' конце вирусного генома. К области 5' LTR примыкают последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания тРНК-праймера) и эффективной упаковки вирусной РНК в частицы (пси-сайт).

В настоящем документе термин «сигнал упаковки», или «последовательность упаковки» относится к последовательностям в составе ретровирусного генома, необходимым для встраивания вирусной РНК в вирусный капсид или вирусную частицу, см., *например,* Clever *et al.,* 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109. В некоторых ретровирусных векторах задействован минимальный сигнал упаковки (также называемый последовательностью пси [Ψ]), необходимый для заключения вирусного генома в капсид. Соответственно, в настоящем документе термины «последовательность упаковки», «сигнал упаковки», «пси», а также символ «Ψ» используют для обозначения некодирующей последовательности, необходимой для упаковки в капсид цепей ретровирусной РНК при образовании вирусных частиц.

Согласно различным вариантам реализации векторы содержат модифицированные области 5' LTR и/или 3' LTR. Любая область LTR или обе области LTR могут содержать одну или более модификаций, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, одно(у) или более удалений, вставок или замен. Часто модификации 3'-области LTR осуществляют для повышения безопасности лентивирусных или ретровирусных систем за счет получения дефектных по репликации вирусов. В настоящем документе термин «дефектный по репликации» относится к вирусу, неспособному к полной эффективной репликации, в результате чего инфекционные вирионы не образуются (*например,* дефектным по репликации лентивирусным частицам). Термин «компетентные по репликации» относится к вирусу дикого типа или мутантному вирусу, который способен к репликации; в результате такой вирусной репликации могут формироваться инфекционные вирионы (*например,* компетентные по репликации лентивирусные частицы).

«Самоинактивирующиеся» (SIN) векторы представляют собой дефектные по репликации векторы, например, ретровирусные или лентивирусные векторы, в составе которых правая (3') энхансерная-промоторная область LTR, известная как область U3, была модифицирована (*например,* путем удаления или замены) для предотвращения вирусной транскрипции после первого раунда вирусной репликации. Это обусловлено тем, что область U3 правой (3') LTR используется в качестве матрицы для области U3 левой (5') LTR при вирусной репликации и, соответственно, вирусный транскрипт не может быть синтезирован без энхансерной-промоторной области U3. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения область 3' LTR модифицирована путем замены области U5, например, на идеальную поли(A)-последовательность. Следует отметить, что настоящим изобретением также охвачены такие модификации областей LTR, например, модификации 3' LTR, 5' LTR, или обеих областей LTR, 3' и 5.

Дополнительное повышение безопасности обеспечивает замена области U3 5' LTR на гетерологичный промотор, управляющий транскрипцией вирусного генома при образовании вирусных частиц. Примеры подходящих для применения гетерологичных промоторов включают, например, вирусные промоторы: вируса обезьян 40 (SV40) (*например,* ранние или поздние), цитомегаловируса (ЦМВ) (*например,* немедленные ранние), вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса саркомы Рауса (RSV) и

вируса простого герпеса (ВПГ, HSV) (тимидинкиназный промотор). Типичные промоторы способны стимулировать высокие уровни транскрипции Tat-независимым образом. Указанная замена снижает вероятность рекомбинации с образованием способного к репликации вируса ввиду отсутствия полной последовательности U3 в системе продуцирования вируса Согласно некоторым вариантам реализации гетерологичный промотор обеспечивает дополнительные преимущества, контролируя способ транскрипции вирусного генома. Например, указанный гетерологичный промотор может быть индуцируемым; в таком случае транскрипция всего вирусного генома или его части происходит только при наличии факторов индукции. Факторы индукции включают, не ограничиваясь перечисленными, наличие одного или более химических соединений или физиологических условий, таких как температура или pH, в которых культивируют клетки-хозяева.

Согласно некоторым вариантам реализации вирусные векторы содержат элемент TAR. Термин «TAR» относится к генетическому элементу «трансактивационного ответа», расположенному в R-области длинных концевых повторов (LTR) лентивирусов (*например,* ВИЧ). Указанный элемент взаимодействует с лентивирусным трансактивирующим (tat) генетическим элементом, усиливая вирусную репликацию. Однако указанный элемент не требуется во вариантах реализации, отличающихся тем, что область U3 5'-концевой LTR заменена на гетерологичный промотор.

«R-область» относится к области в составе ретровирусных LTR, начинающейся в начале кэпирующей группы (*m. e.* точке начала транскрипции) и заканчивающейся непосредственно перед началом полиаденинового (поли-A) тракта. R-область также определяют как область, фланкированную областями U3 и U5. R-область участвует в обратной транскрипции, обеспечивая перенос синтезируемой ДНК с одного конца генома на другой.

В настоящем документе термин «FLAP-элемент» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой включает центральный полипуриновый тракт и центральные последовательности терминации (cPPT и CTS) ретровируса, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Подходящие FLAP-элементы описаны в патенте США №6682907 и в источнике: Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173. Во время обратной транскрипции ВИЧ-1 центральная инициация плюс-цепи ДНК в центральном полипуриновом тракте (cPPT) и центральная терминация в центральной последовательности терминации (CTS)

приводят к образованию трехцепочечной ДНК-структуры: центрального ДНК-флэпа ВИЧ-1. Без ограничения какой-либо теорией, ДНК-флэп может функционировать в качестве цис-активной детерминанты ядерного импорта лентивирусного генома и/или может увеличивать титр вируса. Согласно конкретным вариантам реализации остовы ретровирусных или лентивирусных векторов содержат один или более FLAP-элементов выше или ниже представляющих интерес гетерологичных генов в указанных векторах. Например, согласно конкретным вариантам реализации а плазмида для переноса включает FLAP-элемент. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения вектор включает FLAP-элемент, выделенный из ВИЧ-1.

Согласно одному варианту реализации ретровирусные или лентивирусные векторы для переноса содержат один или более элементов экспорта. Термин «элемент экспорта» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, регулирующему транспорт РНК-транскрипта из ядра в цитоплазму клетки. Примеры элементов экспорта РНК включают, не ограничиваясь перечисленными, элемент отклика Rev (RRE) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (см., например, Cullen *et al.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053; и Cullen *et al.*, 1991. *Cell* 58: 423), и посттранскрипционный регуляторный элемент (HPRE) вируса гепатита B. Обычно элемент экспорта РНК локализован в составе 3' UTR гена, и может быть встроен в виде одной или нескольких копий.

Согласно конкретным вариантам реализации экспрессию гетерологичных последовательностей в вирусных векторах повышают путем включения в указанные векторы посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и, необязательно, сигналов терминации транскрипции. Повышать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты на уровне белка могут различные посттранскрипционные регуляторные элементы, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита B (HPRE) (Huang *et al., Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); и т.п. (Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766). Согласно конкретным вариантам реализации векторы согласно настоящему изобретению содержат такой посттранскрипционный регуляторный элемент, как WPRE или HPRE.

Согласно конкретным вариантам реализации векторы согласно настоящему изобретению не включают или не содержат посттранскрипционного регуляторного элемента (PTE), такого как WPRE или HPRE, поскольку в некоторых случаях указанные элементы повышают риск клеточной трансформации и/или по существу или значимо не увеличивают количество транскриптов мРНК или стабильность мРНК. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации векторы согласно настоящему изобретению не включают или не содержат PTE. Согласно другим вариантам реализации векторы согласно настоящему изобретению, в качестве дополнительной меры безопасности, не включают или не содержат WPRE или HPRE.

Элементы, направляющие эффективную терминацию и полиаденилирование транскриптов гетерологичной нуклеиновой кислоты, повышают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно расположены в 3'-направлении от сигнала полиаденилирования. Согласно конкретным вариантам реализации векторы содержат последовательность полиаденилирования в 3′-направлении от полинуклеотида, кодирующего полипептид, который необходимо экспрессировать. Термин «поли-А-сайт» или «поли-А-последовательность» в настоящем документе обозначает последовательность ДНК, которая направляет и терминацию, и полиаденилирование образующегося РНК-транскрипта РНК-полимеразой II. Полиаденилирование последовательностей может способствовать стабильности мРНК за счет добавления полиаденинового «хвоста» к 3′-концу кодирующей последовательности и, соответственно, вносить вклад в повышение эффективности трансляции. Эффективное полиаденилирование рекомбинантного транскрипта желательно, поскольку транскрипты без полиаденинового «хвоста» нестабильны и быстро разлагаются. Иллюстративные примеры сигналов полиаденилирования, которые могут применяться в векторе согласно настоящему изобретению, включают идеальную поли-А-последовательность (*например,* AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), поли-А-последовательность бычьего гормона роста (BGHpA), поли-А-последовательность β-глобина кролика (rβgpA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную поли-А-последовательность, известную в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации ретровирусный или лентивирусный вектор дополнительно содержит один или более инсуляторных элементов. Инсуляторные

элементы могут вносить вклад в защиту экспрессируемых лентивирусами последовательностей, например, терапевтических полипептидов, от эффектов сайта интеграции, которые могут быть опосредованы цис-действующими элементами, присутствующими в геномной ДНК, приводя к дерегуляции экспрессии перенесенных последовательностей (*т. е.* эффекту положения; *см., например,* Burgess-Beusse *et al.*, 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99:16433; и Zhan *et al.*, 2001, *Hum. Genet.*, 109:471). Согласно некоторым вариантам реализации векторы для переноса содержат один или более инсуляторный элемент в составе 3′ LTR, а после интеграции провируса в геном хозяина указанный провирус содержит один или более инсуляторов на обоих концах 5′ LTR или 3′ LTR, за счет удвоения 3′ LTR. Подходящие инсуляторы для применения в настоящем изобретении включают, не ограничиваясь перечисленными, инсулятор β-глобина курицы (см. источники: Chung et al., 1993. Cell 74:505; Chung et al., 1997. PNAS 94:575; и Bell et al., 1999. Cell 98:387, включенные посредством ссылки в настоящем документе). Примеры инсуляторных элементов включают, не ограничиваясь перечисленными, инсулятор β-глобинового локуса, например, HS4 курицы.

В соответствии с определенными специфическими вариантами реализации настоящего изобретения большинство или все последовательности остовов вирусных векторов происходят из лентивируса, например, ВИЧ-1. Однако следует понимать, что может быть использовано множество различных источников ретровирусных и/или лентивирусных последовательностей, или их комбинации, и что многочисленные замены и изменения определенных лентивирусных последовательностей могут быть реализованы без нарушения способности вектора для переноса осуществлять функции, описанные в настоящем документе. Кроме того, в данной области техники известны различные лентивирусные векторы, см. Naldini *et al.*, (1996a, 1996b и 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, патенты США №6013516 и №5994136, многие которых могут быть адаптированы для получения вирусного вектора или плазмиды для переноса согласно настоящему изобретению.

Согласно различным вариантам реализации векторы согласно настоящему изобретению содержат промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR. Указанные векторы могут содержать одну или более последовательностей LTR, отличающихся тем, что любая из LTR содержит одну или более модификаций, таких как одна или большее число замен, добавлений или

удалений нуклеотидов. Указанные векторы могут дополнительно содержать один или более вспомогательных элементов для повышения эффективности трансдукции (*например,* cPPT/FLAP), вирусной упаковки (*например,* сигнал упаковки пси (Ψ), RRE) и/или другие элементы, которые повышают экспрессию терапевтического гена (*например,* последовательности поли-(A)), и могут необязательно содержать последовательность WPRE или HPRE.

Согласно конкретному варианту реализации вектор для переноса, предложенный в настоящем изобретении, включает левую (5') ретровирусную последовательность LTR; центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (cPPT/FLAP); элемент экспорта ретровируса; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; и правую (3') ретровирусную последовательность LTR; и, необязательно, WPRE или HPRE.

Согласно конкретному варианту реализации вектор для переноса, предложенный в настоящем изобретении, включает левую (5') ретровирусную последовательность LTR; элемент экспорта ретровируса; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; правую (3') ретровирусную последовательность LTR; последовательность поли-(A); и, необязательно, последовательность WPRE или HPRE. Согласно другому конкретному варианту реализации в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор, содержащий: левую (5') LTR; cPPT/FLAP; RRE; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; правую (3') LTR; и последовательность полиаденилирования; и, необязательно, последовательность WPRE или HPRE.

Согласно определенному варианту реализации в настоящем изобретении предложен лентивирусный вектор содержащий: левую (5') последовательность LTR ВИЧ-1; сигнал упаковки пси (Ψ); cPPT/FLAP; RRE; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; правую (3') самоинактивирующуюся (SIN) LTR ВИЧ-1; последовательность полиаденилирования β-глобина кролика; и, необязательно, последовательность WPRE или HPRE.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий: по меньшей мере одну последовательность LTR; центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (cPPT/FLAP); элемент экспорта ретровируса; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; и, необязательно, последовательность WPRE или HPRE.

Согласно конкретному варианту реализации в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий по меньшей мере одну область LTR; cPPT/FLAP; RRE; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; последовательность полиаденилирования; и, необязательно, последовательность WPRE или HPRE.

Согласно определенному варианту реализации в настоящем изобретении предложены: по меньшей мере одна область LTR SIN ВИЧ-1; сигнал упаковки пси (Ψ); cPPT/FLAP; RRE; промотор, активный в Т-клетке, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR, предусмотренный настоящим изобретением; последовательность полиаденилирования β-глобина кролика; и, необязательно, последовательность WPRE или HPRE.

Согласно различным вариантам реализации указанный вектор представляет собой интегрирующий вирусный вектор.

Согласно различным другим вариантам реализации указанный вектор представляет собой эписомный или неинтегрирующий вирусный вектор.

Согласно различным вариантам реализации векторы, предусмотренные настоящим изобретением, содержат неинтегрирующий или дефектный по интеграции ретровирус. Согласно одному варианту реализации «дефектный по интеграции» ретровирус или лентивирус относится к ретровирусу или лентивирусу, содержащему интегразу, неспособную обеспечивать интеграцию вирусного генома в геном клеток-хозяев. Согласно различным вариантам реализации указанный белок интеграза мутирован для специфического снижения интегразной активности. Неспособные к интеграции лентивирусные векторы получают путем модификации гена pol, кодирующего белок интегразу, что приводит к получению мутантного гена pol, кодирующего дефектную не обеспечивающую встраивание интегразу. Такие неспособные к интеграции вирусные

векторы были описаны в заявке на патент WO 2006/010834, включенной в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Иллюстративные примеры мутаций гена pol ВИЧ-1, подходящие для снижения активности интегразы, включают, не ограничиваясь перечисленными: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D1161, D116A, N120G, N1201, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A и K264H.

Иллюстративные примеры мутаций гена pol ВИЧ-1, подходящие для снижения активности интегразы, включают, не ограничиваясь перечисленными: D64E, D64V, E92K, D116N, D1161, D116A, N120G, N1201, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, W235F и W235E.

Согласно конкретному варианту реализации интеграза содержит мутацию одной или более из аминокислот D64, D116 или E152. Согласно одному варианту реализации интеграза содержит мутацию в аминокислотах D64, D116 и E152. Согласно конкретному варианту реализации дефектная интеграза ВИЧ-1 содержит мутацию D64V.

«Клетка-хозяин» включает клетки, в которые введен путем электропорации, трансфекции, инфекции или трансдукции *in vivo, ex vivo* или *in vitro* рекомбинантный вектор или полинуклеотид согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева может включать пакующие клетки, продуцирующие клетки и клетки, инфицированные вирусными векторами. Согласно конкретным вариантам реализации, клетки-хозяева, инфицированные вирусным вектором согласно настоящему изобретению, вводят субъекту, нуждающемуся в терапии. Согласно некоторым вариантам реализации термин «целевая клетка» применяют взаимозаменяемо с термином «клетка-хозяин»; он относится к трансфицированным, инфицированным или трансдуцированным клеткам нужного типа. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанная целевая клетка представляет собой Т-клетку.

Для обеспечения удовлетворительного титра вируса часто необходимо крупномасштабное производство вирусных частиц. Вирусные частицы получают путем

трансфекции клеток пакующей линии вектором для переноса, который содержит вирусные структурные и/или вспомогательные гены, например, гены gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx или nef, или другие ретровирусные гены.

В настоящем документе термин «пакующий вектор» относится к экспрессионному вектору или вирусному вектору, в котором отсутствует сигнал упаковки и содержится полинуклеотид, кодирующий один, два, три, четыре или более вирусных структурных и/или вспомогательных генов. Как правило, пакующие векторы включены в пакующую клетку; их вводят в указанную клетку посредством трансфекции, трансдукции или инфекции. Способы трансфекции, трансдукции или инфекции хорошо известны специалистам в данной области техники. Ретровирусный/лентивирусный вектор для переноса согласно настоящему изобретению может быть введен в пакующую линию клеток посредством трансфекции, трансдукции или инфекции, для получения продуцирующей клетки или линии клеток. Пакующие векторы согласно настоящему изобретению могут быть введены в клетки или линии клеток человека с применением стандартных способов, в том числе, например, трансфекции с фосфатом кальция, липофекции или электропорации. Согласно некоторым вариантам реализации пакующие векторы вводят в клетки совместно с доминантным селективным маркером, таким как неомицин, гигромицин, пуромицин, бластицидин, зеоцин, тимидинкиназа, дегидрофолатредуктаза (ДГФР), глутаминсинтаза или аденозиндеаминаза (АДА), с последующей селекцией в присутствии подходящего лекарственного средства и выделением клонов. Селектируемый маркерный ген может быть физически связан с генами, кодируемыми пакующим вектором, например, посредством IRES или саморасщепляющихся вирусных пептидов.

Белки вирусной оболочки (env) определяют диапазон клеток-хозяев, которые могут в итоге быть инфицированы и трансформированы рекомбинантными ретровирусами, полученными из линий клеток. В случае лентивирусов, таких как ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВИО, ВИК и EIV, белки env включают gp41 и gp120. Предпочтительно, вирусные белки env, экспрессируемые пакующими клетками согласно настоящему изобретению, кодирует другой вектор, отдельный от кодирующего вирусные гены gag и pol вектора согласно приведенному выше описанию.

Иллюстративные примеры происходящих из ретровирусов генов env, которые могут применяться в настоящем изобретении, включают, не ограничиваясь перечисленными:

гены оболочки вируса лейкоза мышей (MLV), оболочки 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, вируса Эбола, вируса Сендай, FPV (вируса чумы домашней птицы) и оболочки вируса гриппа. Аналогичным образом, могут использоваться гены, кодирующие оболочки РНК-вирусов (*например,* РНК-вирусов семейств Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), а также ДНК-вирусов (из семейств Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxyiridae и Iridoviridae). Репрезентативные примеры включают вирус лейкоза кошачьих (FeLV), венесуэльский энцефалит лошадей (VEE), вирус HFVW, вирус дермальной саркомы стизостедиона (WDSV), вирус леса Семлики (SFV), вирус бешенства, вирус лейкоза птиц (ALV), ВИКРС, вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), АЭК, вирус Син Номбре (SNV), вирус скручивания вишни и черешни (ChTLV), Т-лимфотропный вирус обезьян (STLV), вирус обезьян Мэйсона-Пфайзера (MPMV), ретровирус беличьей обезьяны (SMRV), вирус, ассоциированный с вирусом Рауса (RAV), вирус саркомы Фудзинами (FuSV), вирус MH2, вирус энцефаломиелита птиц (AEV), вирус мозаики люцерны (AMV), вирус CT10 и ИНАН.

Согласно другим вариантам реализации белки оболочки псевдотипирования вируса согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными, белки оболочки любых из следующих вирусов: вирус гриппа A, например, H1N1, H1N2, H3N2 и H5N1 (птичий грипп), гриппа B, вирус гриппа C, вирус гепатита A, вирус гепатита B, вирус гепатита C, вирус гепатита D, вирус гепатита E, ротавируса, любой вирус группы норовирусов, кишечные аденовирусы, парвовирус, вирус лихорадки Денге, вирус оспы обезьян, вирусы порядка Mononegavirales, лиссавирус, такой как вирус бешенства, вирус лихорадки летучих мышей озера Лагос, вирус Мокола, вирус Дувенхаге, вирусы европейских летучих мышей 1 и 2 и вирус австралийской летучей мыши, Ephemerovirus, Vesiculovirus, вирус везикулярного стоматита (VSV), герпесвирусы, такие как вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр (EBV), герпесвирусы человека (HHV), герпесвирусы человека 6 и 8 типа, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), папилломавирус, гамма-герпесвирус мышей, аренавирусы, такие как вирус аргентинской геморрагической лихорадки, вирус боливийской геморрагической лихорадки, Sabia-ассоциированный вирус геморрагической лихорадки, вирус

венесуэльской геморрагической лихорадки, вирус лихорадки Ласса, вирус Мачупо, вирус лимфатического хориоменингита (LCMV), Bunyaviridiae (буниавирусы), такие как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки, хантавирус, вирус геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вирус лихорадки долины Рифт, Filoviridae (филовирусы), в том числе геморрагическую лихорадку Эбола и геморрагическую лихорадку Марбург, Flaviviridae, в том числе вирус болезни Кьясанурского леса, вирус омской геморрагической лихорадки, вирус клещевого вирусного энцефалита и вирусы семейства Paramixoviridae, такие как вирус Хендра и вирус Нипах, большая оспа и малая оспа (натуральная оспа), альфавирусы, такие как вирус венесуэльской лошадиной лихорадки, вирус восточного энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей, SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV), вирус лихорадки Западного Нила, любой вирус, вызывающий развитие энцефалита.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложены пакующие клетки, продуцирующие рекомбинантный ретровирус, например, лентивирус, псевдотипированный гликопротеином VSV-G.

Термины «псевдотип» или «псевдотипирование» в настоящем документе относятся к вирусу, вирусные белки оболочки которого были заменены на белки оболочки другого вируса, обладающие предпочтительными характеристиками. Например, ВИЧ может быть псевдотипирован белком G оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G), позволяющим ВИЧ инфицировать более широкий спектр клеток, поскольку белки оболочки ВИЧ (кодируемые геном env) обычно нацеливают вирус на CD4+-представляющие клетки. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения лентивирусные белки оболочки псевдотипированы VSV-G. Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложены пакующие клетки, продуцирующие рекомбинантный ретровирус, например, лентивирус, псевдотипированный гликопротеином оболочки VSV-G.

В настоящем документе термин «пакующие линии клеток» применяют в отношении линий клеток, которые не содержат сигнала упаковки, однако стабильно или временно экспрессируют вирусные структурные белки и ферменты для репликации (*например,* gag, pol и env), необходимые для правильной упаковки вирусных частиц. Для получения пакующих клеток согласно настоящему изобретению может быть

использована любая подходящая линия клеток. Как правило, указанные клетки представляют собой клетки млекопитающих. Согласно конкретному варианту реализации клетки, используемые для получения пакующей линии клеток, представляют собой клетки человека. Подходящие для применения линии клеток включают, например, клетки CHO, клетки BHK, клетки MDCK, клетки C3H 10T1/2, клетки FLY, клетки Psi-2, клетки BOSC 23, клетки PA317, клетки WEHI, клетки COS, клетки BSC 1, клетки BSC 40, клетки BMT 10, клетки VERO, клетки W138, клетки MRC5, клетки A549, клетки HT1080, клетки 293, клетки 293T, клетки B-50, клетки 3T3, клетки NIH3T3, клетки HepG2, клетки Saos-2, клетки Huh7, клетки HeLa, клетки W163, клетки 211 и клетки 211A. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанные пакующие клетки представляют собой клетки 293, клетки 293T или клетки A549. Согласно другому предпочтительному варианту реализации указанные клетки представляют собой клетки A549.

В настоящем документе термин «продуцирующая линия клеток» относится к линии клеток, способной продуцировать рекомбинантные ретровирусные частицы, включающей линию пакующих клеток и вектор для переноса конструкции, содержащей сигнал упаковки. Инфекционные вирусные частицы и вирусные исходные растворы могут быть получены с применением стандартных техник. Способы получения исходных вирусных растворов известны в данной области техники и их иллюстративные примеры приведены, например, в источниках: Y. Soneoka *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, и N. R. Landau *et al.* (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113. Инфекционные вирусные частицы могут быть получены из пакующих клеток с применением стандартных техник. Например, инфекционные частицы могут быть получены путем лизиса клеток или сбора супернатанта клеточной культуры, как известно в данной области техники. При необходимости собранные вирусные частицы могут необязательно быть очищены. Подходящие техники очищения хорошо известны специалистам в данной области техники.

Доставка гена(ов) или другой последовательности полинуклеотидов с применением ретровирусного или лентивирусного вектора путем вирусной инфекции, а не трансфекции, называется «трансдукцией». Согласно одному варианту реализации ретровирусными векторами трансдуцируют клетку путем инфекция и интеграции провируса. Согласно некоторым вариантам реализации целевая клетка, например, T-

клетка, «трансдуцирована», если она содержит ген или другую последовательность полинуклеотидов, доставленную в указанную клетку путем инфицирования с применением вирусного или ретровирусного вектора. Согласно конкретным вариантам реализации трансдуцированная клетка содержит один(одну) или большее количество генов или других последовательностей полинуклеотидов, доставленных в клеточный геном с помощью ретровирусного или лентивирусного вектора.

Согласно конкретным вариантам реализации трансдуцированные вирусным вектором согласно настоящему изобретению клетки-хозяева, экспрессирующие один или более полипептидов, вводят субъекту для лечения и/или предотвращения В-клеточного злокачественного новообразования. С другими способами, которые связаны с использованием вирусных векторов в генной терапии и могут применяться в соответствии с определенными вариантами реализации настоящего изобретения, можно ознакомиться, например, в источниках: Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) *Hum. Gene Ther*. 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.* (1999) Liver 19:265-74; Oka, K. *et al.* (2000) *Curr. Opin. Lipidol*. 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) *Gene Ther*. 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol*. 12:335-56; Alt, M. (1995) *J. Hepatol*. 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep*. 3:43-49; и Lee, H. C. *et al.* (2000) *Nature* 408:483-8.

G. Генетически модифицированные клетки

Настоящее изобретение предусматривает, согласно конкретным вариантам реализации, клетки, генетически модифицированные для экспрессии предусмотренного настоящим изобретением CAR, для применения в лечении связанных с В-клетками состояний. В настоящем документе термин «генетически сконструированный» или «генетически модифицированный» относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термины «генетически модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенаправленные клетки» используются взаимозаменяемо. В настоящем документе термин «генная терапия» относится к введению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке, который

восстанавливает, корректирует или модифицирует экспрессию гена, или к его введению для экспрессии терапевтического полипептида, например, CAR.

Согласно конкретным вариантам реализации предусмотренные настоящим изобретением CAR вводят и экспрессируют в иммунных эффекторных клетках таким образом, чтобы перенаправлять их специфичность на представляющий интерес целевой антиген, например, полипептид BCMA. «Иммунная эффекторная клетка» представляет собой любую клетку иммунной системы, выполняющую одну или более эффекторные функции (*например,* цитотоксическая активность для киллинга клеток, секреция цитокинов, индукция АЗКЦ и/или КЗЦ).

Иммунные эффекторные клетки согласно настоящему изобретению могут быть аутологичными/аутогенными («собственными») или неаутологичными («несобственными», *например,* аллогенными, сингенными или ксеногенными).

«Аутологичный» в настоящем документе относится к клеткам одного и того же субъекта.

«Аллогенный» в настоящем документе относится к клеткам одного и того же вида, генетически отличающимся от сравниваемой клетки.

«Сингенный» в настоящем документе относится к клеткам другого субъекта, генетически идентичным сравниваемой клетке.

«Ксеногенный» в настоящем документе относится к клеткам вида, к которому не принадлежит сравниваемая клетка. Согласно предпочтительным вариантам реализации клетки согласно настоящему изобретению являются аллогенными.

Иллюстративные иммунные эффекторные клетки, используемые с предусмотренными настоящим изобретением CAR, включают Т-лимфоциты. Термины «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» приняты в данной области техники и предназначены для обозначения тимоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, зрелые Т-лимфоцитов, покоящихся Т-лимфоцитов или активированных Т-лимфоцитов. Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (Th), например, хелперную Т-клетку 1 (Th1) или хелперную Т-клетку 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; $CD4^+$ Т-клетка) $CD4^+$ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; $CD8^+$ Т-клетку), $CD4^+CD8^+$ Т-клетку, $CD4^-$ $CD8^-$ Т-клетку или Т-клетки любой другой подгруппы. Другие иллюстративные

примеры популяций Т-клеток, подходящих для применения согласно конкретным вариантам реализации, включают необученные Т-клетки и Т-клетки памяти.

Как будет ясно специалисту, другие клетки могут также применяться в качестве иммунных эффекторных клеток с рецепторами CAR согласно описанию в настоящем документе. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают NK-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественники эффекторных клеток, причем может осуществляться индукция дифференцировки таких клеток-предшественников в иммунные эффекторные клетки *in vivo* или *in vitro*. Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации иммунная эффекторная клетка включает предшественники иммунных эффекторных клеток, такие как гематопоэтические стволовые клетки (HSC), содержащиеся в популяции CD34+ клеток, происходящих из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованной периферической крови, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, или их дифференцировка в зрелые иммунные эффекторные клетки может быть индуцирована *in vitro*.

В настоящем документе генетически сконструированные иммунные эффекторные клетки, содержащие BCMA-специфические рецепторы CAR, могут называться «BCMA-специфическими перенаправленными иммунными эффекторными клетками».

Термин «Клетка CD34+» в настоящем документе относится к клетке, экспрессирующей на поверхности белок CD34. «CD34» в настоящем документе относится к гликопротеину клеточной поверхности (*например,* белку сиаломуцину), часто функционирующему в качестве фактора межклеточной адгезии и задействованному при входе Т-клеток в лимфатические узлы. Популяция клеток CD34+ включает гематопоэтические стволовые клетки (HSC), который при введении пациенту дифференцируются и вносят вклад во все гематопоэтические линии, в том числе Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и клетки моноцитарно/макрофагальной линии.

В настоящем изобретении предложены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, предусмотренный настоящим изобретением. Согласно одному варианту реализации указанный способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных из организма индивидуума,

таким образом, что указанные иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные иммунные эффекторные клетки выделяют из организма индивидуума и генетически модифицируют без проведения дополнительных манипуляций in vitro. Такие клетки могут затем быть непосредственно введены обратно индивидууму. Согласно дополнительным вариантам реализации указанные иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют пролиферацию in vitro до проведения генетической модификации для экспрессии CAR. Таким образом, указанные иммунные эффекторные клетки могут быть культивированы до и/или после генетической модификации (т. е. трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR, предусмотренного настоящим изобретением).

Согласно конкретным вариантам реализации, до проведения манипуляций *in vitro* или генетической модификации иммунных эффекторных клеток, описанных в настоящем документе, исходные клетки получают от субъекта. Согласно конкретным вариантам реализации CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани вилочковой железы, ткани из пораженного инфекцией участка, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки могут быть получены из объема крови, взятого у субъекта, с применением любого числа известных специалисту техник, таких как осаждение, например, разделение в фиколле (FICOLL^{TM}). Согласно одному варианту реализации клетки циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному варианту реализации собранные посредством афереза клетки могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещены в подходящий(ую) буфер или среду для последующей обработки. Указанные клетки могут быть промыты ФСБ или другим подходящим раствором, в котором отсутствуют кальций, магний, и большинство или все другие дивалентные катионы. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания может осуществляться с применением известных в данной области техники способов, например, с применением полуавтоматической проточной

центрифуги, например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или т.п. После промывания клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе, содержащем или не содержащем буфер. Согласно некоторым вариантам реализации нежелательные компоненты полученного при аферезе образца могут быть удалены из культуральной среды, где непосредственно ресуспендированы клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем лизиса эритроцитов и истощения по моноцитам, например, путем центрифугирования в градиенте перколла (PERCOLL™). Затем с применением техник положительной или отрицательной селекции (отбора) может быть выделена специфическая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих один или более из следующих маркеров: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO. Согласно одному варианту реализации дополнительно выделяют специфическую субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO, с применением техник положительного или отрицательного отбора. Например, обогащение популяции Т-клеток с применением отрицательного отбора может быть осуществлено с применением комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для выбранных с применением отрицательного отбора клеток. Один из способов для применения в настоящем документе представлен сортировкой и/или отбором клеток посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии с использованием коктейля моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках выбранные с применением отрицательного отбора. Например, для обогащения $CD4^+$ клетками с применением отрицательного отбора в коктейль моноклональных антител, как правило, включают антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Для выделения популяций клеток, представляющих интерес для применения в настоящем изобретении, может также применяться проточная цитометрия и сортировка.

МКПК могут быть непосредственно генетически модифицированы для экспрессии рецепторов CAR с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации после выделения МКПК дополнительно выделяют Т-лимфоциты; согласно некоторым вариантам реализации и

цитотоксические, и хелперные Т-лимфоциты могут быть сортированы с получением субпопуляций необученных клеток, клеток памяти и эффекторных Т-клеток, либо до, либо после генетической модификации и/или размножения.

Клетки $CD8^+$ могут быть получены с применением стандартных способов. Согласно некоторым вариантам реализации клетки $CD8^+$ дополнительно сортируют на необученные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации поверхностных клеточных антигенов, связанных с каждым из указанных типов клеток $CD8^+$.

Согласно некоторым вариантам реализации необученные $CD8^+$ Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров необученных Т-клеток, в том числе CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA.

Согласно конкретным вариантам реализации Т-клетки памяти присутствуют в обеих подгруппах $CD62L^+$ и $CD62L^-$ лимфоцитов $CD8^+$ периферической крови. МКПК сортируют на фракции $CD62L^-CD8^+$ и $CD62L^+CD8^+$ после окрашивания антителами против CD8 и против CD62L. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия фенотипических маркеров центральных клеток памяти Т-клетки включают CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, и CD127, и они отрицательны по гранзиму В. Согласно некоторым вариантам реализации центральные клетки памяти Т-клетки представляют собой $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD8^+$ Т-клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации эффекторные Т-клетки являются отрицательными по CD62L, CCR7, CD28 и CD127, и положительными по гранзиму В и перфорину.

Согласно некоторым вариантам реализации $CD4^+$ Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, $CD4^+$ хелперные Т-клетки могут быть сортированы на необученные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций с антигенами клеточной поверхности. $CD4^+$ лимфоциты могут быть получены с применением стандартных способов. Согласно некоторым вариантам реализации необученные $CD4^+$ Т-лимфоциты представлены $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$ $CD4^+$ Т -клетками. Согласно некоторым вариантам реализации центральные CD4+ клетки памяти являются положительными по CD62L и положительными по CD45RO. Согласно некоторым вариантам реализации

эффекторные CD4+ клетки являются отрицательными по CD62L и отрицательными по CD45RO.

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с применением известных способов, или указанные иммунные эффекторные клетки могут быть активированы и размножены (или, в случае предшественников, могут проходить дифференцировку) *in vitro* до проведения генетической модификации. Согласно конкретному варианту реализации указанные иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют химерными антигенными рецепторами, предусмотренными настоящим изобретением (*например,* трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR) и затем активируют и размножают *in vitro*. Согласно различным вариантам реализации Т-клетки могут быть активированы и размножены до или после генетической модификации для экспрессии CAR с применением способов согласно описанию, например, в патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и опубликованной патентной заявке США №20060121005.

Обычно Т-клетки размножают путем приведения в контакт с поверхностью, к которой присоединен агент, который стимулирует ассоциированный с комплексом CD3-TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности указанных Т-клеток. Популяции Т-клеток могут быть стимулированы путем приведения в контакт с антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (*например,* бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Также включена костимуляция вспомогательных молекул на поверхности Т-клеток.

Согласно конкретным вариантам реализации клетки МКПК или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, например, антителами против CD3 и против CD28, обычно присоединенными к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15. Для стимуляции пролиферации либо $CD4^+$ Т-клеток, либо $CD8^+$ Т-клеток используют антитело против CD3 и антитело против CD28. Подходят для применения, например, такие антитела против CD28, как 9.3, B-T3, XR-CD28

(Diacione, Безансон, Франция), а также другие общеизвестные в данной области техники способы (Berg *et al., Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al., J. Exp. Med.* 190(9): 13191328, 1999; Garland *et al., J. Immunol Meth.* 227(1 -2):53-63, 1999). Антитела против CD3 и против CD28, присоединенные к одной той же грануле, служат в качестве «суррогатной» антигенпрезентирующей клетки (АПК). Согласно другим вариантам реализации Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для обеспечения пролиферации питающими клетками и подходящими антителами и цитокинами с применением способов, таких как описанные в US6040177; US5827642; и WO2012129514.

Согласно другим вариантам реализации искусственные АПК (иАПК) получают путем конструирования клеток K562, U937, 721.221, T2 и C1R таким образом, чтобы обеспечивать стабильную экспрессию и секрецию различных костимулирующих молекул и цитокинов. Согласно конкретному варианту реализации иАПК K32 или U32 используют для обеспечения экспонирования одной или более стимулирующих молекул на основе антител на поверхности клетки иАПК. Экспрессия различных комбинаций генов на иАПК позволяет точно определить условия, необходимые для активации Т-клеток человека, таким образом, иАПК могут быть модифицированы для оптимального размножения подгрупп Т-клеток, отличающихся специфическими требованиями к условиям роста и разными функциями. иАПК поддерживают рост ex vivo и продолжительное размножение функциональных CD8 Т-клеток человека, при этом, в отличие от применения естественных АПК, нет необходимости в добавлении экзогенных цитокинов. Популяции Т-клеток могут быть размножены с применением иАПК, экспрессирующих различные костимулирующие молекулы, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L), и/или CD80 или CD86. Наконец, указанные иАПК обеспечивают эффективную платформу для размножения генетически модифицированных Т-клеток и поддержания экспрессии CD28 на CD8 Т-клетках. иАПК, предложенные в WO 03/057171 и US2003/0147869, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно одному варианту реализации клетки CD34+ трансдуцируют содержащей нуклеиновую кислоту конструкцией согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации трансдуцированные клетки CD34+ дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки *in vivo* после введения

субъекту, как правило, тому же, из организма которого они были изначально выделены. Согласно другому варианту реализации клетки CD34+ могут быть стимулированы *in vitro*, до воздействия или после генетической модификации рецептором CAR согласно описанию в настоящем документе, одним или более из следующих цитокинов: лиганд Flt-3 (FLT3), фактор стволовых клеток (SCF), фактор роста и дифференцировки мегакариоцитов (TPO), ИЛ-3 и ИЛ-6, в соответствии с ранее описанными способами (Asheuer *et al.*, 2004; Imren, *et al.*, 2004).

В настоящем изобретении предложена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения раковых заболеваний, при этом указанные модифицированные иммунные эффекторные клетки содержат CAR согласно описанию в настоящем документе. Например, популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток получают из мононуклеарных клеток периферической крови (клеток МКПК), полученных от пациента, у которого диагностировано В-клеточное злокачественное новообразование, описанное в настоящем документе (аутологичные доноры). Указанные клетки МКПК образуют гетерогенную популяцию Т-лимфоцитов, которые могут представлять собой CD4+, CD8+, или CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты.

Клетки МКПК также могут включать другие цитотоксические лимфоциты, такие как NK-клетки или NKT-клетки. Экспрессионный вектор, несущий кодирующую последовательность CAR, предусмотренный настоящим изобретением, может быть введены в популяцию донорных Т-клеток, NK-клеток или NKT-клеток человека. Успешно трансдуцированные Т-клетки, несущие указанный экспрессионный вектор, могут быть сортированы с применением проточной цитометрии для выделения положительных по CD3 Т-клеток, а затем дополнительно размножены для увеличения количества указанных экспрессирующих белок CAR Т-клеток, наряду с активацией клеток с применением антител против CD3, и/или антител против CD28 и ИЛ-2, или любых других способов, известных в данной области техники, согласно описанию в тексте настоящего документа. Для криоконсервации экспрессирующих CAR белок Т-клеток, для хранения и/или получения составов для применения у субъекта-человека, используют стандартные процедуры. Согласно одному варианту реализации трансдукцию, культивирование и/или размножение Т-клеток in vitro осуществляют в отсутствие продуктов, происходящих от не являющихся человеком животных, таких как фетальная телячья сыворотка и фетальная бычья сыворотка. После осуществления

генетической модификации гетерогенной популяции клеток МКПК полученные трансдуцированные клетки представляют собой гетерогенную популяцию модифицированных клеток, содержащих нацеленный на BCMA рецептор CAR, предусмотренный настоящим изобретением.

Согласно дополнительному варианту реализации для генетической модификации донорной популяции иммунных эффекторных клеток может применяться смесь, например, одного, двух, трех, четырех, пяти или более разных экспрессионных векторов, причем каждый вектор кодирует отличный химерный антигенный рецепторный белок, предусмотренный настоящим изобретением. Полученные модифицированные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию модифицированных клеток, содержащую некоторое количество модифицированных клеток, экспрессирующих более одного белка CAR.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ хранения генетически модифицированных экспрессирующих белок CAR иммунных эффекторных клеток мыши, человека или гуманизированных клеток, нацеленных на белок BCMA, включающий криоконсервацию указанных иммунных эффекторных клеток таким образом, что указанные клетки сохраняют жизнеспособность при размораживании. Фракция иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих белки CAR, может быть криоконсервирована с применением способов, известных в данной области техники, для обеспечения постоянного источника таких клеток для лечения в будущем пациентов, страдающих связанным с В-клетками состоянием. При необходимости, указанные криоконсервированные трансформированные иммунные эффекторные клетки могут быть разморожены, культивированы и размножены для получения большего количества таких клеток.

В настоящем документе «криоконсервация/криозащита» относится к сохранению клеток путем охлаждения до температуры ниже нуля, например (как правило), до 77 K или −196° C (точка кипения жидкого азота). Криозащитные агенты часто используют при температурах ниже нуля для предотвращения повреждения клеток при замораживании при низких температурах или нагревании до комнатной температуры. Криозащитные агенты и оптимальные скорости охлаждения могут обеспечивать защиту клеток от повреждения. Подходящие для применения криозащитные агенты включают, не ограничиваясь перечисленными, диметилсульфоксид (ДМСО) (Lovelock

and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет от 1° до 3° С/минуту. Через по меньшей мере два часа температура Т-клеток достигает −80° С и они могут быть помещены непосредственно в жидкий азот (−196° С) для постоянного хранения, например, в сосуд для долговременного криогенного хранения.

H. Способы получения Т-клеток

Т-клетки, полученные с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, позволяют получать усовершенствованные композиции для адоптивной иммунотерапии. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, считается, что композиции с Т-клетками, полученные с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, отличаются улучшенными характеристиками, в том числе повышенной выживаемостью, размножением при относительном отсутствии дифференцировки, и персистентностью *in vivo*. Согласно одному варианту реализации способ получения Т-клеток включает приведение указанных клеток в контакт с одним или более агентов, модулирующих клеточный сигнальный PI3K-путь. Согласно одному варианту реализации способ получения Т-клеток включает приведение указанных клеток в контакт с одним или более агентов, модулирующих клеточный сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR. Согласно различным вариантам реализации указанные Т-клетки могут быть получены из любого источника и приведены в контакт с указанным агентом во время фазы активации и/или размножения в процессе получения. Итоговые композиции с Т-клетками обогащены обладающими дифференцировочным потенциалом Т-клетками, способными к пролиферации и экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 и CD38. Согласно одному варианту реализации популяции клеток, содержащие Т-клетки, которые были обработаны одним или более ингибиторами PI3K, обогащают популяцией CD8+ Т-клеток, коэкспрессирующих один или более, или все из следующих биомаркеров: CD62L, CD127, CD197 и CD38.

Согласно одному варианту реализации получают модифицированные Т-клетки, отличающиеся сохранением уровней пролиферации и уменьшением дифференцировки. Согласно конкретному варианту реализации Т-клетки получают путем стимуляции Т-

клеток для их активации и пролиферации в присутствии одного или более стимулирующих сигналов и агента, который представляет собой ингибитор PI3K-пути клеточной сигнализации.

Затем Т-клетки могут быть модифицированы для экспрессии рецепторов CAR против BCMA. Согласно одному варианту реализации Т-клетки модифицируют путем трансдукции указанных Т-клеток содержащим CAR против BCMA вирусным вектором согласно настоящему изобретению. Согласно определенному варианту реализации Т-клетки модифицируют до стимуляции и активации в присутствии ингибитора PI3K-пути клеточной сигнализации. Согласно другому варианту реализации Т-клетки модифицируют после стимуляции и активации в присутствии ингибитора PI3K-пути клеточной сигнализации. Согласно конкретному варианту реализации Т-клетки модифицируют в пределах периода, составляющего 12 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов после стимуляции и активации в присутствии ингибитора PI3K-пути клеточной сигнализации.

После активации Т-клеток указанные клетки культивируют для обеспечения пролиферации. Культивирование Т-клеток может осуществляться на протяжении по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев или более, и включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более раундов размножения.

Согласно различным вариантам реализации композиции с Т-клетками получают в присутствии одного или более ингибитора пути PI3K. Указанные ингибиторы могут быть нацелены на один или более вид активности в рамках пути, или на единственный вид активности. Без ограничения какой-либо конкретной теорией предполагается, что обработка или приведение Т-клеток в контакт с одним или более ингибиторами пути PI3K во время фаз стимуляции, активации и/или размножения процессе получения преимущественно увеличивает содержание молодых Т-клеток, таким образом обеспечивая получение улучшенных терапевтических композиций с Т-клетками.

Согласно конкретному варианту реализации предложен способ увеличения пролиферации Т-клеток, экспрессирующих сконструированный Т-клеточный рецептор. Такие способы могут включать, например, взятие исходных Т-клеток у субъекта, стимуляцию и активацию указанных Т-клеток в присутствии одного или более

ингибиторов пути PI3K, модификацию указанных Т-клеток для экспрессии CAR против BCMA, например, CAR к BCMA02, *и* размножение указанных Т-клеток в культуре.

Согласно определенному варианту реализации предложен способ получения популяций Т-клеток, обогащенных клетками, экспрессирующими один или более из следующих биомаркеров: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 и CD38. Согласно одному варианту реализации молодые Т-клетки содержат один или более из следующих биологических маркеров: CD62L, CD127, CD197 и CD38; или все указанные биомаркеры. Согласно одному варианту реализации предложены молодые Т-клетки, в которых не экспрессируются CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 и LAG3. Согласно описанию в различных разделах настоящего документа уровни экспрессии биомаркеров молодыми Т-клетками соотносят с уровнями экспрессии таких маркеров в популяциях более дифференцированных Т-клеток или иммунных эффекторных клеток.

Согласно одному варианту реализации в качестве источника Т-клеток в способах получения Т-клеток, предусмотренных настоящим изобретением, используют мононуклеарные клетки периферической крови (клетки МКПК). Клетки МКПК образуют гетерогенную популяцию Т-лимфоцитов, в которую могут входить $CD4^+$, $CD8^+$, или $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты, и которая может включать другие мононуклеарные клетки, такие как моноциты, В-клетки, NK-клетки и NKT-клетки. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий сконструированный TCR или CAR, предусмотренный настоящим изобретением, может быть введен в популяцию донорных Т-клеток, NK-клеток или NKT-клеток человека. Успешно трансдуцированные Т-клетки, несущие указанный экспрессионный вектор, могут быть сортированы с применением проточной цитометрии для выделения положительных по CD3 Т-клеток, а затем размножены для увеличения числа модифицированных Т-клеток, наряду с активацией клеток с применением антител против CD3 и или антител против CD28, а также ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15 или любых других способов, известных в данной области техники, согласно описанию в тексте настоящего документа.

Способы получения, предусмотренные настоящим изобретением, могут дополнительно включать криоконсервацию модифицированных Т-клеток для хранения и/или введения

в состав для применения у субъекта-человека. Т-клетки криоконсервируют таким образом, чтобы они сохраняли жизнеспособность при размораживании. При необходимости, указанные криоконсервированные трансформированные иммунные эффекторные клетки могут быть размморожены, культивированы и размножены для получения больших количеств таких клеток. В настоящем документе «криоконсервация/криозащита» относится к сохранению клеток путем охлаждения до температуры ниже нуля, например (как правило), до 77 K или −196° C. (точка кипения жидкого азота). Криозащитные агенты часто используют при температурах ниже нуля для предотвращения повреждения клеток при замораживании при низких температурах или нагревании до комнатной температуры. Криозащитные агенты и оптимальные скорости охлаждения могут обеспечивать защиту клеток от повреждения. Подходящие для применения криозащитные агенты включают, не ограничиваясь перечисленными, диметилсульфоксид (ДМСО) (Lovelock and Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1960; 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет от 1° до 3° C/минуту. Через по меньшей мере два часа температура Т-клеток достигает −80° C и они могут быть помещены непосредственно в жидкий азот (−196° C) для постоянного хранения, например, в сосуд для долговременного криогенного хранения.

1. Т-клетки

Настоящее изобретение предусматривает получение усовершенствованных композиций с несущими CAR Т-клетками. Т-клетки, используемые для получения несущих CAR Т-клеток, могут быть аутологичными/аутогенными («собственными») или неаутологичными («несобственными», *например,* аллогенными, сингенными или ксеногенными). Согласно предпочтительным вариантам реализации указанные Т-клетки получают от субъекта-млекопитающего. Согласно более предпочтительному варианту реализации указанные Т-клетки получают от субъекта-примата. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации указанные Т-клетки получают от субъекта-человека.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани вилочковой железы, ткани

пораженного инфекцией участка, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки могут быть получены из объема крови, взятого у субъекта, с применением любого числа техник, известных специалисту, например, осаждения, такого как разделение в фиколле (FICOLL™). Согласно одному варианту реализации клетки циркулирующей крови индивидуума получают с применением афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному варианту реализации клетки, собранные с применением афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещены в подходящий буфер или среду для последующей обработки. Клетки могут быть промыты ФСБ или другим подходящим растворе, не содержащем кальция, магния, и большинства или всех других дивалентных катионов. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания может осуществляться с применением способов, известных в данной области техники, например, с применением полуавтоматической проточной центрифуги, например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или т.п. После промывания клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах или другом солевом растворе, содержащем или не содержащем буфер. Согласно некоторым вариантам реализации нежелательные компоненты полученного при аферезе образца могут быть удалены из культуральной среды, в которой непосредственно ресуспендированы клетки.

Согласно конкретным вариантам реализации в способах получения, предусмотренных настоящим изобретением, используют популяцию клеток, содержащую Т-клетки, например, клетки МКПК. Согласно другим вариантам реализации в способах получения, предусмотренных настоящим изобретением, используют выделенную или очищенную популяцию Т-клеток. Клетки могут быть выделены из мононуклеарных клеток периферической крови (клеток МКПК) путем лизиса эритроцитов и истощения по моноцитам, например, путем центрифугирования в градиенте перколла (PERCOLL™). Согласно некоторым вариантам реализации после выделения МКПК и цитотоксические, и хелперные Т-лимфоциты могут быть сортированы на субпопуляциях необученных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток, либо до, либо после активации, размножения и/или генетической модификации.

Дополнительно может быть выделена с применением техник положительного или отрицательного отбора специфическая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих один или более из следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 и HLA-DR. Согласно одному варианту реализации с применением техник положительного или отрицательного отбора дополнительно выделяют специфическую субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из i) CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; или ii) CD38 или CD62L, CD127, CD197 и CD38. Согласно различным вариантам реализации полученные композиции с Т-клетками не экспрессируют или по существу не экспрессируют один или более из следующих маркеров: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 и LAG3.

Согласно одному варианту реализации экспрессия одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD62L, CD127, CD197 и CD38, возрастает по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз или более по сравнению с экспрессией в популяции Т-клеток, активированных и размноженных в отсутствие ингибитора PI3K.

Согласно одному варианту реализации экспрессия одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 и LAG3, снижается по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз или более по сравнению с популяцией Т-клеток, активированных и размноженных в присутствии ингибитора PI3K.

Согласно одному варианту реализации способы получения предусмотренную настоящим изобретением обеспечивают увеличение числа несущих CAR Т-клеток, содержащих один или более маркеров необученных или обладающих дифференцировочным потенциалом Т-клеток. Без ограничения какой-либо конкретной теорией авторы настоящего изобретения считают, что обработка популяции клеток, содержащей Т-клетки, одним или более ингибиторами PI3K, приводит к стимуляции размножения обладающих дифференцировочным потенциалом Т-клеток и

обеспечивает более надежную и эффективную адоптивную иммунотерапию несущими CAR Т-клетками по сравнению с существующими вариантами терапии несущими CAR Т-клетками.

Иллюстративные примеры маркеров необученных или обладающих дифференцировочным потенциалом Т-клеток, уровни которых повышены в Т-клетках, полученных с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленными, CD62L, CD127, CD197 и CD38. Согласно конкретным вариантам реализации необученные Т-клетки не экспрессируют или по существу не экспрессируют один или более из следующих маркеров: CD57, CD244, CD160, PD-1, BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3 и LAG3.

Что касается Т-клеток, популяции Т-клеток, полученные в результате применения различных методик размножения, предусмотренных настоящим изобретением, могут отличаться различными специфическими фенотипическими свойствами в зависимости от задействованных условий. Согласно различным вариантам реализации размноженные популяции Т-клеток содержат один или более из следующих фенотипических маркеров: CD62L, CD127, CD197, CD38 и HLA-DR.

Согласно одному варианту реализации такие фенотипические маркеры включают усиленную экспрессию одного или более из маркеров CD62L, CD127, CD197 и CD38, или всех указанных маркеров. Согласно конкретным вариантам реализации размножают $CD8^+$ Т-лимфоциты, характеризующиеся экспрессией фенотипических маркеров необученных Т-клеток, в том числе CD62L, CD127, CD197 и CD38.

Согласно конкретным вариантам реализации размножают Т-клетки, характеризующиеся экспрессией фенотипических маркеров центральных Т-клеток памяти, включающих положительные по CD45RO, CD62L, CD127, CD197 и CD38 и отрицательные по гранзиму В клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанные центральные Т-клетки памяти представляют собой $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD8^+$ Т-клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации размножают $CD4^+$ Т-лимфоциты, характеризующиеся экспрессией фенотипических маркеров необученных CD4+ клеток, в том числе положительных по CD62L и отрицательных по экспрессии CD45RA и/или CD45RO. Согласно некоторым вариантам реализации CD4+ клетки характеризующиеся

экспрессией фенотипических маркеров центральных CD4+ клеток памяти, включают положительные по CD62L и CD45RO клетки. Согласно некоторым вариантам реализации эффекторные CD4+ клетки являются положительными по CD62L и отрицательными по CD45RO.

Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки выделяют из организма индивидуума, активируют и стимулируют их пролиферацию *in vitro* до проведения генетической модификации для экспрессии CAR против BCMA. Таким образом, культивирование Т-клеток может осуществляться до и/или после проведения генетической модификации (*m. e.* трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR против BCMA, предусмотренной настоящим изобретением).

2. Активация и размножение

Для обеспечения достаточных терапевтических доз композиций с Т-клетками часто проводят один или более раундов стимуляции, активации и/или размножения Т-клеток . Т-клетки могут быть активированы и размножены в общем с применением способов согласно описанию, например, в патентах США 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; и 6867041, каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Т-клетки, модифицированный для экспрессии CAR против BCMA, могут быть активированы и размножены до и/или после модификации указанных Т-клеток. Кроме того, Т-клетки могут быть приведены в контакт с одним или более агентами, которые модулируют клеточный сигнальный PI3K-путь до, во время, и/или после активации и/или размножения. Согласно одному варианту реализации Т-клетки, полученные с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, проходят один, два, три, четыре, или пять или более раундов активации и размножения, каждый из которых может включать один или более агентов, которые модулируют клеточный сигнальный PI3K-путь.

Согласно одному варианту реализации на антигенпрезентирующей клетке (*например,* иАПК, дендритной клетке, В-клетке и т.п.) экспонирован костимулирующий лиганд, который специфически связывает когнатную костимулирующую молекулу на Т-клетке, обеспечивая таким образом сигнал, который, наряду с первичным сигналом, обеспечиваемым, например, связыванием комплекса TCR/CD3, опосредует требуемый

Т-клеточный ответ. Подходящие костимулирующие лиганды включают, не ограничиваясь перечисленными, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L 1, PD-L2, 4–1BBL, OX40L, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина-бета, ILT3, ILT4, агонист или антитело, которое связывает рецептор Toll лиганда, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3.

Согласно конкретному варианту реализации костимулирующий лиганд включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, CD27, CD28, 4- IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, 1COS, лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Подходящие костимулирующие лиганды также включают целевые антигены, которые могут быть представлены в растворимой форме или экспрессированы на АПК или иАПК, связывающих сконструированные TCR или CAR, экспрессируемые на модифицированных Т-клетках.

Согласно различным вариантам реализации способ получения Т-клеток, предусмотренный настоящим изобретением, включает активацию популяции клеток, содержащей Т-клетки, и размножение указанной популяция Т-клеток. Активация Т-клеток может осуществляться путем обеспечения первичного стимулирующего сигнала через Т-клеточный комплекс TCR/CD3 или стимуляции поверхностного белка CD2, а также путем обеспечения вторичного костимулирующего сигнала через вспомогательную молекулу, *например,* CD28.

Стимуляция комплекса TCR/CD3 может осуществляться путем приведения Т-клетки в контакт с подходящим связывающим CD3 агентом, например, лигандом CD3 или моноклональным антителом против CD3. Иллюстративные примеры антител к CD3 включают, не ограничиваясь перечисленными, OKT3, G19-4, BC3 и 64.1.

Согласно другому варианту реализации для обеспечения первичного стимулирующего сигнала для Т-клеток может применяться связывающий CD2 агент. Иллюстративные примеры связывающих CD2 агентов включают, не ограничиваясь перечисленными,

лиганды CD2 и антитела против CD2, например, антитело T11.3 в комбинации с антителом T11.1 или T11.2 (Meuer, S. C. *et al.* (1984) *Cell* 36:897-906), и антитело 9.6 (которое распознает тот же эпитоп, что и T11.1) в комбинации антителом 9-1 (Yang, S. Y. *et al.* (1986) *J. Immunol.* 137:1097-1100). Могут также применяться другие антитела, которые связываются с теми же эпитопами, что и любые из вышеописанных антител. Дополнительные антитела или комбинации антител могут быть получены и идентифицированы с применением стандартных техник согласно описанию в различных разделах настоящего документа.

Помимо первичного стимулирующего сигнала, проходящего через комплекс TCR/CD3, или через CD2, для индукции Т-клеточного ответа необходим второй, костимулирующий сигнал. Согласно конкретным вариантам реализации для обеспечения костимулирующего сигнала может применяться связывающий CD28 агент. Иллюстративные примеры связывающих CD28 агентов включают, не ограничиваясь перечисленными: естественные лиганды CD28, например, естественный лиганд CD28 (*например,* представитель семейства белков B7, такой как B7-1(CD80) и B7-2 (CD86); и моноклональное антитело против CD28 или его фрагмент, способный к перекрестному связыванию молекулы CD28, например, моноклональные антитела 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 и EX5.3D10.

Согласно одному варианту реализации молекула, обеспечивающая первичный стимулирующий сигнал, например, молекула, которая обеспечивает стимуляцию через комплекс TCR/CD3 или CD2, и костимулирующая молекула присоединены к одной и той же поверхности.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие агенты, которые обеспечивают стимулирующий и костимулирующий сигналы, локализованы на поверхности клетки. Это может быть обеспечено путем трансфекции или трансдукции клетки нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий агент, в форме, подходящей для экспрессии на поверхности клетки или, как вариант, путем соединения связывающего агента с поверхностью клетки.

Согласно другому варианту реализации молекула, обеспечивающая первичный стимулирующий сигнал, например, молекула, которая обеспечивает стимуляцию через

комплекс TCR/CD3 или CD2, и костимулирующая молекула экспонированы на антигенпрезентирующих клетках.

Согласно одному варианту реализации молекула, обеспечивающая первичный стимулирующий сигнал, например, молекула, которая обеспечивает стимуляцию через комплекс TCR/CD3 или CD2, и костимулирующая молекула располагаются на отдельных поверхностях.

Согласно определенному варианту реализации, один из связывающих агентов, которые обеспечивают стимулирующий и костимулирующий сигналы, является растворимым (представлен в растворе), а другой(ие) агент(ы) располагает(ют)ся на одной или более поверхностях.

Согласно конкретному варианту реализации связывающие агенты, которые обеспечивают стимулирующий и костимулирующий сигналы, представлены растворимой формой (в растворе).

Согласно различным вариантам реализации способы получения Т-клеток, предусмотренных настоящим изобретением, включают активацию Т-клеток антителами против CD3 и против CD28.

Композиции с Т-клетками, полученные с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, содержат Т-клетки, активированные и/или размноженные в присутствии одного или более агентов, ингибирующих клеточный сигнальный PI3K-путь. Т-клетки, модифицированные для экспрессии CAR против BCMA, могут быть активированы и размножены до и/или после модификации указанных Т-клеток. Согласно конкретным вариантам реализации популяцию Т-клеток активируют, модифицируют для экспрессии несущих CAR к BCMA, и затем культивируют для размножения.

Согласно одному варианту реализации Т-клетки, полученные с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, включают повышенное число Т-клеток, экспрессирующих маркеры, указывающие на высокий пролиферативный потенциал и способность к самообновлению, однако не экспрессирующих или экспрессирующих по существу недетектируемые маркеры Т-клеточной дифференцировки. Указанные Т-клетки могут быть многократно активированы и размножены надежным образом с

получением таким образом усовершенствованной терапевтической Т-клеточной композиции.

Согласно одному варианту реализации популяция Т-клеток, активированных и размноженных в присутствии одного или более агентов, ингибирующих клеточный сигнальный PI3K-путь, увеличивается по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 250 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более по сравнению с популяцией Т-клеток, активированных и размноженных в отсутствие ингибитора PI3K.

Согласно одному варианту реализации популяция Т-клеток, характеризующихся экспрессией маркеров молодых Т-клеток, активированных и размноженных в присутствии одного или более агентов, ингибирующих клеточный сигнальный PI3K-путь, увеличивается по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 250 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более по сравнению с популяцией Т-клеток активированных и размноженных в отсутствие ингибитора PI3K.

Согласно одному варианту реализации размножение Т-клеток, активированных с применением способов, предусмотренных настоящим изобретением, дополнительно включает культивирование популяции клеток, содержащей Т-клетки, в течение периода, составляющего от нескольких часов (приблизительно 3 часов) до приблизительно 7 дней, до приблизительно 28 дней, или соответствующего любому целочисленному количеству часов в диапазоне между указанными значениями. Согласно другому варианту реализации указанная композиция с Т-клетками может культивироваться в течение 14 дней. Согласно конкретному варианту реализации Т-клетки культивируют в течение приблизительно 21 дня. Согласно другому варианту реализации композиции с Т-клетками культивируют в течение приблизительно 2–3 дней. Может дополнительно требоваться несколько циклов

стимуляции/активации/размножения; таким образом, продолжительность культивирования Т-клеток может составлять 60 дней или более.

Согласно конкретным вариантам реализации условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают подходящую среду (*например,* минимальную питательную среду или среду RPMI 1640, или X-vivo 15 (Lonza)) и один или более факторов, необходимых для пролиферации и жизнеспособность, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, сыворотку (*например,* фетальную бычью сыворотку или сыворотку человека), интерлейкин-2 (ИЛ-2), инсулин, ИФН-γ, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-21, ГМ-КСФ, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-15, ТРФβ и ФНО-α, или любые другие известные специалистам добавки, подходящие для роста клеток.

Дополнительные иллюстративные примеры клеточных культуральных сред включают, не ограничиваясь перечисленными, RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer, с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, либо не содержащие сыворотки, либо с добавлением подходящего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов, и/или количества цитокина(ов), достаточного для роста и размножения Т-клеток.

Иллюстративные примеры других добавок для размножения Т-клеток включают, не ограничиваясь перечисленными, поверхностно-активные вещества, плазманат, pH-буферы, такие как HEPES, и восстанавливающий агенты, такие как N-ацетил-цистеин и 2-меркаптоэтанол.

Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток для вливания субъекту. Целевые клетки поддерживают в условиях, необходимых для обеспечения роста, например, при подходящей температуре (*например,* 37° C) и в подходящей атмосфере (*например,* воздух плюс 5% CO_2).

Согласно конкретным вариантам реализации клетки МКПК или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим агентом и костимулирующим агентом, например, антителами против CD3 и против CD28, обычно присоединенными к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15.

Согласно другим вариантам реализации искусственные АПК (иАПК), получают путем конструирования клеток K562, U937, 721.221, T2 и C1R, направляющих стабильную экспрессию и секрецию различных костимулирующих молекул и цитокинов. Согласно конкретному варианту реализации иАПК на основе K32 или U32 используют для направленного экспонирования одной или более стимулирующих молекул на основе антител на поверхности клеток иАПК. Популяции Т-клеток могут быть размножены с применением иАПК, экспрессирующих различные костимулирующие молекулы, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L), и/или CD80 или CD86. Наконец, иАПК обеспечивают эффективную платформу для размножения генетически модифицированных Т-клеток и поддержания экспрессии CD28 на CD8-Т-клетках. Клетки иАПК, предложенные в WO 03/057171 и US2003/0147869 полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

3. Агенты

Согласно различным вариантам реализации предложен способ получения Т-клеток, который обеспечивает размножение недифференцированных или обладающих дифференцировочным потенциалом Т-клеток, включающий приведение Т-клеток в контакт с агентом, который модулирует путь PI3K в указанных клетках. Согласно различным вариантам реализации предложен способ получения Т-клеток, отличающийся размножением недифференцированных или обладающих дифференцировочным потенциалом Т-клеток, включающий приведение Т-клеток в контакт с агентом, который модулирует путь PI3K/AKT/mTOR в указанных клетках. Контакт указанных клеток с агентом может осуществляться до, во время и/или после активации и размножения. Композиции с Т-клетками сохраняют достаточный дифференцировочный потенциал, таким образом, Т-клетки могут проходить многократные раунды размножения без существенного увеличения степени дифференцировки.

В настоящем документе термины «модулировать», «модулятор» или «модулирующий агент», или сходные термины относятся к способности агента вызывать изменения клеточного сигнального пути. Модулятор может повышать или снижать количество или активность компонента пути, или увеличивать или уменьшать требуемый эффект или исход клеточного сигнального пути. Согласно одному варианту реализации

указанный модулятор представляет собой ингибитор. Согласно другому варианту реализации указанный модулятор представляет собой активатор.

Термин «агент» относится к соединению, малой молекуле, например, малой органической молекуле, нуклеиновой кислоте, полипептиду или его(ее) фрагменту, изоформе, варианту, аналогу или производному, используемым для модуляции пути PI3K/AKT/mTOR.

Термин «малая молекула» относится к композиции, молекулярная масса которой составляет менее чем приблизительно 5 кДа, менее чем приблизительно 4 кДа, менее чем приблизительно 3 кДа, менее чем приблизительно 2 кДа, менее чем приблизительно 1 кДа, или менее чем приблизительно 0,5 кДа. Малые молекулы могут включать нуклеиновые кислоты, пептиды, полипептиды, пептидомиметики, пептоиды, углеводы, липиды, их компоненты или другие органические или неорганические молекулы. Библиотеки химических и/или биологических смесей, например, на основе экстрактов грибов, бактерий или водорослей, известны в данной области техники; может проводиться их скрининг с применением любых анализов согласно настоящему изобретению. Примеры способов синтеза молекулярных библиотек можно найти в источниках: (Carell *et al.*, 1994a; Carell *et al.*, 1994b; Cho *et al.*, 1993; DeWitt *et al.*, 1993; Gallop *et al.*, 1994; Zuckermann *et al.*, 1994).

Термин «аналог» относится к малому органическому соединению, нуклеотиду, белку или полипептиду, отличающемуся аналогичной или идентичной активностью или функцией(ями), что и соединение, нуклеотид, белок или полипептид, или соединению, обладающему нужной активностью согласно настоящему изобретению, однако не обязательно содержащему последовательность или структуру, аналогичную или идентичную последовательности или структуре согласно предпочтительному варианту реализации.

Термин «производное» относится к соединению, белку или полипептиду, который(ое) содержит последовательность аминокислот исходного белка или полипептида, измененную путем введения замен, удалений или добавлений остатков аминокислот, или к нуклеиновой кислоте или нуклеотиду, которая(ый) был(а) модифицирован(а) путем введения замен или удалений, добавлений или мутаций нуклеотидов.

Производное нуклеиновой кислоты, нуклеотида, белка или полипептида обладает функцией, аналогичной или идентичной функции исходного полипептида.

Согласно различным вариантам реализации агент, модулирующий путь PI3K, активирует компонент указанного пути. Термин «активатор», или «агонист» относится к агенту, который способствует, повышает или индуцирует один или более видов активности молекулы в пути PI3K/AKT/mTOR, включая, без ограничений, молекулу, которая ингибирует один или более видов активности PI3K.

Согласно различным вариантам реализации агент, модулирующий путь PI3K, ингибирует компонент указанного пути. Термин «ингибитор» или «антагонист» относится к агенту, который ингибирует, понижает или ослабляет один или более видов активности молекулы в пути PI3K, включая, без ограничений, PI3K. Согласно одному варианту реализации указанный ингибитор представляет собой двойной молекулярный ингибитор. Согласно конкретному варианту реализации указанный ингибитор может ингибировать класс молекул, отличающихся одинаковыми или по существу аналогичными видами активности (универсальный ингибитор) или может специфически ингибировать активность одной молекулы (селективный или специфический ингибитор). Ингибирование может также быть необратимым или обратимым.

Согласно одному варианту реализации IC50 указанного ингибитора составляет по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 200 нМ, по меньшей мере 500 нМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ или по меньшей мере 100 мкМ. Концентрация IC50 может быть определена с применением любых стандартных техник, известных в данной области техники. Например, IC50 может быть определена по изменению активности определенного фермента в присутствии некоторого диапазона концентраций исследуемого ингибитора. Затем строят график зависимости полученных экспериментальным путем значений активности фермента от использованных концентраций ингибитора. Концентрацию ингибитора, при которой наблюдается 50% активности фермента (по сравнению с активностью в отсутствие любого ингибитора) принимают за значение «IC50». Аналогичным образом, путем определения активности подходящим способом, могут быть определены другие ингибиторные концентрации.

Согласно различным вариантам реализации Т-клетки приводят в контакт, обрабатывают или культивируют с одним или более модуляторами пути PI3K в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 200 нМ, по меньшей мере 500 нМ, по меньшей мере 1 мкМ, по меньшей мере 10 мкМ, по меньшей мере 50 мкМ, по меньшей мере 100 мкМ или по меньшей мере 1 М.

Согласно конкретным вариантам реализации Т-клетки могут быть приведены в контакт, обработаны или культивированы с одним или более модуляторами пути PI3K в течение по меньшей мере 12 часов, 18 часов, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7 дней, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев или более, с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более раундами размножения.

a. Путь PI3K/Akt/mTOR

Путь фосфатидилинозитол-3-киназы/Akt/мишени рапамицина у млекопитающих служит в качестве канала интеграции связанной с факторами роста сигнализации с клеточной пролиферацией, дифференцировкой, метаболизмом и выживанием. Киназы PI3K представляют собой семейство высококонсервативных внутриклеточных липидкиназ. PI3K класса IA активируются рецепторами факторов роста с тирозинкиназной активностью (RTK), либо прямо, либо через взаимодействие с адаптерными молекулами семейства субстратов инсулинового рецептора. Указанная активность приводит к синтезу фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3), регулятора серин-треониновой киназы Akt. mTOR действует через классический PI3K-путь, и его действие опосредовано 2 разными комплексами, каждый из которых характеризуется разными партнерами для связывания, которые обеспечивают разные виды активности. mTORC1 (mTOR в комплексе с PRAS40, Raptor и mLST8/GbL) функционирует в качестве зависимого (нижерасположенного) эффектора в пути сигнализации PI3K/Akt, связывая сигналы факторов роста с трансляцией белков, ростом клеток, пролиферацией и выживанием. mTORC2 (mTOR в комплексе с белками Rictor, mSIN1, Protor и mLST8) функционирует в качестве регулирующего (вышерасположенного) активатора Akt.

При опосредованной рецептором фактора роста активации PI3K происходит рекрутинг Akt в мембрану посредством взаимодействия его плекстрин-гомологичного домена с PIP3, с экспонированием таким образом петли активации и обеспечением фосфорилирования по треонину 308 (Thr308) конститутивно активной фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой 1 (PDK1). Для максимальной активации Akt дополнительно фосфорилируется mTORC2 по серину 473 (Ser473) на С-концевом гидрофобном мотиве. Также была продемонстрирована важность ДНК-ПК и HSP для регуляции активности Akt. Akt активирует mTORC1 путем ингибирующего фосфорилирования TSC2, наряду с TSC1 негативно регулирующего mTORC1 путем ингибирования ГТФазы Rheb, позитивного регулятора mTORC1. У mTORC1 имеется 2 точно определенных субстрата, p70S6K (далее называемый S6K1) и 4E-BP1; оба критически важны для регуляции белкового синтеза. Соответственно, mTORC1 представляет собой важный нижерасположенный эффектор PI3K, связывающий сигналы факторов роста с трансляцией белков и клеточной пролиферацией.

b. Ингибиторы PI3K

В настоящем документе термин «ингибитор PI3K» относится к нуклеиновой кислоте, пептиду, соединению или малой органической молекуле, которая(ый,ое) связывается с PI3K и ингибирует по меньшей мере один вид активности PI3K. Белки PI3K могут быть разделены на три класса, PI3K класса 1, PI3K класса 2 и PI3K класса 3. PI3K класса 1 существуют в виде гетеродимеров, состоящих из одной из четырех каталитических субъединиц p110 (p110α, p110β, p110δ и p110γ) и одной субъединицы из двух семейств регуляторных субъединиц. Ингибитор PI3K согласно настоящему изобретению предпочтительно нацелен на ингибиторы PI3K класса 1. Согласно одному варианту реализации ингибитор PI3K проявляет селективность в отношении одной или более изоформ ингибиторов PI3K класса 1 (т. е. селективность в отношении p110α, p110β, p110δ и p110γ, или одной или более из p110α, p110β, p110δ и p110γ). Согласно другому аспекту ингибитор PI3K не проявляет селективность в отношении изоформ и считается «универсальным ингибитором PI3K». Согласно одному варианту реализации ингибитор PI3K конкурирует за связывание с АТФ с каталитическим доменом PI3K.

Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор PI3K может, например, быть нацелен на PI3K, а также на дополнительные белки пути PI3K-AKT-mTOR. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор PI3K, который нацелен и на mTOR, и на

PI3K, может называться либо ингибитором mTOR, либо ингибитором PI3K. Ингибитор PI3K, нацеленный исключительно на PI3K может называться селективным ингибитором PI3K. Согласно одному варианту реализации под селективным ингибитором PI3K может подразумеваться агент, демонстрирующий 50% ингибирующую концентрацию в отношении PI3K, значение которой меньше по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более, чем IC50 указанного ингибитора в отношении mTOR и/или других белков указанного пути.

Согласно конкретному варианту реализации примеры ингибиторов PI3K ингибируют PI3K с IC50 (концентрацией ингибирования 50% активности), составляющей приблизительно 200 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 100 нм или менее, еще более предпочтительно приблизительно 60 нМ или менее, приблизительно 25 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 1 нМ, 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ или менее. Согласно одному варианту реализации ингибитор PI3K ингибирует PI3K с IC50, составляющей от приблизительно 2 нМ до приблизительно 100 нм, более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 50 нМ, еще более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 15 нМ.

Иллюстративные примеры ингибиторов PI3K, подходящих для применения в способах получения Т-клеток, предусмотренных настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленными, BKM120 (ингибитор PI3K класса 1, Novartis), XL147 (ингибитор PI3K класса 1, Exelixis), (универсальный ингибитор PI3K, GlaxoSmithKline) и PX-866 (ингибитор PI3K класса 1; изоформы p110α, p110β и p110γ, Oncothyreon).

Другие иллюстративные примеры селективных ингибиторов PI3K включают, не ограничиваясь перечисленными, BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474 и IPI-145.

Дополнительные иллюстративные примеры универсальных ингибиторов PI3K включают, не ограничиваясь перечисленными, BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 и GDC-0941.

c. Ингибиторы AKT

В настоящем документе термин «ингибитор AKT» относится к нуклеиновой кислоте, пептиду, соединению или малой органической молекуле, который(ая, ое) ингибирует по меньшей мере один вид активности AKT. Ингибиторы AKT могут быть сгруппированы в несколько классов, включающих ингибиторы на основе липидов (*например,* ингибиторы, нацеленные на плекстрин-гомологичный домен AKT, который предотвращает локализацию AKT на плазматических мембранах), АТФ-конкурентные ингибиторы и аллостерические ингибиторы. Согласно одному варианту реализации ингибиторы AKT действуют посредством связывания с каталитическим сайтом AKT. Согласно конкретному варианту реализации ингибиторы Akt действуют посредством ингибирования фосфорилирования зависимых от AKT мишеней, таких как mTOR. Согласно другому варианту реализации ингибирование активности AKT происходит за счет ингибирования входных сигналов активации Akt, например, посредством ингибирования ДНК-ПК-активации AKT, PDK-1-активации AKT и/или mTORC2-активации Akt.

Ингибиторы AKT могут быть нацелены на все три изоформы AKT, AKT1, AKT2, AKT3 или могут селективными по изоформам и нацеленными только на одну или две из изоформ AKT. Согласно одному варианту реализации ингибитор AKT может быть нацелен на AKT, а также на дополнительные белки пути PI3K-AKT-mTOR. Ингибитор AKT, нацеленный только на AKT, может называться селективным ингибитором AKT. Согласно одному варианту реализации под селективным ингибитором AKT может подразумеваться агент, демонстрирующий 50% ингибирующую концентрацию в отношении AKT, значение которой ниже по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более относительно IC50 указанного ингибитора в отношении других белков указанного пути.

Согласно конкретному варианту реализации примеры ингибиторов AKT ингибируют AKT с IC50 (концентрацией ингибирования 50% активности), составляющей приблизительно 200 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 100 нм или менее, еще более предпочтительно приблизительно 60 нМ или менее, приблизительно 25 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 1 нМ, 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ или менее. Согласно одному варианту реализации

ингибитор AKT ингибирует AKT с IC50, составляющей от приблизительно 2 нМ до приблизительно 100 нм, более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 50 нМ, еще более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 15 нМ.

Иллюстративные примеры ингибиторов AKT для применения в комбинации с конъюгатами антитело-лекарственное средство на основе ауристатина включают, например, перифосин (Keryx), MK2206 (Merck), VQD-002 (VioQuest), XL418 (Exelixis), GSK690693, GDC-0068 и PX316 (PROLX Pharmaceuticals).

Иллюстративным неограничивающим примером селективного ингибитора Akt1 является A-674563.

Иллюстративным неограничивающим примером селективного ингибитора Akt2 является CCT128930.

Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор Akt ингибирует ДНК-ПК-активацию Akt, PDK-1-активацию Akt, mTORC2-активацию Akt или HSP-активацию Akt.

Иллюстративные примеры ингибиторов ДНК-ПК включают, не ограничиваясь перечисленными, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 и PP-121.

d. Ингибиторы mTOR

Термины «ингибитор mTOR», или «агент, который ингибирует mTOR» относятся к нуклеиновой кислоте, пептиду, соединению или малой органической молекуле, которая(ый) ингибирует по меньшей мере один вид активности белка mTOR, такую как, например, активность серин-треониновой протеинкиназы по меньшей мере на одном из субстратов (*например,* киназы-1 p70S6, 4E-BP1, AKT/PKB и eEF2). Ингибиторы mTOR способны непосредственно связываться с mTORC1, mTORC2 или как mTORC1, так и mTORC2, и ингибировать их активность.

Ингибирование активности mTORC1 и/или mTORC2 может быть определено по ослаблению передачи сигнала по пути PI3K/Akt/mTOR. Для установления снижения выходного сигнала такого сигнального пути можно использовать широкий спектр индикаторов. Некоторые неограничивающие примеры индикаторов включают (1)

уменьшение фосфорилирования Akt, в том числе по остаткам 5473 и T308, но не ограничиваясь ими; (2) снижение активации Akt, на основании, например, наблюдаемого снижения фосфорилирования субстратов Akt, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, Fox01/O3a T24/32, GSK3a/β; S21/9 и TSC2 T1462; (3) уменьшение фосфорилирования сигнальных молекул, зависимых от mTOR, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, рибосомального белка S6 S240/244, 70S6K T389 и 4EBP1 T37/46; и (4) ингибирование пролиферации раковых клеток.

Согласно одному варианту реализации ингибиторы mTOR представляют собой ингибиторы активного сайта. Они представляют собой ингибиторы mTOR, которые связываются с сайтом связывания АТФ (который также называют АТФ-связывающим карманом) mTOR и ингибируют каталитическую активность и mTORC1, и mTORC2. Один из классов ингибиторов активного сайта, подходящих для применения в способах получения Т-клеток, предусмотренных настоящим изобретением, представлен ингибиторами с двойной специфичностью, нацеленными как на PI3K, так и на mTOR, и прямо ингибирующими их. Ингибиторы с двойной специфичностью связываются с сайтами связывания АТФ как mTOR, так и PI3K. Иллюстративные примеры таких ингибиторов включают, не ограничиваясь перечисленными: имидазохинолины, вортманнин, LY294002, PI-103 (Cayman Chemical), SF1126 (Semafore), BGT226 (Novartis), XL765 (Exelixis) и NVP-BEZ235 (Novartis).

Другой класс ингибиторов активного сайта mTOR, подходящих для применения в предусмотренных настоящим изобретением способах, селективно ингибирует активность mTORC1 и mTORC2 в отношении одной или более фосфатидилинозитол-3-киназ типа I, например, PI3-киназы α, β, γ или δ. Указанные ингибиторы активного сайта связываются с активным сайтом mTOR, но не PI3K. Иллюстративные примеры таких ингибиторов включают, не ограничиваясь перечисленными: пиразолопиримидины, торин 1 (Guertin and Sabatini), PP242 (2-(4-амино-1-изопропил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-1H-индол-5-ол), PP30, Ku-0063794, WAY-600 (Wyeth), WAY-687 (Wyeth), WAY-354 (Wyeth) и AZD8055 (Liu *et al.*, Nature Review, 8, 627-644, 2009). I

Согласно одному варианту реализации селективный ингибитор mTOR представляет собой агент, который демонстрирует 50% ингибирующую концентрацию (IC50) в отношении mTORC1 и/или mTORC2, значение которой ниже по меньшей мере в 10 раз,

по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более относительно IC50 указанного ингибитора в отношении одной, двух, трех или более PI3-киназ типа I или в отношении всех PI3-киназ типа I.

Другой класс ингибиторов mTOR для применения согласно настоящему изобретению называется в настоящем документе «рапалогами». В настоящем документе термин «рапалоги» относится к соединениям, которые специфически связываются с FRB-доменом mTOR (FKBP-рапамицин-связывающий домен), структурно родственны рапамицину и сохраняют ингибирующие свойства mTOR. Термин «рапалоги» исключает рапамицин. Рапалоги включают сложные эфиры, простые эфиры, оксимы, гидразоны и гидроксиламины рапамицина, а также соединения, в которых функциональные группы коровой структуры рапамицина были модифицированы, например, путем восстановления или окисления. Фармацевтически приемлемые соли таких соединений также считаются производными рапамицина. Иллюстративные примеры рапалогов, подходящих для применения в способах, предусмотренных настоящим изобретением, включают, без ограничения, темсиролимус (CC1779), эверолимус (RAD001), дефоролимус (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca) и OSI-027 (OSI).

Согласно одному варианту реализации указанный агент представляет собой ингибитор mTOR рапамицин (сиролимус).

Согласно конкретному варианту реализации примеры ингибиторов mTOR для применения согласно настоящему изобретению ингибируют либо mTORC1, либо mTORC2, или как mTORC1, так и mTORC2, с IC50 (концентрацией ингибирования 50% активности), составляющей приблизительно 200 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 100 нм или менее, еще более предпочтительно составляющей приблизительно 60 нМ или менее, приблизительно 25 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 1 нМ, 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ или менее. Согласно одному аспекту ингибитор mTOR для применения согласно настоящему изобретению ингибирует либо mTORC1, либо mTORC2, или как mTORC1, так и mTORC2 с IC50, составляющей от приблизительно 2 нМ до приблизительно 100 нм, более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 50 нМ, еще более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 15 нМ.

Согласно одному варианту реализации примеры ингибиторов mTOR ингибируют либо PI3K и mTORC1, либо mTORC2, или как mTORC1 и mTORC2, так и PI3K с IC50 (концентрацией ингибирования 50% активности), составляющей приблизительно 200 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 100 нм или менее, еще более предпочтительно приблизительно 60 нМ или менее, приблизительно 25 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 1 нМ, 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, или менее. Согласно одному аспекту ингибитор mTOR для применения согласно настоящему изобретению ингибирует PI3K и mTORC1, или mTORC2, или как mTORC1, так и mTORC2 и PI3K с IC50, составляющей от приблизительно 2 нМ до приблизительно 100 нм, более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 50 нМ, еще более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 15 нМ.

Дополнительные иллюстративные примеры ингибиторов mTOR, подходящих для применения согласно конкретным вариантам реализации, предусмотренным настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленными, AZD8055, INK128, рапамицин, PF-04691502 и эверолимус.

Как было показано, mTOR демонстрирует устойчивую специфическую каталитическую активность в отношении физиологических субстратных белков, рибосомальной протеинкиназы I p70 S6 (p70S6K1) и связывающего eIF4E белка 1 (4EBP1) по оценке с применением вестерн-блоттинга с фосфоспецифичными антителами.

Согласно одному варианту реализации указанный ингибитор пути PI3K/AKT/mTOR представляет собой ингибитор киназы s6, выбранный из группы, состоящей из: BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK и AT7867.

I. Композиции и составы

Предусмотренные настоящим изобретением композиции могут содержать один(одну) или более полипептидов, полинуклеотидов, содержащих их векторов, генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток и т.п., предусмотренных настоящим изобретением. Композиции включают, не ограничиваясь указанными, фармацевтические композиции. Термин «фармацевтическая композиция» относится к композициям, представленным фармацевтически приемлемыми или физиологически приемлемыми растворами для введения в клетку или в организм животного, либо

отдельно, либо в комбинации с одним или более другими способами терапии. Следует также понимать, что, при необходимости, композиции согласно настоящему изобретению также могут вводиться в комбинации с другими агентами, такими как, например, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные средства, антитела или различные другие фармацевтически активные агенты. Практически не существует ограничений в отношении других компонентов, которые могут быть дополнительно включены в указанные композиции, при условии, что указанные дополнительные агенты не оказывают неблагоприятного воздействия на способность указанной композиции обеспечивать предполагаемое лечение.

Выражение «фармацевтически приемлемый» в настоящем документе относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, согласно здравой медицинской оценке, подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без возникновения излишней токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблем или осложнений, соответствуя разумному соотношению пользы и риска.

В настоящем документе «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество» включает без ограничения любой адъювант, носитель, вспомогательное вещество, скользящее вещество, подслащивающий агент, разбавитель, консервант, пигмент/краситель, усилитель запаха и вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, одобренный Управлением администрации США по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств как приемлемый для применения у человека или домашних животных. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, не ограничиваясь перечисленными, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли,

такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и любые другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Согласно конкретным вариантам реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат некоторое количество CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, предусмотренных настоящим изобретением. В настоящем документе термин «количество» относится к «эффективному количеству» генетически модифицированных терапевтических клеток, например, Т-клеток, или «количеству, эффективному для» достижения благоприятного или требуемому профилактического или терапевтического результата, в том числе клинических результатов.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству генетически модифицированных терапевтических клеток, эффективному для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, не необязательно, поскольку профилактическую дозу вводят субъектам до возникновения заболевания или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество меньше, чем терапевтически эффективное количество.

«Терапевтически эффективное количество» генетически модифицированных терапевтических клеток может варьировать в зависимости от таких факторов, как статус заболевания, возраст, пол и масса тела индивидуума, и способность стволовых клеток и клеток-предшественников обеспечивать у индивидуума требуемый ответ. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при использовании которого благоприятные терапевтические эффекты перевешивают какие-либо токсические или пагубные эффекты вируса или трансдуцированных терапевтических клеток. Термин «терапевтически эффективное количество» включает количество, эффективное для «лечения» субъекта (*например,* пациента). При назначении терапевтического количества точное количество для введения композиций согласно настоящему изобретению может быть определено лечащим врачом с учетом индивидуальных различий возраста, массы тела, размера опухоли, степени инфекции или метастазирования, и состояния пациента (субъекта). В целом, можно утверждать,

что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки согласно описанию в настоящем документе, может вводиться в дозировке, соответствующей 10^2 – 10^{10} клеток/кг массы тела, предпочтительно, 10^5 – 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целочисленные варианты в пределах указанных диапазонов. Количество клеток зависит от конечной цели применения композиции, а также от типа включенных в ее состав клеток. Согласно вариантам применения, предложенным в настоящем изобретении, клетки, как правило, находятся в объеме, составляющем 1 л или менее, могут находиться в объеме, составляющем 500 мл или менее, или даже 250 мл, или 100 мл, или менее. Таким образом, плотность требуемых клеток, как правило, превышает 10^6 клеток/мл, обычно превышает 10^7 клеток/мл, обычно составляет 10^8 клеток/мл или более. Клинически релевантное количество иммунных клеток может быть разделено для проведения многократного вливания, в совокупности составляя или превышая количество 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11} или 10^{12} клеток. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, в частности, поскольку все инфузированные клетки будут перенаправлены на конкретный целевой антиген (*например,* легкую цепь κ или λ), могут вводиться меньшие количества клеток, в диапазоне 10^6/кг (10^6-10^{11} на одного пациента). Композиции с CAR-экспрессирующими клетками могут вводиться неоднократно в дозировках, находящихся в пределах указанных диапазонов. Клетки могут быть аллогенными, сингенными, ксеногенными или аутологичными для пациента, получающего терапию. При необходимости лечение может также включать введение митогенов (*например,* ФГА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (*например,* ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-12, ФНО-альфа, ИЛ-18, и ФНО-бета, ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-13, Flt3-L, RANTES, MIP1α и т.п.) согласно описанию в настоящем документе для усиления индукции иммунного ответа.

В целом, композиции, содержащие клетки, активированные и размноженные согласно описанию в настоящем документе, могут применяться при лечении и предотвращении заболеваний, возникающих у индивидуумов с иммунной недостаточностью. В частности, композиции, содержащие CAR-модифицированные Т-клетки, предусмотренные настоящим изобретением, используют при лечении В-клеточных злокачественных новообразований. CAR-модифицированные Т-клетки согласно настоящему изобретению могут вводиться либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и/или другими компонентами, такими как ИЛ-2 или

другие цитокины или популяции клеток. Согласно конкретным вариантам реализации предусмотренные настоящим изобретением фармацевтические композиции содержат некоторое количество генетически модифицированных Т-клеток в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, содержащие популяцию CAR-экспрессирующих иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК или глутатион; адъюванты (*например,* гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно представлены составами для парентерального введения, например, внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутрибрюшинного или внутримышечного введения.

Жидкие фармацевтические композиции, которые могут быть представлены растворами, суспензиями или другими подобными формами, могут включать что-либо одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Состав для парентерального введения может быть заключен в ампул, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика. Инъецируемая фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Согласно конкретному варианту реализации предусмотренные настоящим изобретением композиции содержат эффективное количество экспрессирующих CAR

иммунных эффекторных клеток, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами. Соответственно, композиции, содержащие экспрессирующие CAR иммунные эффекторные клетки, могут вводиться отдельно или применяться в комбинации с другими известными вариантами лечения раковых заболеваний, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т.п. Указанные композиции могут также вводиться в комбинации с антибиотиками. Такие терапевтические агенты могут применяться в ходе общепризнанного в данной области техники стандартного лечения конкретного болезненного состояния согласно описанию в настоящем документе, например, конкретного ракового заболевания. Примеры охваченных настоящим изобретением терапевтических агентов включают цитокины, факторы роста, стероиды, НПВС, DMARD, противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, терапевтические антитела, или другие активные и вспомогательные агенты.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции, содержащие CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки согласно описанию в настоящем документе, могут вводиться в сочетании с любым числом химиотерапевтических агентов. Иллюстративные примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа, и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретаминовую, триэтиленмеламиновую, триэтиленфосфорамидную, триэтилентиофосфорамидную и триметилоломеламиновую группу; мустаргены, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамина оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин,

стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; угнетающие функции надпочечников средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; средство для восполнения содержания фолиевой кислоты, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эфлорнитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (ТАКСОТЕР®., Rhne-Poulenc Rorer, Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметиломитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Таргретин™ (бексаротен), Панретин™ (алитретиноин); ОНТАК™ (денилейкин-дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных агентов. Также в указанное определение включены антигормональные агенты, действие которых заключается в регуляции или ингибировании действия гормонов на раковые заболевания, такие как антиэстрогены, включающие, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, и торемифен (Фарестон); и анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид,

бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных агентов.

Широкий ряд других терапевтических агентов может применяться в сочетании с композициями, описанными в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации композицию, содержащую CAR-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, вводят с противовоспалительным агентом. Противовоспалительные агенты или лекарственные средства включают, не ограничиваясь перечисленными, стероиды и глюкокортикоиды (в том числе бетаматазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВС), включающие аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, направленные против ФНО медикаменты, циклофосфамид и микофенолат.

Другие примеры НПВС выбирают из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, напроксена натрия, ингибиторов Cox-2, таких как VIOXX® (рофекоксиб) и CELEBREX® (целекоксиб) и сиалилатов. Примеры анальгетиков выбирают из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола или гидрохлорида пропоксифена. Примеры глюкокортикоидов выбирают из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. Примеры модификаторов биологического отклика включают молекулы направленного действия против маркеров клеточной поверхности (*например,* CD4, CD5и т.п.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты ФНО (*например,* этанерцепт (ЭНБРЕЛ®), адалимумаб (ХУМИРА®) и инфликсимаб (РЕМИКЕЙД®), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического отклика включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры БМАРП включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (для перорального введения (ауранофин) и внутримышечного введения) и миноциклин.

Иллюстративные примеры терапевтических антител, подходящих для комбинирования с несущими CAR модифицированными Т-клетками, предусмотренными настоящим изобретением, включают, не ограничиваясь перечисленными, бавитуксимаб, бевацизумаб (авастин), биватузумаб, блинатумомаб, конатумумаб, даратумумаб, дулиготумаб, дацетузумаб, далотузумаб, элотузумаб (HuLuc63), гемтузумаб,

ибритутомаб, индатуксимаб, инотузумаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, милатузумаб, моксетумомаб, окаратузумаб, офатумумаб, ритуксимаб, силтуксимаб, тепротумумаб и ублитуксимаб.

Согласно некоторым вариантам реализации описанные в настоящем документе композиции вводят в сочетании с цитокином. Под «цитокином» в настоящем документе подразумевается общий термин для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток и действующих на другую клетку как межклеточные медиаторы. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. Цитокины включает гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилированный гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста гепатоцитов; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли альфа и бета; мюллеров ингибирующий фактор; связанный с гонадотропином пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (ТРО); факторы роста нервов, такие как ФРН-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (ТФР) такие как ТФР-альфа и ТФР-бета; инсулиноподобные факторы роста I и II; эритропоэтин (ЕРО); остеиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета, и гамма; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный КСФ (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ); и гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (ИЛ), такие как ИЛ-1, ИЛ-1-альфа, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12; ИЛ-15, ИЛ-21, фактор некроза опухоли, такой как ФНО-альфа или ФНО-бета; и другие полипептидные факторы, включающие лейкоз-ингибирующий фактор (LIF) и kit-лиганд (KL). В настоящем документе термин «цитокин» включает белки, происходящие из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток, а также биологически активные эквиваленты природных последовательностей цитокинов.

Согласно конкретным вариантам реализации с применением техник положительного или отрицательного отбора может быть дополнительно выделена композиция, содержащая предусмотренные настоящим изобретением CAR Т-клетки,

культивируемые в присутствии ингибитора PI3K согласно описанию в настоящем документе, и экспрессирующие один или более из следующих маркеров: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 и HLA-DR. Согласно одному варианту реализации с применением техник положительного или отрицательного отбора дополнительно выделяют композицию, содержащую специфическую субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих один или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197; и CD38 или CD62L, CD127, CD197 и CD38. Согласно различным вариантам реализации композиции не экспрессируют или по существу не экспрессируют один или более из следующих маркеров: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 и LAG3.

Согласно одному варианту реализации экспрессия одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD62L, CD127, CD197 и CD38, возрастает по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз или более по сравнению с популяцией Т-клеток, активированных и размноженных в отсутствие ингибитора PI3K.

Согласно одному варианту реализации экспрессия одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 и LAG3, снижается по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 25 раз или более по сравнению с популяцией Т-клеток, активированных и размноженных в присутствии ингибитора PI3K.

J. Способы терапии

Предусмотренные настоящим изобретением генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки обеспечивают усовершенствованные способы адоптивной иммунотерапии для применения в лечении связанных с В-клетками состояний, которые включают, не ограничиваясь перечисленными, связанные с иммунорегуляцией состояния и гематологические злокачественные новообразования.

Согласно конкретным вариантам реализации специфичность первичной иммунной эффекторной клетки перенаправляют на В-клетки путем генетической модификации указанной первичной иммунной эффекторной клетки рецептором CAR, предусмотренным настоящим изобретением. Согласно различным вариантам реализации применяют вирусный вектор для генетической модификации иммунной эффекторной клетки конкретным полинуклеотидом, кодирующим CAR, содержащий антигенсвязывающий домен антитела мыши против BCMA, который связывается полипептидом BCMA; шарнирный домен; трансмембранный (TM) домен, короткий олигопептидный или полипептидный линкер, соединяющий TM-домен и внутриклеточный сигнальный домен CAR; один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов; и первичный сигнальный домен.

Согласно одному варианту реализации настоящим изобретением охвачен тип клеточной терапии, отличающийся тем, что Т-клетки генетически модифицированы для экспрессии CAR, нацеленного на экспрессирующие BCMA В-клетки. Согласно другому варианту реализации несущие CAR к BCMA Т-клетки культивируют в присутствии ИЛ-2 и ингибитора PI3K для улучшения терапевтических характеристик и повышения персистентности несущих CAR Т-клеток. Затем несущие CAR Т-клетки вливают нуждающемуся в этом реципиенту. Инфузированная клетка способна к киллингу вызывающих заболевание В-клеток в организме реципиента. В отличие от вариантов терапии антителами, при терапии несущими CAR Т-клетками они способны к репликации *in vivo*, обеспечивающей долгосрочную персистентность, которая может приводить к пролонгированным результатам при терапии рака.

Согласно одному варианту реализации предложенные в настоящем изобретении несущие CAR Т-клетки могут стабильно размножаться *in vivo* и персистировать на протяжении длительного периода времени. Согласно другому варианту реализации CAR Т-клетки согласно настоящему изобретению развиваются в специфические Т-клетки памяти, которые могут быть повторно активированы для ингибирования образования каких-либо дополнительных опухолей или какого-либо опухолевого роста.

Согласно конкретным вариантам реализации композиции с иммунными эффекторными клетками, содержащими предусмотренные настоящим изобретением CAR, используют при лечении состояний, связанных с аномальной В-клеточной активностью.

Иллюстративные примеры состояний, лечение, предотвращение или облегчение которых может осуществляться с применением иммунных эффекторных клеток, содержащих предусмотренные настоящим изобретением CAR, включают, не ограничиваясь перечисленными: системную красную волчанку, ревматоидный артрит, тяжелую миастению, аутоиммунную гемолитическую анемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, антифосфолипидный синдром, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, АНЦА-ассоциированный васкулит, синдром Гудпасчера, болезнь Кавасаки и быстропрогрессирующий гломерулонефрит.

Модифицированные иммунные эффекторные клетки могут также находить применение при расстройствах плазматических клеток, таких как болезнь тяжелых цепей, первичный или ассоциированный с иммуноцитами амилоидоз, и моноклональная гаммапатия неопределенного значения (MGUS).

В настоящем документе термин «В-клеточное злокачественное новообразование» относится к типу раковых заболеваний, образующихся из В-клеток (тип клеток иммунной системы) согласно описанию ниже.

Согласно конкретным вариантам реализации композиции, содержащие CAR-модифицированные Т-клетки, предусмотренные настоящим изобретением, применяют при лечении гематологических злокачественных новообразований, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, В-клеточных злокачественных новообразований, такие как, например, множественная миелома (ММ) и неходжкинская лимфома (НХЛ).

Множественная миелома представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование морфологически зрелых плазматических клеток, характеризующееся неопластической трансформацией одного клона клеток указанных типов. Указанные плазматические клетки пролиферируют в КМ и могут внедряться в соседние кости и иногда в кровь. Варианты форм множественной миеломы включают манифестную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, плазмоклеточный лейкоз, несекреторную миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, одиночную плазмоцитому кости и экстрамедуллярную плазмацитому (см., например,

Braunwald, *et al.* (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition (McGraw-Hill 2001)).

Неходжкинская лимфома включает большую группу раковых заболеваний лимфоцитов (лейкоцитов). Неходжкинские лимфомы могут возникать в любом возрасте и часто характеризуются увеличенными относительно нормы лимфатическими узлами, лихорадкой и потерей веса. Существует множество типов неходжкинской лимфомы. Например, неходжкинская лимфома может быть подразделена на агрессивные (быстрорастущие) и индолентные (медленнорастущие) типы. Хотя неходжкинские лимфомы могут происходить из В-клеток и Т-клеток, в настоящем документе термин «неходжкинская лимфома» и «В-клеточная неходжкинская лимфома» используются взаимозаменяемо. В-клеточные неходжкинские лимфомы (НХЛ) включают лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ/МЛЛ), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; и мантийноклеточную лимфому. Лимфомы, возникающие после трансплантации костного мозга или стволовых клеток, обычно представлены В-клеточными неходжкинскими лимфомами.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) представляет собой индолентное (развивающееся медленно) раковое заболевание, приводящее к медленному возрастанию числа незрелых лейкоцитов, называемых В-лимфоцитами, или В-клетками. Раковые клетки распространяются через кровь и костный мозг, и могут также поражать лимфатические узлы или другие органы, такие как печень и селезенка. ХЛЛ в результате вызывает недостаточность костного мозга. Иногда на поздних стадиях заболевания его называют мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой.

Согласно конкретным вариантам реализации предложены способы, включающие введение терапевтически эффективного количества экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, предусмотренных настоящим изобретением, или содержащей их композиции нуждающемуся в этом пациенту, отдельно или в комбинации с одним или большим числом терапевтических агентов. Согласно некоторым вариантам реализации клетки согласно настоящему изобретению используют в лечении пациентов, у которых имеется риск развития состояния, связанного с аномальной В-клеточной активностью, или В-клеточное злокачественное новообразование. Соответственно, в настоящем

изобретении предложены способы лечения или предотвращения состояния, связанного с аномальной В-клеточной активностью, или В-клеточного злокачественного новообразования, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных клеток, предусмотренных настоящим изобретением.

В настоящем документе термины «индивидуум» и «субъект» часто используются взаимозаменяемо и относятся к любому животному, у которого наблюдается симптом заболевания, расстройства или состояния, лечение которого может проводиться с применением генно-терапевтических векторов, терапевтических средств на основе клеток и способов, описанных где-либо в тексте настоящего документа. Согласно предпочтительным вариантам реализации субъект включает любое животное, у которого наблюдаются симптомы заболевания, расстройства или состояния гематопоэтической системы, например, В-клеточное злокачественное новообразование, лечение которого может проводиться с применением генно-терапевтических векторов, терапевтических средств на основе клеток и способов, описанных где-либо в тексте настоящего документа. Подходящие субъекты (*например,* пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или животных-компаньонов (таких как кошка или собака). Включены также пациенты-приматы, не являющиеся человеком, и, предпочтительно, пациенты-люди. Типичные субъекты включают пациентов-людей с В-клеточным злокачественным новообразованием, диагностированным В-клеточным злокачественным новообразованием, имеющих риск развития или страдающих В-клеточным злокачественным новообразованием.

В настоящем документе термин «пациент» относится к субъекту, у которого было диагностировано конкретное заболевание, расстройство или состояние, лечение которого может проводиться с применением генно-терапевтических векторов, терапевтических средств на основе клеток и способов, описанных где-либо в тексте настоящего документа.

В настоящем документе термины «лечение» или «лечить» включает любой благоприятный или требуемый эффект на симптомы или патологию заболевания или патологического состояния, и могут включать даже минимальное уменьшение уровня одного или более измеряемых маркеров заболевания или состояния, лечение которого

проводится. Лечение может необязательно задействовать либо уменьшение или облегчение симптомов заболевания или состояния, либо задержку прогрессирования заболевания или состояния. «Лечение» не обязательно указывает на полную ликвидацию или излечение заболевания или состояния, или связанных с ним симптомов.

В настоящем документе термин «предотвращать» и аналогичные термины, такие как «предотвращенный», «предотвращающий» *и т.п.*, относятся к способу предотвращения, ингибирования или уменьшения вероятности возникновения или рецидивирования заболевания или состояния. Он также относится к задержке начала или рецидива заболевания или состояния, или к задержке возникновения или рецидивирования симптомов заболевания или состояния. В настоящем документе термин «предотвращение» и аналогичные термины также включают снижение интенсивности, эффекта, симптомов и/или бремени заболевания или состояния до начала или рецидива указанного заболевания или состояния.

Под терминами «усиливать», «способствовать», «повышать» или «увеличивать» обычно подразумевают способность композиции, предусмотренной настоящим изобретением, например, генетически модифицированной Т-клетки или вектора, кодирующего CAR, обеспечивать, запускать или вызывать более выраженный физиологический ответ (*т. е.* зависимые эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо основой, либо контрольной молекулой/композицией. Измеряемый физиологический ответ, наряду с другими известными в данной области техники и описанными в настоящем документе ответами, может включать увеличение уровней размножения, активации, устойчивости и/или увеличение способности к киллингу раковых клеток Т-клетками. «Повышение» или «увеличение» количества, как правило, является «статистически значимым» и может включать 1,1-кратное, 1,2-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 30-кратное или большее (*например,* в 500, 1000 раз) (включая все целочисленные и децимальные точки от 1 и выше, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.п.) увеличение относительно ответа, обеспечиваемого основой или контрольной композицией.

Под терминами «уменьшать», «понижать», «снижать», «сокращать» или «ослаблять» обычно подразумевают способность композиции, предусмотренной настоящим

изобретением, обеспечивать, запускать или вызывать менее выраженный физиологический ответ (*т. е.* зависимые эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо основой, либо контрольной молекулой/композицией. «Уменьшение» или «понижение» количества, как правило, является «статистически значимым», и может включать 1,1-кратное, 1,2-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 30-кратное или большее (*например,* в 500, 1000 раз) (включая все целочисленные и децимальные точки от 1 и выше, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т.п.) уменьшение относительно ответа (референсного ответа), обеспечиваемого основой, контрольной композицией или конкретной линией клеток.

Термины «поддерживать», «сохранять», «сохранение», «отсутствие изменений», «отсутствие существенных изменений» или «отсутствие существенного уменьшения» обычно относятся к способности композиции, предусмотренной настоящим изобретением, обеспечивать, запускать или вызывать менее выраженный физиологический ответ (*т. е.* зависимые эффекты) в клетке по сравнению с ответом, вызываемым основой, контрольной молекулой/композицией, или ответом в конкретной линии клеток. Сопоставимым является эффект, который значимо или измеримо не отличается от референсного ответа.

Согласно одному варианту реализации способ лечения связанного с В-клетками состояния у нуждающегося в этом субъекта включает введение эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, предусмотренные настоящим изобретением. Объем и частоту введения определяют такие факторы, как состояние пациента, тип и тяжесть заболевания у указанного пациента, при этом подходящие дозировки могут быть определены в ходе клинических испытаний.

Согласно одному варианту реализации количество Т-клеток в композиции, которую вводят субъекту, составляет по меньшей мере $0,1 \times 10^5$ клеток, по меньшей мере $0,5 \times 10^5$ клеток, по меньшей мере 1×10^5 клеток, по меньшей мере 5×10^5 клеток, по меньшей мере 1×10^6 клеток, по меньшей мере $0,5 \times 10^7$ клеток, по меньшей мере 1×10^7 клеток, по меньшей мере $0,5 \times 10^8$ клеток, по меньшей мере 1×10^8 клеток, по меньшей мере $0,5 \times 10^9$ клеток, по меньшей мере 1×10^9 клеток, по меньшей мере $2 \times$

10^9 клеток, по меньшей мере 3×10^9 клеток, по меньшей мере 4×10^9 клеток, по меньшей мере 5×10^9 клеток, или по меньшей мере 1×10^{10} клеток. Согласно конкретным вариантам реализации субъекту вводят от приблизительно 1×10^7 CAR Т-клеток до приблизительно 1×10^9 CAR Т-клеток, от приблизительно 2×10^7 CAR Т-клеток до приблизительно $0,9 \times 10^9$ CAR Т-клеток, от приблизительно 3×10^7 CAR Т-клеток до приблизительно $0,8 \times 10^9$ CAR Т-клеток, от приблизительно 4×10^7 CAR Т-клеток до приблизительно $0,7 \times 10^9$ CAR Т-клеток, от приблизительно 5×10^7 CAR Т-клеток до приблизительно $0,6 \times 10^9$ CAR Т-клеток, или приблизительно 5×10^7 CAR Т-клеток до приблизительно $0,5 \times 10^9$ CAR Т-клеток.

Согласно одному варианту реализации количество Т-клеток в композиции, которую вводят субъекту, составляет по меньшей мере $0,1 \times 10^4$ клеток/кг массы тела, по меньшей мере $0,5 \times 10^4$ клеток/кг массы тела, по меньшей мере 1×10^4 клеток/кг массы тела, по меньшей мере 5×10^4 клеток/кг массы тела, по меньшей мере 1×10^5 клеток/кг массы тела, по меньшей мере $0,5 \times 10^6$ клеток/кг массы тела, по меньшей мере 1×10^6 клеток/кг массы тела, по меньшей мере $0,5 \times 10^7$ клеток/кг массы тела, по меньшей мере 1×10^7 клеток/кг массы тела, по меньшей мере $0,5 \times 10^8$ клеток/кг массы тела, по меньшей мере 1×10^8 клеток/кг массы тела, по меньшей мере 2×10^8 клеток/кг массы тела, по меньшей мере 3×10^8 клеток/кг массы тела, по меньшей мере 4×10^8 клеток/кг массы тела, по меньшей мере 5×10^8 клеток/кг массы тела, или по меньшей мере 1×10^9 клеток/кг массы тела. Согласно конкретным вариантам реализации субъекту вводят от приблизительно 1×10^6 CAR Т-клеток/кг массы тела до приблизительно 1×10^8 CAR Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно 2×10^6 CAR Т-клеток/кг массы тела до приблизительно $0,9 \times 10^8$ CAR Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно 3×10^6 CAR Т-клеток/кг массы тела до приблизительно $0,8 \times 10^8$ CAR Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно 4×10^6 CAR Т-клеток/кг массы тела до приблизительно $0,7 \times 10^8$ CAR Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно 5×10^6 CAR Т-клеток/кг массы тела до приблизительно $0,6 \times 10^8$ CAR Т-клеток/кг массы тела, или приблизительно 5×10^6 CAR Т-клеток/кг массы тела до приблизительно $0,5 \times 10^8$ CAR Т-клеток/кг массы тела.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что для обеспечения необходимой терапии может требоваться многократное введение композиций согласно настоящему изобретению. Например, композиция может вводиться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10 раз или более на протяжении 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5, лет, 10 лет или более.

Согласно некоторым вариантам реализации может быть желательно введение активированных иммунных эффекторных клеток субъекту с последующим повторным забором крови (или проведением афереза), активацией иммунных эффекторных клеток в собранной крови в соответствии с настоящим изобретением, и повторным вливанием пациенту указанных активированных и размноженных иммунных эффекторных клеток. Этот процесс может осуществляться неоднократно каждые несколько недель. Согласно некоторым вариантам реализации иммунные эффекторные клетки могут быть активированы в объеме взятой крови, составляющем от 10 $см^3$ до 400 $см^3$. Согласно некоторым вариантам реализации иммунные эффекторные клетки активируют в объеме взятой крови, составляющем 20 $см^3$, 30 $см^3$, 40 $см^3$, 50 $см^3$, 60 $см^3$, 70 $см^3$, 80 $см^3$, 90 $см^3$, 100 $см^3$, 150 $см^3$, 200 $см^3$, 250 $см^3$, 300 $см^3$, 350 $см^3$, или 400 $см^3$ или более. Без ограничения конкретной теорией, указанный протокол многократного взятия/обратного вливания крови может служить для устранения определенных популяций иммунных эффекторных клеток.

Введение предусмотренных настоящим изобретением композиций может проводиться любым удобным образом, в том числе путем вдыхания аэрозоля, инъекции, приема внутрь, переливания, имплантации или трансплантации. Согласно предпочтительному варианту реализации композиции вводят парентерально. Выражения «парентеральное введение» и «введенный парентерально» в настоящем документе относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно к введению путем инъекции, и включают, без ограничения, внутрисосудистые, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, интраорбитальные, внутриопухолевые, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, внутрикожные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные и интрастернальные инъекции и вливания. Согласно одному варианту реализации предусмотренные настоящим изобретением композиции вводят субъекту путем инъекции непосредственно в опухоль, лимфатический узел или участок, пораженный инфекцией.

Согласно одному варианту реализации нуждающемуся в этом субъекту вводят эффективное количество композиции для повышения клеточного иммунного ответа на

связанное с В-клетками состояние у указанного субъекта. Указанный иммунный ответ может включать клеточные иммунные реакции, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными к киллингу инфицированных клеток, и клеточные реакции, опосредованные регуляторными Т-клетками и хелперными Т-клетками. Могут также быть индуцированы гуморальные иммунные реакции, опосредованные в основном хелперными Т-клетками, способными к активации В-клеток, что, соответственно, приводит к продуцированию антител. Для анализа типов иммунных реакций, индуцируемых композициями согласно настоящему изобретению, могут применяться различные техники, подробные описания которых известны в данной области техники; см. *например,* руководство: *Current Protocols in Immunology*, ред.: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

При опосредованном Т-клетками киллинге связывание CAR с лигандом инициирует сигнал от CAR, поступающий в Т-клетку, что приводит к активации различных Т-клеточных сигнальных путей, индуцирующий синтез или высвобождение Т-клеткой белков, способных индуцировать апоптоз целевых клеток за счет различных механизмов. Указанные опосредованные Т-клетками механизмы включают (не ограничиваясь перечисленными) перенос внутриклеточных цитотоксических гранул из Т-клетки в целевую клетку, секреция Т-клетками провоспалительных цитокинов, которые могут прямо (или непрямо, за счет рекрутинга других киллерных эффекторных клеток), индуцировать киллинг целевых клеток, и повышающая регуляция лигандов рецепторов смерти (*например*, FasL) на поверхности Т-клеток, которые индуцируют апоптоз целевых клеток после связывания с когнатным рецептором смерти (*например*, Fas) на целевой клетке.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения субъекта, у которого было диагностировано связанное с В-клетками состояние, включающий извлечение иммунных эффекторных клеток из организма субъекта, у которого было диагностировано связанное с экспрессирующими BCMA В-клетками состояние, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток содержащим кодирующую CAR нуклеиновую кислоту вектором согласно настоящему изобретению, с получением таким образом популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение указанной популяции модифицированных иммунных

эффекторных клеток тому же субъекту. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении также предложены способы стимуляции опосредованного иммунными эффекторными клетками иммуномодуляторного ответа в отношении целевой клеточной популяции у субъекта, включающие этапы введения указанному субъекту популяции иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих содержащую нуклеиновую кислоту конструкцию, кодирующую молекулу CAR.

Способы введения содержащих клетки композиций, описанных в настоящем документе, включает любые способы, эффективные для обеспечения либо обратного введения генетически модифицированных *ex vivo* иммунных эффекторных клеток, которые непосредственно экспрессируют CAR согласно настоящему изобретению у субъекта, либо обратного введения генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие указанный CAR. Один способ включает трансдукцию периферических Т-клеток крови *ex vivo* содержащей нуклеиновую кислоту конструкцией согласно настоящему изобретению и обратное введение трансдуцированных клеток указанному субъекту.

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок в той же мере, как если бы конкретным индивидуальным образом было указано, что каждая индивидуальная публикация, патентная заявка или выданный патент включен(а) в настоящий документ посредством ссылки.

Хотя настоящее изобретение было достаточно подробно описано путем приведения иллюстративного материала и примеров для ясности понимания, для специалиста в данной области техники будет очевидно, в свете изложенных принципов настоящего изобретения, что определенные изменения и модификации могут быть внесены без отступления от существа или объема прилагаемой формулы изобретения. Приведенные ниже примеры служат исключительно для наглядности, а не для ограничения. Специалисты в данной области техники смогут легко определить различные

второстепенные показатели, которые могут быть изменены или модифицированы с получением по существу аналогичных результатов.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Конструирование рецепторов CAR к BCMA

Были сконструированы рецепторы CAR, содержащие scFv антител мыши против BCMA, содержащие MND-промотор, функционально связанный с scFv против BMCA, шарнир и трансмембранный домен из CD8α и костимулирующие домены CD137, за которыми расположен внутриклеточный сигнальный домен цепи CD3ζ. *См., например,* фиг. 1. Показанный на фиг. 1 CAR к BCMA содержит последовательность сигнального пептида (SP) CD8α для поверхностной экспрессии на иммунных эффекторных клетках. Последовательность полинуклеотидов для примера рецептора CAR к BCMA представлена в последовательности SEQ ID NO: 10; пример последовательности полипептидов рецептора CAR к BCMA представлен в последовательности SEQ ID NO: 9; векторная карта для примера конструкции рецептора CAR приведена на фиг. 1. В таблице 3 приведены характеристики, информация из Genbank, исходные названия и ссылки для различных нуклеотидных сегментов лентивирусного вектора, несущего CAR к BCMA.

Таблица 3

Нуклеотиды	**Характеристики**	**Информация в GenBank**	**Исходное название**	**Ссылка**
1–185	Остов плазмиды pUC19	Номер доступа L09137.2, нуклеотиды 1–185	pUC19	New England Biolabs
185–222	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо

Нуклеотиды	**Характеристики**	**Информация в GenBank**	**Исходное название**	**Ссылка**
223–800	ЦМВ	Не применимо	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801–1136	R, U5, PBS и пакующие последовательности	Номер доступа M19921.2, нуклеотиды 454–789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137–1139	Стартовый кодон Gag (ATG) заменен на стоп-кодон (TAG)	Не применимо	Синтетический	Не применимо
1140–1240	Последовательность gag ВИЧ-1	Номер доступа M19921.2, нуклеотиды 793– 893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241–1243	Последовательность gag ВИЧ-1 заменена на второй стоп-кодон	Не применимо	Синтетический	Не применимо
1244–1595	Последовательность gag ВИЧ-1	Номер доступа M19921.2, нуклеотиды 897–1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43

Нуклеотиды	**Характеристики**	**Информация в GenBank**	**Исходное название**	**Ссылка**
1596–1992	Pol cPPT/CTS ВИЧ-1	Номер доступа M19921.2, нуклеотиды 4745–5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993–2517	ВИЧ-1, выделенная область Env HXB3 (RRE)	Номер доступа M14100.1, нуклеотиды 1875–2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518–2693	Последовательности Env ВИЧ-1 S/A	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694–2708	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
2709–3096	MND	Не применимо	$p^{см3}$l-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755
3097–3124	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
3125–3187	Сигнальный пептид	Номер доступа NM_001768	Сигнальный пептид CD8a	Не применимо

Нуклеотиды	**Характеристики**	**Информация в GenBank**	**Исходное название**	**Ссылка**
3188–3934	scFv к BCMA02 (V_L1–линкер–V_H0)	Не применимо	Синтетический	Не применимо
3935–4141	Шарнир и TM CD8a	Номер доступа NM_001768	Шарнир и TM CD8a	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4144–4269	Сигнальный домен CD137 (4-1BB)	Номер доступа NM_001561	Сигнальный домен CD137	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4270–4606	Сигнальный домен CD3-	Номер доступа NM_000734	Сигнальный домен CD3-	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4607–4717	PPT и фрагмент 3' U3ВИЧ-1	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 9005– 9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4718–4834	Фрагмент U3 ВИЧ-1 (удаление 399 п.о.) и R	Номер доступа M19921.2, нуклеотиды 9511– 9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43

Нуклеотиды	Характеристики	Информация в GenBank	Исходное название	Ссылка
4835–4858	Синтетическая поли-A-последовательность	Не применимо	Синтетический	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4859–4877	Линкер	Не применимо	Синтетический	Не применимо
4878–7350	Остов pUC19	Номер доступа L09137.2, нуклеотиды 2636–2686	pUC19	New England Biolabs

ПРИМЕР 2

Оценка CAR к BCMA мыши

Введение

Адоптивный перенос генетически сконструированных Т-клеток, несущих химерные антигенные рецепторы (CAR), был разработан в качестве многообещающего подхода к лечению раковых заболеваний. CAR представляет собой искусственную молекулу, состоящую из реакционноспособного в отношении антигена одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), соединенного с Т-клеточными сигнальными доменами посредством трансмембранной области. В указанном примере оценивали молекулу CAR, специфическую в отношении антигена созревания В-клеток (BCMA). BCMA экспрессируется на клетках множественной миеломы, плазмацитомы и некоторых лимфом, хотя в норме экспрессия ограничена плазматическими клетками (Avery *et al.*, 2003; Carpenito *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2007).

CAR к BCMA02 конструировали с применением последовательностей антитела мыши против BCMA (C11D5.3). CAR к BCMA10 конструировали с применением модифицированных последовательностей; он представляет собой «гуманизированный» вариант CAR к BCMA02. В серии анализов *in vitro* и несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки демонстрировали опухолеспецифичность, высокие уровни экспрессии CAR, и обеспечивали высокую реактивность в отношении экспрессирующих антиген мишеней. Несущие CAR к BCMA02 Т-клетки и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки, как было показано, обладают сопоставимой реактивностью в отношении экспрессирующих BCMA линий опухолевых клеток. Хотя как несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, так и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки были способны обеспечивать регрессию в модели опухоли на мышах, несущие CAR к BCMA10 Т-клетки демонстрировали антиген-независимую секрецию воспалительных цитокинов, и, соответственно, потенциально могут обуславливать клиническую токсичность, связанную с высокими уровнями цитокинов.

Результаты

Высвобождение тонических воспалительных цитокинов из клеток, нацеленных против BCMA10, связанное с апоптозом

Белок BCMA детектируется в сыворотке пациентов, страдающих множественной миеломой (Sanchez *et al.*, 2012). Средний уровень BCMA в сыворотке у пациентов, страдающих множественной миеломой, составлял 10 нг/мл, но пиковые значения достигали уровней до 100 нг/мл. оценивали влияние физиологических уровней растворимого BCMA на кандидатные несущие CAR против BCMA Т-клетки.

Высвобождение ИФН-γ несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, несущими CAR к BCMA10 Т-клетками и несущими CAR19Δ Т-клетками исследовали после 24-часового культивирования с растворимым BCMA (фиг. 2а). Несущие CAR против BCMA02 Т-клетки отвечали минимальным высвобождением цитокинов после 24 часов культивирования с BCMA в концентрациях, составляющих до 1 мкг/мл. И напротив, несущие CAR к BCMA10 Т-клетки отвечали высвобождением возрастающих уровней ИФН-γ, пропорциональных концентрации растворимого BCMA, добавленного в культуру. При концентрации 100 нг/мл BCMA максимальные зарегистрированные уровни у пациентов с множественной миеломой, секретируемые несущими CAR к

BCMA10 Т-клетками, составляли 82,1 нг/мл ИФН-γ, относительно секреции 28,8 нг/мл ИФН-γ несущими CAR к BCMA02 Т-клетками. ИФН-γ был детектирован даже в нескольких экспериментах по совместному культивированию несущих CAR к BCMA10 Т-клеток с клетками контрольных линий, не несущих антиген BCMA (фиг. 2b, совместное культивирование с K562). Указанные данные свидетельствуют о том, что несущие CAR к BCMA10 Т-клетки отличаются повышенной чувствительностью к стимуляции растворимым BCMA и демонстрируют потенциал к антиген-независимому Т-клеточному цитокиновому ответу.

Исследовали потенциальную секрецию тонических цитокинов несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, несущими CAR к BCMA10 Т-клетками (через 10 дней после начала культивирования) и несущими CAR19Δ Т-клетками. После получения несущих CAR Т-клеток проводили анализ ростовых сред, где были культивированы несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, несущие CAR к BCMA10Т-клетки и несущие CAR19Δ Т-клетки, на присутствие воспалительных цитокинов. Несмотря на отсутствие антигенной стимуляции, культуры несущих CAR к BCMA10 Т-клеток содержали более чем 10 нг/мл ИФН-γ, тогда как культуры несущих CAR к BCMA02 Т-клеток содержали менее чем 1 нг/мл ИФН-γ (фиг. 3). Культуры несущих CAR к BCMA10 Т-клеток также содержали значимо ($p<0,001$) большее количество ФНО-α. Для дополнительного количественного определения количества цитокинов, продуцируемых несущими CAR к BCMA10 Т-клетками без антигенной стимуляции, измеряли высвобождение цитокинов из 5×10^4 несущих CAR Т-клеток в течение 24 часов культивирования. Несущие CAR к BCMA10 Т-клетки продуцировали значимо бóльшие количества воспалительных цитокинов MIP1α, ИФН-γ, GMCSF, MIP1β, ИЛ-8 и ФНО-α по сравнению с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками (фиг. 4, $p < 0,0001$). Из всех исследованных цитокинов максимальные концентрации наблюдались для MIP1α и ИФН-γ. Несущие CAR к BCMA10 Т-клетки продуцировали 4,7 нг MIP1α/5×10^4 клеток/24 часа, 3,0 нг ИФН-γ/5×10^4 клеток/24 часа и ~1 нг/5×10^4 клеток/24 часа, или меньшие количества других цитокинов. Значимых различий в концентрации противовоспалительных цитокинов ИЛ-10, ИЛ-2 и ИЛ-4 детектировано не было.

В конце процесса образования несущих CAR к BCMA10 Т-клеток измеряли экспрессию фенотипических маркеров активации Т-клеток, чтобы установить, указывает ли секреция тонических воспалительных цитокинов на статус

гиперактивности в несущих CAR к BCMA10 Т-клетках. HLA-DR и CD25 представляют собой поверхностные маркеры, пиковые уровни экспрессии которые наблюдаются обычно через 12–24 часов после активации Т-клеток, а затем постепенно уменьшаются. На несущих CAR Т-клетках, полученных из клеток трех здоровых доноров, было продемонстрировано, что в среднем HLA-DR экспрессировали 40±2% несущих CAR к BCMA02 Т-клеток. Уровень экспрессии HLA-DR в указанных клетках был сопоставим с уровнем в нетрансдуцированных (43±2,3%) Т-клетках и CAR19Δ (32±2,2%) контрольных Т-клетках. И напротив, HLA-DR экспрессировали 88±1,2% несущих CAR к BCMA10 Т-клеток (фиг. 5). Экспрессия другого маркера активация CD25 также была выше на несущих CAR к BCMA10 Т-клетках по сравнению с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками (53±0,9% относительно 35±2,4%). Таким образом, несущие CAR к BCMA10 Т-клетки демонстрировали фенотипические характеристики активированных Т-клеток в отсутствие добавленных антигенов.

Гиперактивность Т-клеток часто связана с индуцированной активацией клеточной смертью («activation induced cell death», AICD) в результате апоптоза. Для определения того, может ли гиперактивность несущих CAR к BCMA10 Т-клеток приводить к более высоким уровням апоптоза по сравнению с наблюдаемыми для несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, измеряли уровни активированной каспазы-3. Активную каспазу-3 содержали 48% несущих CAR к BCMA10 Т-клеток от двух доноров, относительно 16% несущих CAR к BCMA02 Т-клеток (фиг. 6). Соответственно, в отсутствие добавленного антигена BCMA, культуры несущих CAR к BCMA10 Т-клеток содержат больше апоптотических клеток, что связано с повышенной активацией и секрецией воспалительных цитокинов по сравнению с несущими CAR к BCMA02 Т-клетки.

Несущие CAR к BCMA02 Т-клетки и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки оценивали на способность несущих CAR Т-клеток избирательно отвечать на низкие уровни BCMA или проявлять перекрестную реактивность в отношении неродственного антигена в сыворотке человека, используемой для культивирования Т-клеток. Как несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, так и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки поддерживали на среде без содержания сыворотки человека в течение двух дней, а затем переносили в среду, содержащую фетальную бычью сыворотку (ФБС), сыворотку человека (HABS) или HABS с добавлением или без добавления 100нг/мл растворимого BCMA (фиг. 7). Высвобождение ИФН-γ анализировали 24 часа спустя с применением ИФА ELISA. Как

несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, так и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки отвечали на растворимый BCMA. Однако несущие CAR к BCMA10 Т-клетки секретировали в 10 раз большее количество ИФН-γ, чем несущие CAR к BCMA02 Т-клетки. В отсутствие BCMA только несущие CAR к BCMA10 Т-клетки высвобождали ИФН-γ независимо от культивирования с фетальной бычьей сывороткой (ФБС)($p = 0,0002$) или сывороткой человека с АВ-антигенами (HABS) ($p = 0,0007$). Указанные данные свидетельствуют о том, что секреция воспалительных цитокинов была характерна для несущих CAR к BCMA10 Т-клеток.

Менее выраженная противоопухолевая функция несущих CAR к BCMA10 Т-клеток в модели множественной миеломы на мышах

Гиперактивация и повышенный апоптоз могут негативно влиять на персистентность несущих CAR Т-клеток у пациентов и, в конечном итоге, на клиническую эффективность. Противоопухолевую функцию несущих CAR к BCMA02 Т-клеток и несущих CAR к BCMA10 Т-клеток исследовали в модели опухоли на мышах. Мыши NOD *scid* гамма (NSG) с экспериментальными подкожными опухолями множественной миеломы (RPMI-8226) человека размером ~100 $мм^3$ получали лечение 10^7 несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, 10^7 несущих CAR к BCMA10 Т-клеток или бортезомибом (велкейдом). Рост RPMI-8226 отслеживали с использованием калипера. В двух независимых экспериментах (фиг. 8a и 8b), бортезомиб контролировал рост опухоли по сравнению с получавшими контрольную основу животными. У животных, в организм которых были адоптивно перенесены несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, наблюдалась быстрая пролонгированная элиминация опухоли (на графиках-вкладках представлены масштабированные данные для ранней регрессии опухолей). Адоптивный перенос несущих CAR к BCMA10 Т-клеток также обеспечивал регрессию опухолей, но с задержкой в обоих экспериментах по сравнению с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками.

Выводы

Несущие CAR к BCMA02 Т-клетки и несущие CAR к BCMA10 Т-клетки демонстрировали сопоставимые противоопухолевые функции в анализах in vitro, однако несущие CAR к BCMA10 Т-клетки отличались характеристиками, которые могут негативно сказываться на безопасности и эффективности при лечении пациента.

Несущие CAR к BCMA10 Т-клетки отвечали выраженной секрецией воспалительных цитокинов на воздействие физиологических уровней белка BCMA. Цитокиновый шторм или синдром высвобождения цитокинов является известной причиной клинической токсичности при применении вариантов терапии, связанных с несущими CAR Т-клетками. Дополнительную озабоченность относительно высвобождения цитокинов в ответ на BCMA вызвала наблюдавшаяся тоническая активность несущих CAR к BCMA10 Т-клеток. Даже в отсутствие антигенной стимуляции несущие CAR к BCMA10 Т-клетки высвобождали высокие уровни воспалительных цитокинов. Устойчивая секреция цитокинов потенциально может обуславливать существенную клиническую токсичность, а также негативно отражаться на противоопухолевой функции. Так, авторы изобретения наблюдали большее содержание апоптотических клеток и менее выраженную противоопухолевую функцию в культурах несущих CAR к BCMA10 Т-клеток по сравнению с культурами несущих CAR к BCMA02 Т-клеток в модели множественной миеломы на мышах.

Список опубликованных источников

Avery *et al.*, (2003). *BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. J Clin Invest*, 112(2), 286-297.

Carpenito *et al.*, (2009). *Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9), 3360-3365.

Chiu *et al.*, (2007). *Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. Blood*, 109(2), 729-739.

Sanchez *et al.* (2012). *Serum B-cell maturation antigen is elevated in multiple myeloma and correlates with disease status and survival. Br J Haematol*, 158(6), 727-738..

ПРИМЕР 3

Минимальная экспрессия BCMA при лимфомах активирует несущие CAR против BCMA Т-клетки

Уровень экспрессии BCMA в клетках линий лимфомы и лейкоза (Daudi и Raji) измеряли для определения того, является ли экспрессия достаточной для активации несущих CAR к BCMA02 Т-клеток.

Экспрессию BCMA на клетках лимфомы, лейкоза и множественной миеломы количественно определяли с применением проточной цитометрии. В указанном анализе относительную экспрессию BCMA на клетках оценивали путем соотнесения интенсивности флуоресценции экспрессированного BCMA с известным количеством связанных антител (связывающей способностью антитела, ABC). Уровни экспрессии BCMA в линиях клеток лимфомы сравнивали с уровнями экспрессии BCMA в линии клеток множественной миеломы (RPMI-8226), как известно, активирующих несущие CAR к BCMA02 Т-клетки. Клетки RPMI-8226 экспрессировали на поверхности 12590±1275 молекул BCMA02. При этом клетки Daudi экспрессировали 1173±234 молекул BCMA02, а клетки JeKo-1 (линия клеток мантийноклеточной лимфомы) экспрессировали всего 222±138 молекул BCMA02 (фиг. 9, кружки).

В другой серии экспериментов тестировали активность несущих CAR к BCMA02 Т-клеток при незначительных уровнях BCMA, наблюдаемых на клетках линий лимфомы и лейкоза (фиг. 9, квадраты). Несущие CAR против BCMA02 Т-клетки получали с применением стандартных способов; активность оценивали с применением ИФА-анализа ELISA на ИФН-γ после совместного культивирования с BCMA-положительными и BCMA-отрицательными линиями опухолевых клеток. Реактивность несущих CAR к BCMA02 Т-клеток соотносили с относительным уровнем экспрессии мРНК BCMA (выше порогового) и/или плотностью рецептора BCMA на поверхности различных линий опухолевых клеток после совместного культивирования (фиг. 9). При совместном культивировании несущих CAR к BCMA Т-клеток и BCMA-отрицательных (BCMA-) линий опухолевых клеток: миелогенного лейкоза (K562), острого лимфобластного лейкоза (NALM-6 и NALM-16); мантийноклеточной лимфомы (REC-1); или ходжкинской лимфомы (HDLM-2), высвобождается малое количество или вообще не высвобождается ИФН-γ. И напротив, при совместном культивировании

несущих BCMA02 CAR Т-клеток с клетками BCMA-положительных (BCMA+) линий опухолевых клеток: В-клеточного хронического лимфобластного лейкоза (MEC-1), мантийноклеточной лимфомы (JeKo-1), ходжкинской лимфомы (RPMI-6666), лимфомы Беркитта (клетки Daudi и клетки Ramos) и множественной миеломы (RPMI-8226), высвобождались существенные количества ИФН-γ.

Исследования реактивности несущих CAR к BCMA02 Т-клеток в отношении экспрессирующих BCMA клеток лимфомы Беркитта (клеток Daudi) продолжали на животных *in vivo*. Клетки Daudi также экспрессируют CD19. Активность *in vivo* несущих CAR к BCMA02 Т-клеток сравнивали с активностью *in vivo* несущих CAR к CD19 Т-клеток. Мышам NOD *scid* гамма (NSG) инъецировали в/в 2×10^6 клеток Daudi и позволяли сформироваться значительной системной опухолевой нагрузке до лечения несущими CAR Т-клетками. Несущие CAR Т-клетки вводили через 8 дней и 18 дней после индукции опухолей (фиг. 10A и 10B, соответственно). Основа и отрицательный контроль (несущие CAR к CD19Δ Т-клетки) не предотвращали рост опухолей, что видно по удлинению логарифмической фазы биолюминесценции, в результате наблюдались снижение массы тела и смерть (фиг. 10A, две левые панели со снимками мышей). Антитела против CD19 и несущие CAR к BCMA02 Т-клетки предотвращали рост опухолей, обеспечивая сохранение массы тела и выживание. Антитела против CD19 и несущие CAR к BCMA02 Т-клетки были одинаково эффективны при введении на 8 день (фиг. 10A, две правые панели со снимками мышей). Несущие CAR против BCMA02 Т-клетки также эффективно уменьшали опухолевую нагрузку при введении через 18 дней после индукции опухолей. Фиг. 10B, правая панель.

ПРИМЕР 4

Высокая активность in vitro несущих CAR против BCMA Т-клеток

Выраженная активность *in vitro* несущих CAR к BCMA02 Т-клеток достигалась при 50% снижении экспрессии CAR к BCMA02. Популяции Т-клеток трансдуцировали 4×10^8 – 5×10^7 трансдуцирующих единиц лентивируса, кодирующего молекулу CAR против BCM02A. Итоговые популяции Т-клеток демонстрировали пониженное содержание несущих CAR к BCMA02 Т-клеток (% определяемых как положительные клеток) и пониженную экспрессию молекул CAR к BCMA02 (определяемую по средней интенсивности флуоресценции: MFI).

Определяли влияние снижения экспрессии молекулы CAR на активность в отношении BCMA02. Содержание положительных по CAR против BCMA Т-клеток нормировали по нетрансдуцированным Т-клеткам для обеспечения содержания 26 ± 4% способных реагировать на BCMA Т-клеток (фиг. 11A). Показатель MFI для нормированных несущих CAR к BCMA02 Т-клеток варьировал от 885 до 1875 (фиг. 11B). K562 представляет собой линию клеток CML, у которых отсутствует экспрессия BCMA. Конструировали экспрессирующие BCMA клетки K562 и использовали их в цитолитическом анализе *in vitro* для оценки активности несущих CAR к BCMA02 Т-клеток с варьирующими уровнями экспрессии CAR к BCMA (фиг. 11C). Клетки K562 метили реагентом Cell Trace Violet; клетки K562, стабильно экспрессирующие BCMA (K562-BCMA), метили CFSE. Т-клетки, клетки K562 и клетки K562-BCMA собирали, промывали и ресуспендировали в среде без содержания экзогенных цитокинов. Клетки культивировали в соотношении эффекторных клеток (E; Т-клетка) к целевым клеткам (T; смесь 1:1 клеток K562 и K562 BCMA), составляющем 20:1 или 10:1, в инкубаторе течение 4 часов при 37 ºC и 5% CO_2. Затем клетки окрашивали красителем Live/Dead и анализировали с помощью FACS. Цитотоксичность определяли на основании различий относительного содержания клеток K562 и K562-BCMA, нормированного по состояниям отсутствия Т-клеток.

ПРИМЕР 5

Процесс получения несущих CAR против BCMA Т-клеток

Для лечения каждого пациента получают уникальные продукты с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками. Надежность процесса получения продуктов с несущими CAR к BCMA02 Т-клеток оценивали путем получения несущих CAR к BCMA02 Т-клеток от 11 индивидуальных здоровых доноров МКПК. Размножение несущих CAR против BCMA02 Т-клеток от каждого донора соотносили с показателями соответствующей нетрансдуцированной параллельной культуры (фиг. 12A).

В конце периода культивации (10-й день) эффективность трансдукции Т-клетка оценивали путем количественного определения числа интегрированных лентивирусов с помощью кПЦР и набора специфических лентивирусных праймеров (число копий вектора, VCN). Культуры несущие CAR против BCMA02 Т-клеток от 11 доноров демонстрировали сопоставимую эффективность лентивирусной трансдукции (фиг.

12B). Содержание положительных по CAR к BCMA02 Т-клеток измеряли с помощью проточной цитометрии; была обнаружена сопоставимая экспрессия BCMA для всех доноров (фиг. 12C).

Активность каждого продукта с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками оценивали по высвобождению ИФН-γ после совместного культивирования с клетками K562, сконструированными для экспрессии BCMA. Все продукты с несущими CAR против BCMA02 Т-клетками демонстрировали терапевтически релевантные уровни высвобождения ИФН-γ при контакте с BCMA-экспрессирующими клетками K562 (фиг. 12D).

ПРИМЕР 6

Экспрессия CD62L, CD127, CD197 и CD38 на несущих CAR Т-клетках, обработанных ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474

Несущие CAR Т-клетки, культивированные с ИЛ-2 и ZSTK474, демонстрируют повышенные уровни экспрессии CD62L по сравнению с несущими CAR Т-клетками, культивированными только с ИЛ-2. Экспрессионный анализ 29 дополнительных маркеров клеточной поверхности на несущих CAR к BCMA02 Т-клетках, культивированных с ИЛ-2 и ZSTK474, выполняли с применением многопараметрической масс-цитометрии (CyTOF) и сравнивали результаты с несущими CAR Т-клетками, культивированными только с ИЛ-2. Для трех дополнительных маркеров (CD127, CD197 и CD38) наблюдалось повышение экспрессии в обработанных ИЛ-2 + ZSTK474 несущих CAR Т-клетках по сравнению с несущими CAR Т-клетками, обработанными только ИЛ-2. Соответственно, коэкспрессию CD62L, CD127, CD197 и CD38 дополнительно стратифицировали для культивированных с ZSTK474 несущих CAR Т-клеток. После культивирования в среде, содержащей ИЛ-2, 7,44% несущих CAR к BCMA02 Т-клеток коэкспрессировали CD127, CD197 и CD38, по сравнению с 24,5% несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, культивированных с ИЛ-2 и ZSTK474. Диаграмма Венна на фиг. 13 иллюстрирует коэкспрессию CD127, CD197 и CD38 в положительных по CD62L направленных против BCMA02 Т-клетках.

ПРИМЕР 7

Обработка ZSTK474 повышает содержание CD8 Т-клеток

Экспрессию CD8 количественно определяли в несущих CAR к BCMA02 Т-клетках, обработанных только ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474. Экспрессию CD8 определяли с применением флуоресцентно-меченого антитела против CD8 и проточной цитометрии. Несущие CAR против BCMA02 Т-клетки от семи здоровых доноров, культивированные с ИЛ-2 и ZSTK474, демонстрировали значимо более высокие уровни экспрессии CD8 по сравнению с несущими CAR к BCMA02 Т-клетками, культивированными только с ИЛ-2. Фиг. 14.

ПРИМЕР 8

Отсутствие антиген-независимой активности у Т-клеток обработанных ZSTK474 несущих CAR против BCMA

Тоническая активность несущих CAR Т-клеток в отсутствие антигена была связана с пониженной биологической активностью. Тоническую активность несущих CAR к BCMA02 Т-клеток оценивали путем количественного определения высвобождения интерферона-γ (ИФН-γ) в отсутствие антигена после культивирования в присутствии ИЛ-2 и ZSTK474 и сравнивали с полученными в стандартных условиях культивирования только с ИЛ-2. Культуры несущих CAR против BCMA Т-клеток получали с применением системы, прямо масштабируемой до крупносерийных клинических производственных процессов. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) культивировали в стационарных колбах в среде, содержащей ИЛ-2 (CellGenix) и антитела, специфические в отношении CD3 и CD28 (Miltenyi Biotec). Через день после начала культивирования добавляли 2×10^8 трансдуцирующих единиц лентивируса, кодирующего рецепторы CAR против BCMA.

Несущие CAR против BCMA02 Т-клетки поддерживали в фазе логарифмического роста путем добавления свежей среды, содержащей ИЛ-2 и оптимизированную дозу ZSTK474, на протяжении в общей сложности 10 дней культивирования. В конце процесса получения эквивалентное количество несущих CAR к BCMA02 Т-клеток повторно культивировали в течение 24 часов в среде без добавок. Количество ИФН-γ, высвобождаемое за 24 часа, количественно определяли с применением ИФА ELISA. В

указанном анализе уровни ИФН-γ ниже 200 пг/мл соответствуют отсутствию тонической активности. На фиг. 15 показано, что количество ИФН-γ, высвобождаемое несущими CAR к BCMA02 Т-клетками от 14 доноров, согласуется с отсутствием тонической активности вне зависимости от того, проводилось ли культивирование несущих CAR Т-клеток с ZSTK474.

ПРИМЕР 9

Обработанные ZSTK474 несущие CAR против BCMA02 Т-клетки демонстрируют терапевтическую активность в модели опухоли лимфомы

Опухоли Daudi использовали для изучения противоопухолевой активности несущих CAR к BCMA02 Т-клеток, культивированных с ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474. Клетки Daudi экспрессируют низкие уровни белка BCMA и обеспечивают получение модели агрессивных трудно поддающихся лечению опухолей лимфомы.

2×10^6 опухолевых клеток Daudi метили геном люциферазы светлячков и вводили нокаутным по гамма-цепи рецептора ИЛ-2 мышам NOD scid (NSG) путем внутривенной инъекции. После формирования опухолей несущим опухоли мышам вводили 1×10^7 несущих CAR Т-клеток. Мышам вводили i) несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, в течение 10 дней обработанные ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474; или ii) содержащие усеченный дефектный по сигнализации CAR против BCMA02 (tBCMA02) Т-клетки, в течение 10 дней обработанные ИЛ-2 и ZSTK474. Рост опухоли отслеживали с использованием биолюминесценции с применением системы визуализации Xenogen-IVIS.

Полная регрессия опухолей наблюдалась у 50% мышей, которым вводили несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, обработанные ИЛ-2 и ZSTK474. Фиг. 16.

ПРИМЕР 10

Обработанные ZSTK474 несущие CAR Т Клетки демонстрируют терапевтическую активность в модели миеломы человека на мышах

Животным с подкожными опухолями множественной миеломы (RPMI-8226) размером 100 $мм^3$ вливали эквивалентные дозы несущих CAR Т-клеток (1×10^6 положительных по CAR к BCMA02 Т-клеток) или немодифицированных (нетрансдуцированных) Т-клеток

от соответствующего донора Т-клеток. Несущие CAR против BCMA Т-клетки были обработаны ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474 согласно описанию в примере 8.

У животных, получавших культивированные с ИЛ-2, или ИЛ-2 и ZSTK474 несущие CAR к BCMA02 Т-клетки, наблюдалось полное предотвращение разрастания опухолей. Фиг. 17. И напротив, у животных получавших лечение нетрансдуцированными клетками или основой, наблюдалась неспособность к контролю роста опухолей. Фиг 17.

В целом, используемые в прилагаемой формуле изобретения термины не должны пониматься как ограничивающие объем изобретения специфическими вариантами реализации, раскрытыми в описании и пунктах формулы изобретения; напротив, они включают все возможные варианты реализации, а также все эквиваленты таких вариантов, входящие в объем соответствующих пунктов формулы изобретения. Таким образом, формула настоящего изобретения не ограничена приведенным описанием изобретения.

Формула изобретения

1. Способ лечения субъекта, у которого имеется гематологическое злокачественное новообразование, включающий введение иммунных эффекторных клеток, содержащих вирусный вектор, который экспрессирует химерный антигенный рецептор (CAR) к антигену созревания В-клеток (BCMA), где CAR состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9.

2. Способ по п. 1, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из множественной миеломы и неходжкинской лимфомы.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

5. Способ по любому из пп. 1-3, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому, выбранную из группы, состоящей из манифестной множественной миеломы, вялотекущей множественной миеломы, плазмоклеточного лейкоза, несекреторной миеломы, IgD-миеломы, остеосклеротической миеломы, одиночной плазмоцитомы кости и экстрамедуллярной плазмоцитомы.

6. Способ по любому из пп. 1-3, где гематологическое злокачественное новообразование представляет собой неходжкинскую лимфому, выбранную из группы, состоящей из лимфомы Беркитта, хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (ХЛЛ/МЛЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, иммунобластной крупноклеточной лимфомы, лимфобластной лимфомы из В-клеток-предшественников и лимфомы из клеток мантийной зоны.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где вектор представляет собой вектор экспрессии, эписомный вектор, вирусный вектор, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

8. Способ по п. 7, где лентивирусный вектор выбран из группы, по существу состоящей из вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1); вируса иммунодефицита человека 2 (ВИЧ-2); вируса висна-маэди (ВМВ); вируса артрита-энцефалита коз (АЭК); вируса инфекционной анемии лошадей (ИНАН); вируса иммунодефицита кошачьих (ВИК); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (ВИКРС) и вируса иммунодефицита обезьян (ВИО).

9. Способ по п. 7 или п. 8, где лентивирусный вектор содержит левый (5') ретровирусный LTR, сигнал упаковки Psi (Ψ), центральный полипуриновый тракт/ДНК-флэп (cPPT/FLAP), ретровирусный экспортный элемент, промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим CAR; и правый (3') ретровирусный LTR.

10. Способ по п. 9, где полинуклеотид, кодирующий CAR, содержит последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10.

11. Способ по п. 9, дополнительно предусматривающий гетерологичную последовательность полиаденилирования.

12. Способ по п. 11, где последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста или сигнальную последовательность полиаденилирования β-глобина кролика.

13. Способ по любому из пп. 9-12, где промотор из 5' LTR заменен гетерологичным промотором.

14. Способ по п. 13, где гетерологичный промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV) или промотор вируса обезьян 40 (SV40).

15. Способ по любому из пп. 9-14, где 5' LTR или 3' LTR представляют собой лентивирусный LTR.

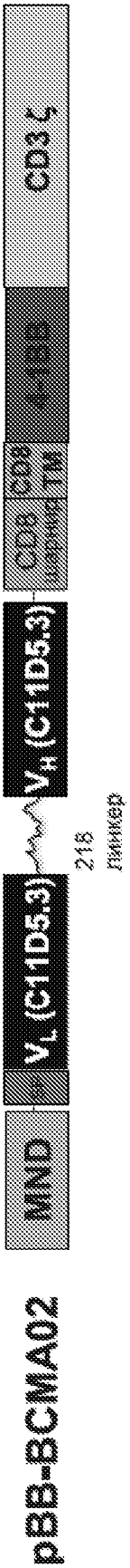
16. Способ по любому из пп. 9-15, где 3' LTR представляет собой самоинактивирующийся (SIN) LTR.

17. Способ по любому из пп. 9-16, где промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим CAR, выбран из группы, состоящей из промотора немедленно-раннего гена цитомегаловируса (CMV), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1-α), промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотора убиквитина-C (UBQ-C), составного промотора энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина курицы (CAG), составного промотора энхансер вируса полиомы/промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса (MC1), промотора бета-актина (β-ACT), промотора вируса обезьян 40 (SV40) и промотора, содержащего энхансер вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленной областью отрицательного контроля, с сайтом связывания праймера, замененным на последовательность из dl587rev (MND).

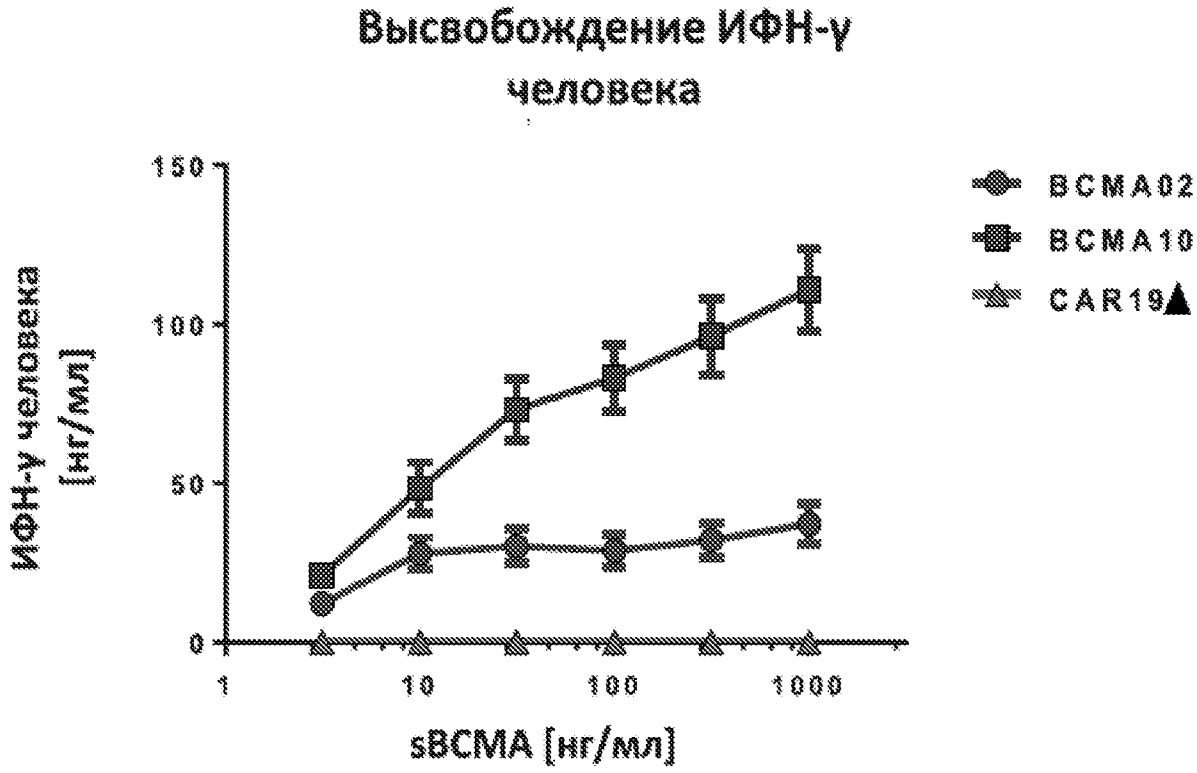
18. Способ по любому из пп. 1-17, где клетки вводят субъекту парентерально.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где клетки вводят субъекту интраваскулярно.

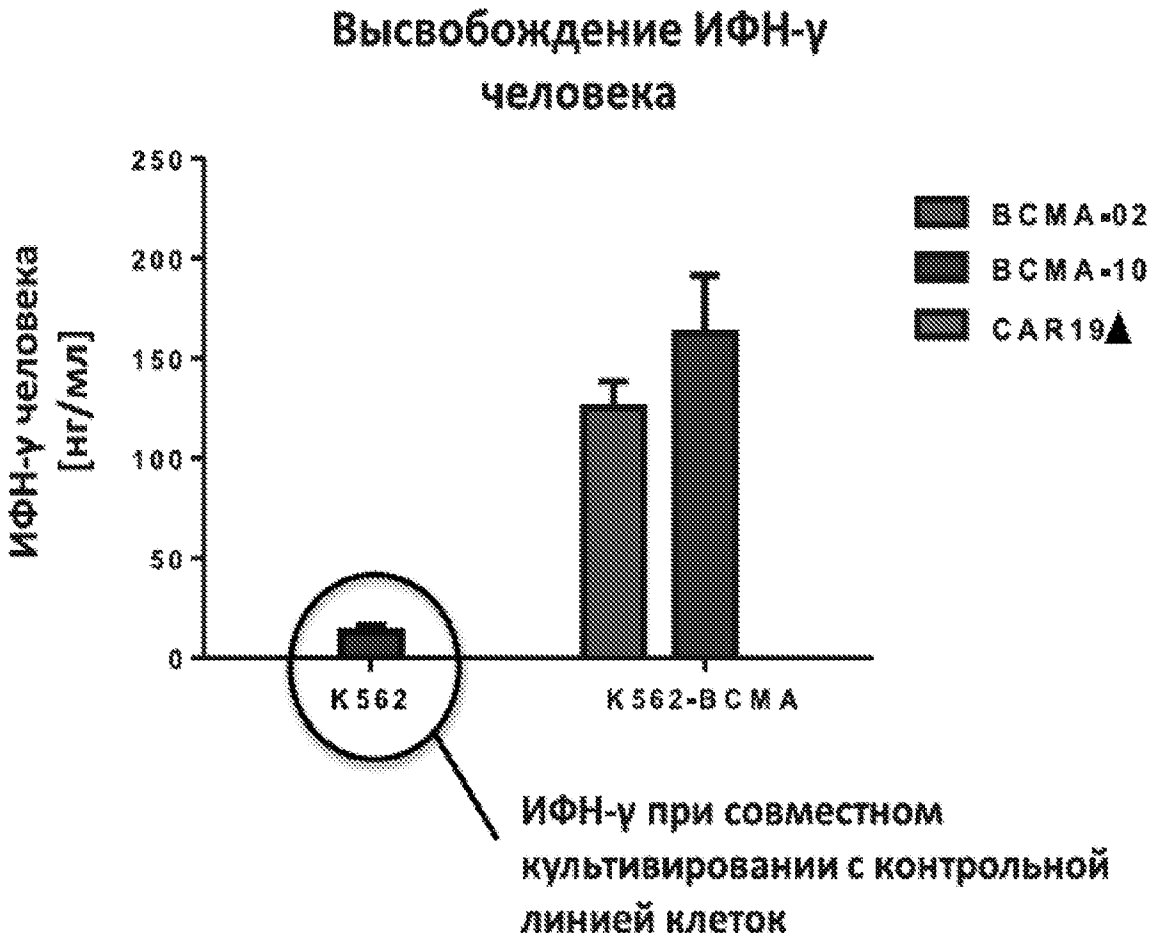
20. Способ по любому из пп. 1-19, где клетки вводят субъекту внутривенно.


pBB-BCMA02
MND
VL (C11D5.3)
218
линкер
VH (C11D5.3)
CD8 шарнир
CD8 ТМ
4-1BB
CD3ζ

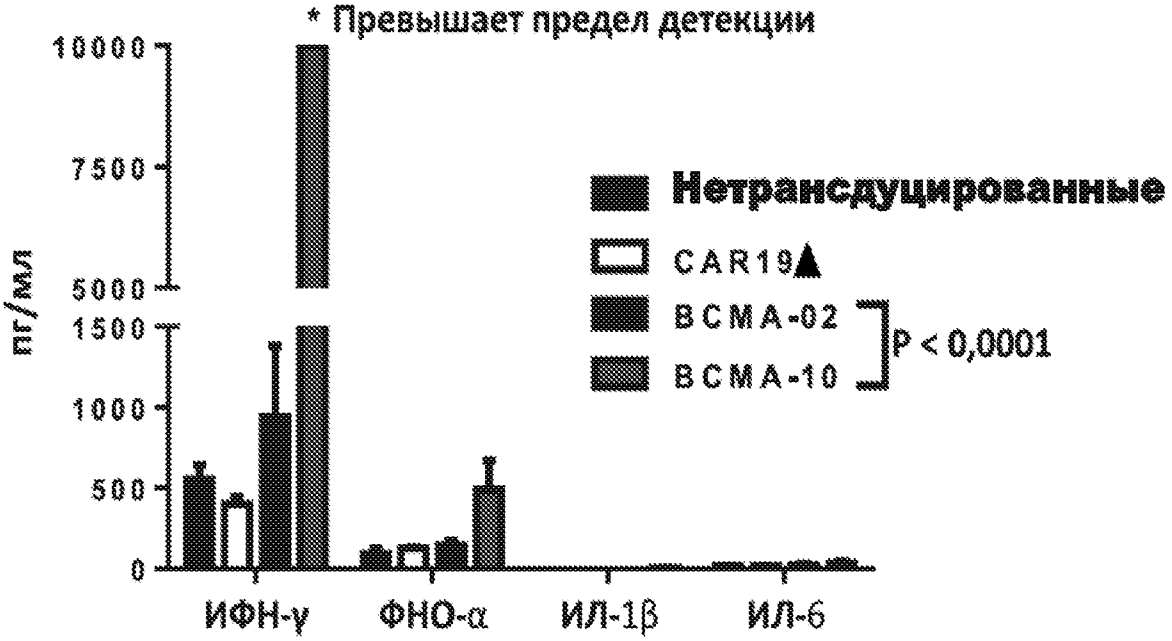
ФИГ.1


Высвобождение ИФН-γ человека
ИФН-γ человека [нг/мл]
150
100
50
0
1
10
100
1000
sBCMA [нг/мл]
BCMA02
BCMA10
CAR19▲

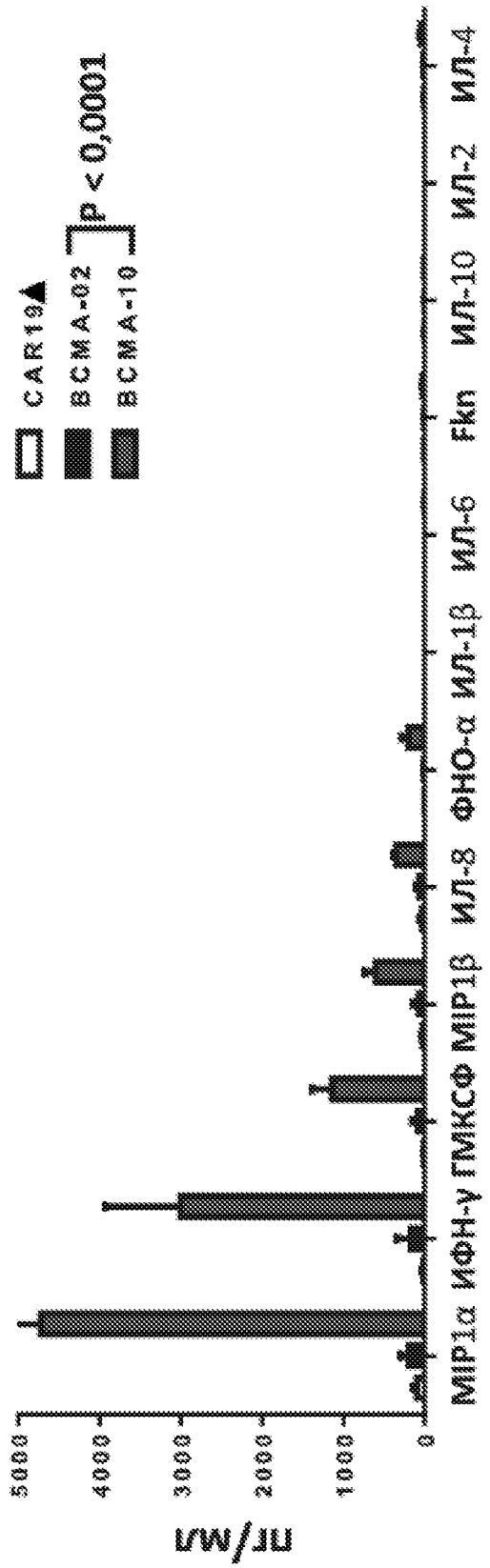
ФИГ. 2А


Высвобождение ИФН-γ человека
ИФН-γ человека [нг/мл]
250
200
150
100
50
0
K562
K562-BCMA
BCMA-02
BCMA-10
CAR19▲
ИФН-γ при совместном культивировании с контрольной линией клеток

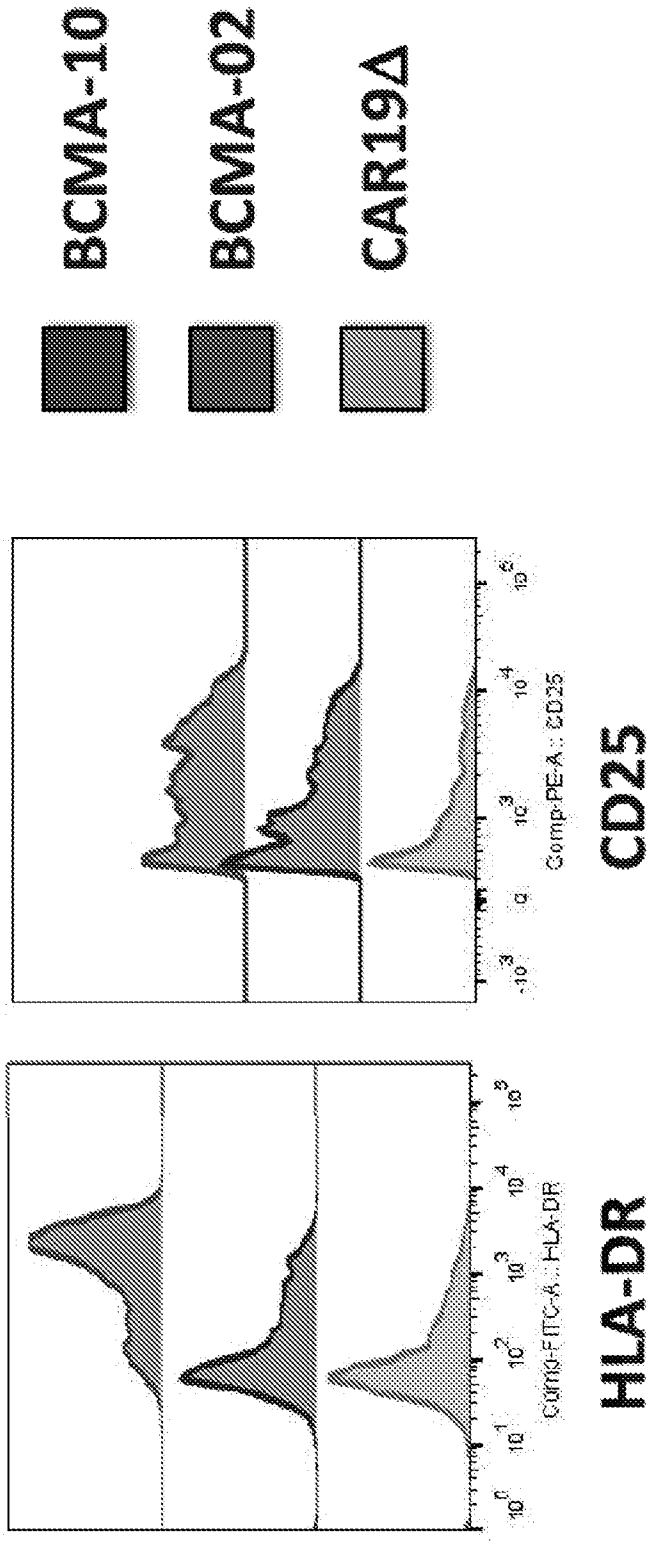
ФИГ. 2B


* Превышает предел детекции
10000
7500
5000
1500
1000
500
0
пг/мл
Нетрансдуцированные
CAR19▲
BCMA-02
BCMA-10
P < 0,0001
ИФН-γ
ФНО-α
ИЛ-1β
ИЛ-6

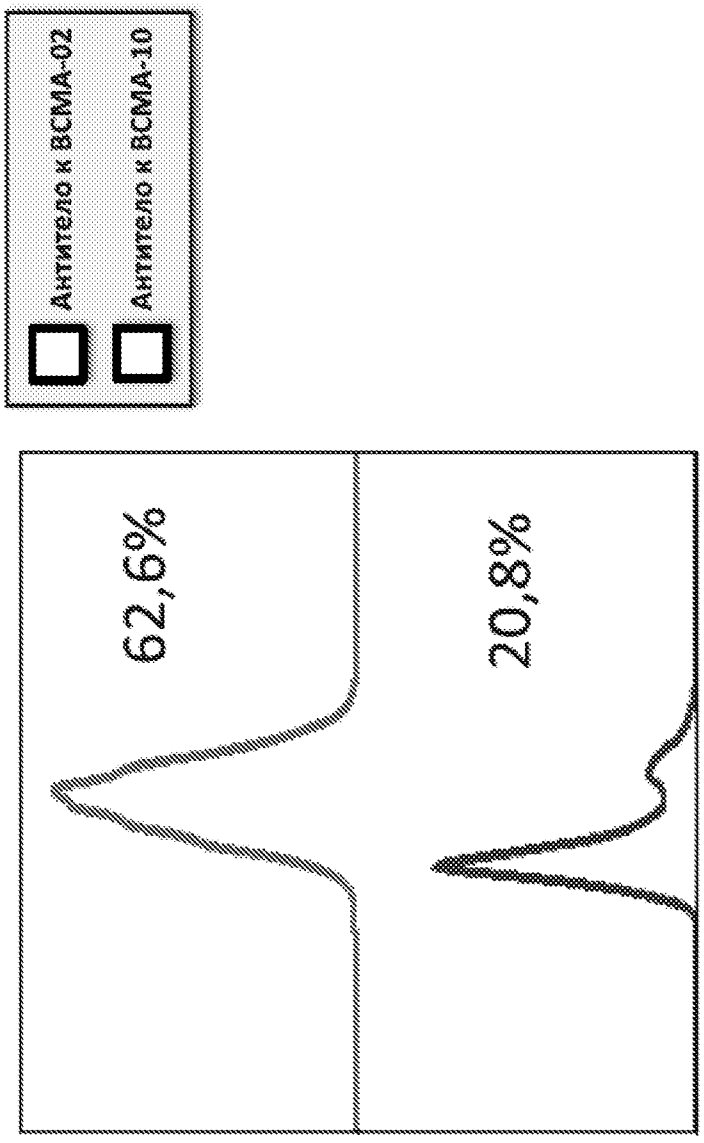
ФИГ. 3


Секреция цитокинов за 24 часа
несущими CAR к BCMA02 Т-клетками
(5e4 на 200 мкл)
CAR19
BCMA-02
BCMA-10
P < 0,0001
пг/мл
5000
4000
3000
2000
1000
0
MIP1α ИФН-γ ГМКСФ MIP1β ИЛ-8 ФНО-α ИЛ-1β ИЛ-6 Fkn ИЛ-10 ИЛ-2 ИЛ-4

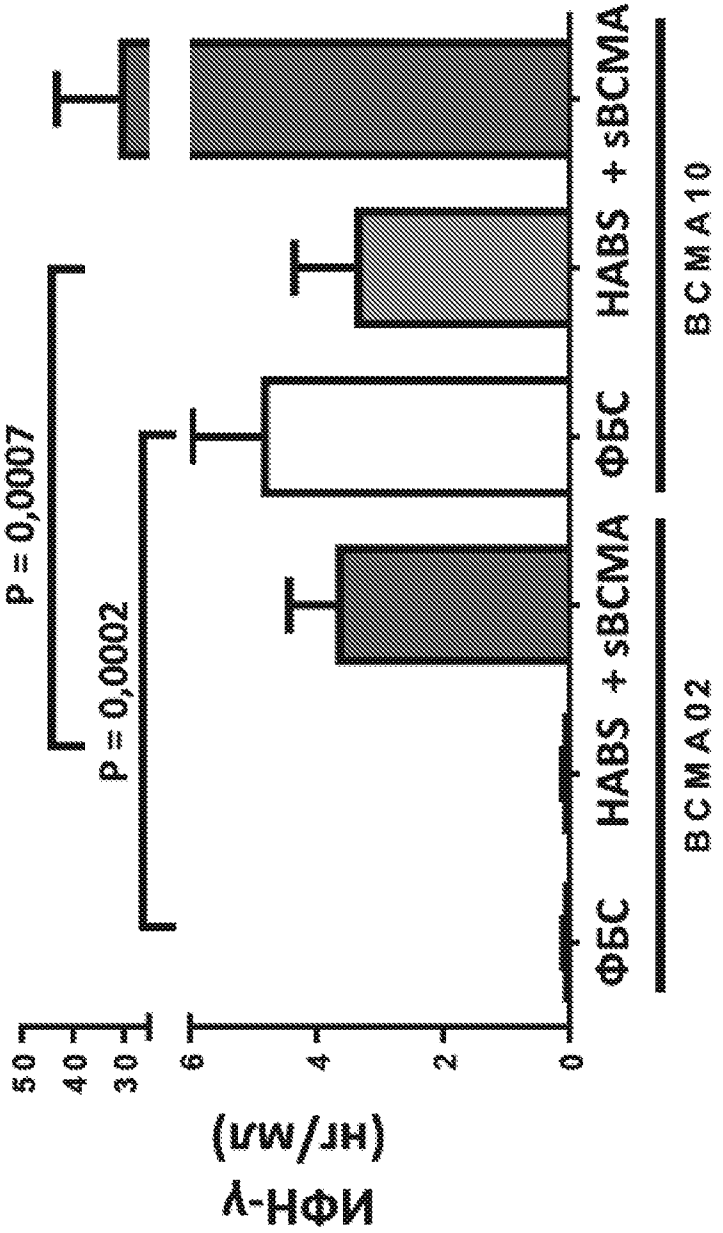
ФИГ. 4


BCMA-10
BCMA-02
CAR19Δ
CD25
HLA-DR
Comp-PE-A :: CD25
Comp-FITC-A :: HLA-DR

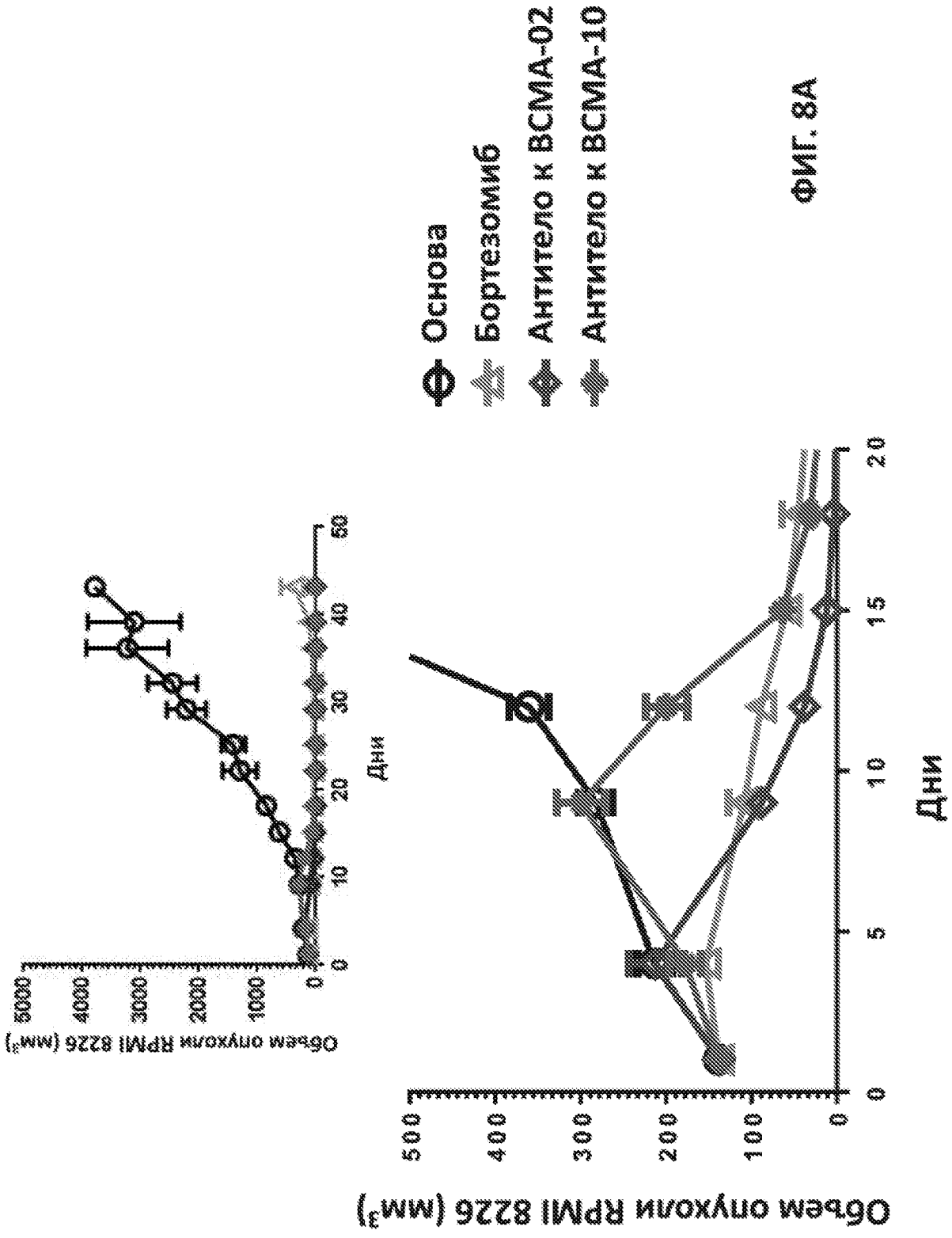
ФИГ. 5


Антитело к BCMA-02
Антитело к BCMA-10
62,6%
20,8%
Активированная каспаза-3

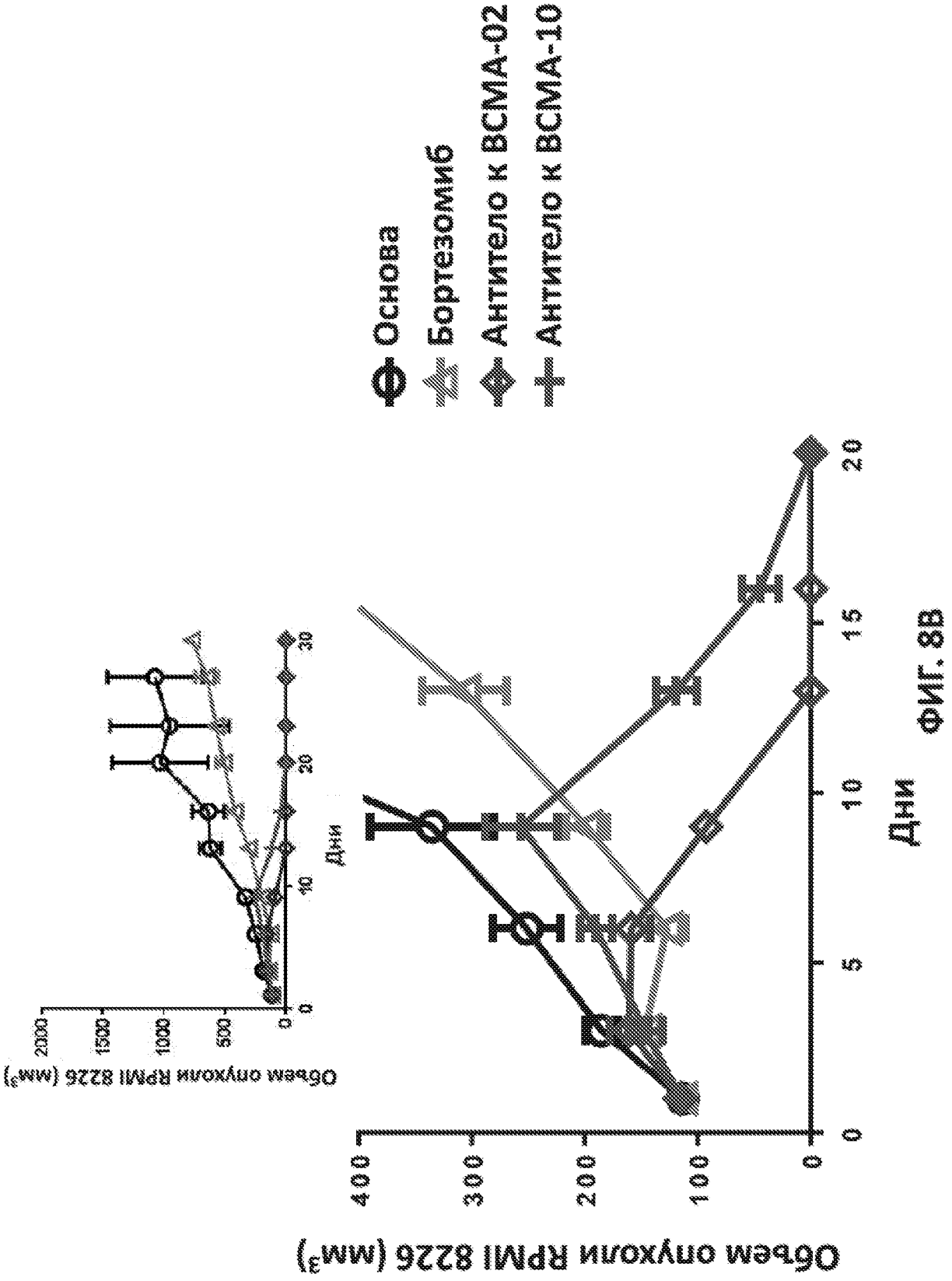
ФИГ. 6


ИФН-γ (нг/мл)
50
40
30
6
4
2
0
P = 0,0007
P = 0,0002
ФБС
HABS + sBCMA
ФБС
HABS + sBCMA
BCMA02
BCMA10

ФИГ. 7


Основа
Бортезомиб
Антитело к BCMA-02
Антитело к BCMA-10
Объем опухоли RPMI 8226 (мм³)
Дни
0
100
200
300
400
500
0
5
10
15
20
Объем опухоли RPMI 8226 (мм³)
Дни
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
10
20
30
40
60

ФИГ. 8А


Основа
Бортезомиб
Антитело к BCMA-02
Антитело к BCMA-10
Объем опухоли RPMI 8226 (мм³)
Дни
0
100
200
300
400
0
5
10
15
20
Объем опухоли RPMI 8226 (мм³)
Дни
0
500
1000
1500
2000
0
10
20
30

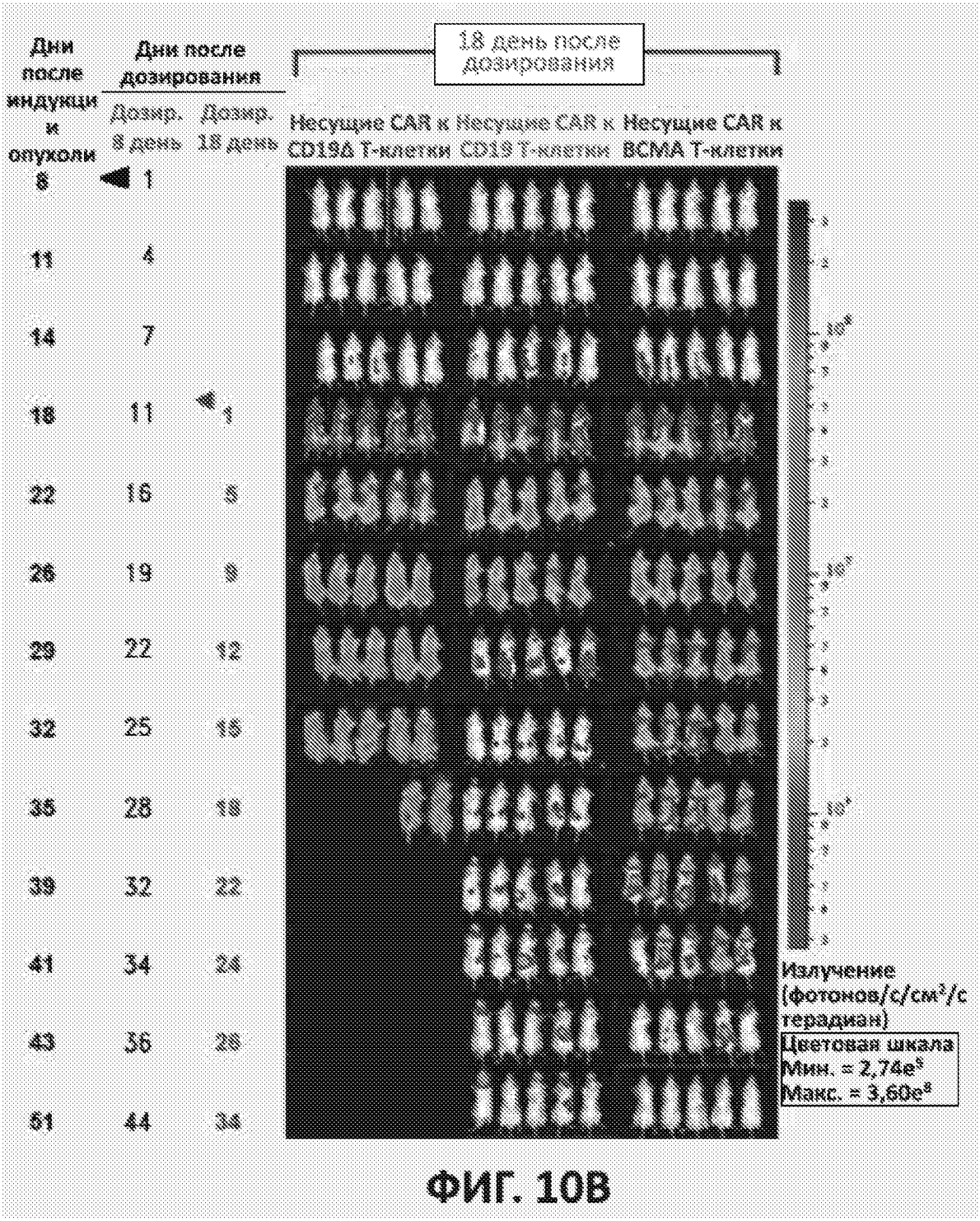
ФИГ. 8В

ФИГ. 9

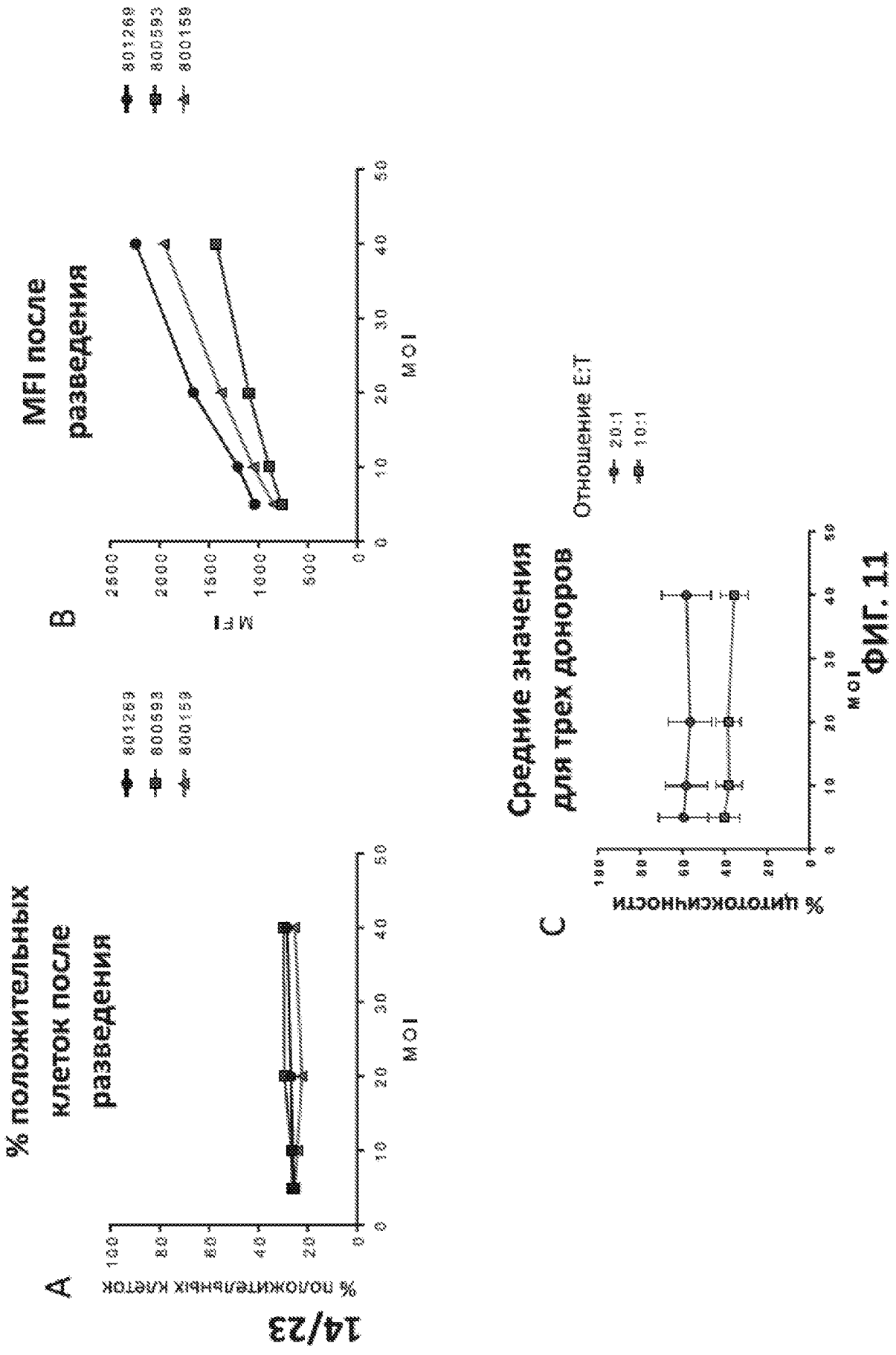
ЗАМЕНЯЮЩАЯ СТРАНИЦА (ПРАВИЛО 26)

Дни после индукции опухоли
Т после начала лечения
8 день после начала лечения
Дозирование на 8 день
Основа
Несущие CAR к CD19Δ Т-клетки
Несущие CAR к CD19 Т-клетки
Несущие CAR к BCMA Т-клетки
8
11
4
14
7
18
11
22
15
26
19
29
22
32
25
35
28
39
32
41
34
43
36
51
44

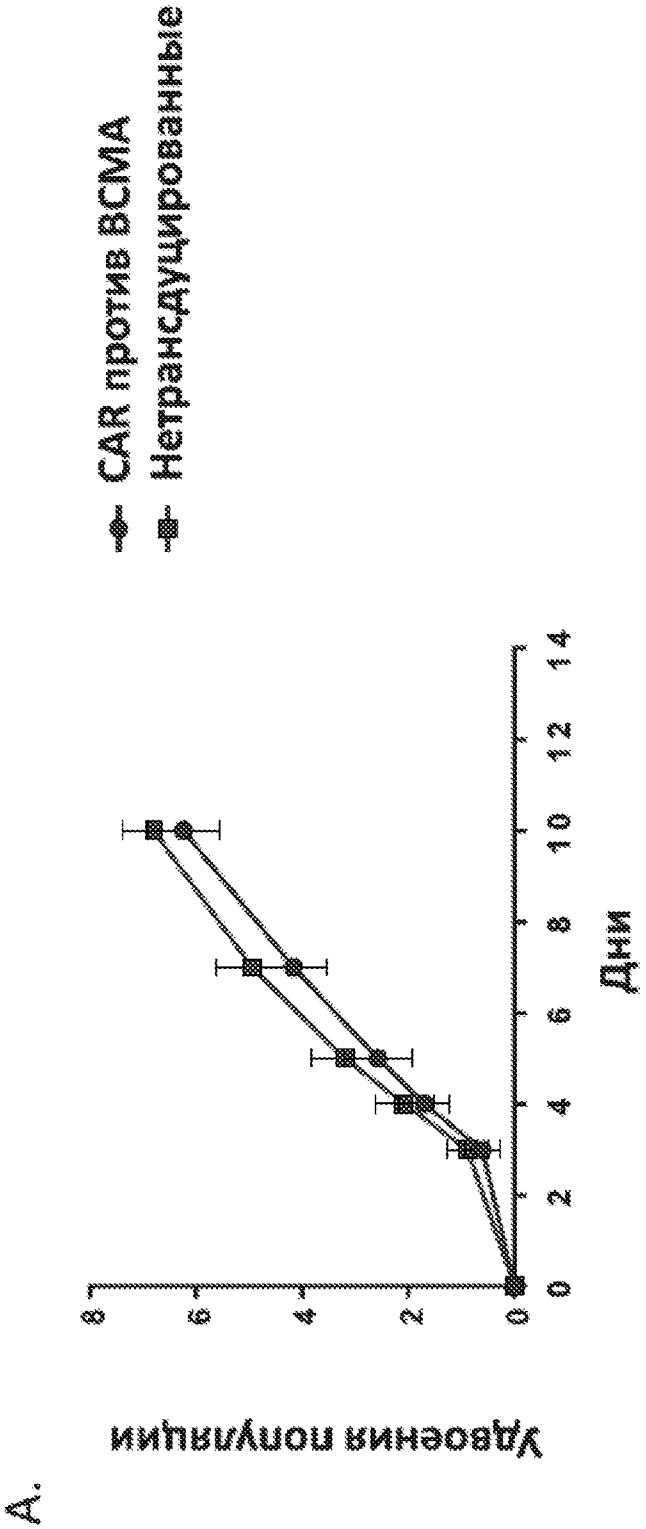
ФИГ. 10А


Дни после индукции опухоли
Дни после дозирования
Дозир. 8 день
Дозир. 18 день
18 день после дозирования
Несущие CAR к CD19Δ Т-клетки
Несущие CAR к CD19 Т-клетки
Несущие CAR к BCMA Т-клетки
8
11
14
18
22
26
29
32
35
39
41
43
51
1
4
7
11
16
19
22
25
28
32
34
36
44
1
8
9
12
15
18
22
24
28
34
Излучение (фотонов/с/см²/с терадиан)
Цветовая шкала
Мин. = 2,74e⁵
Макс. = 3,60e⁸

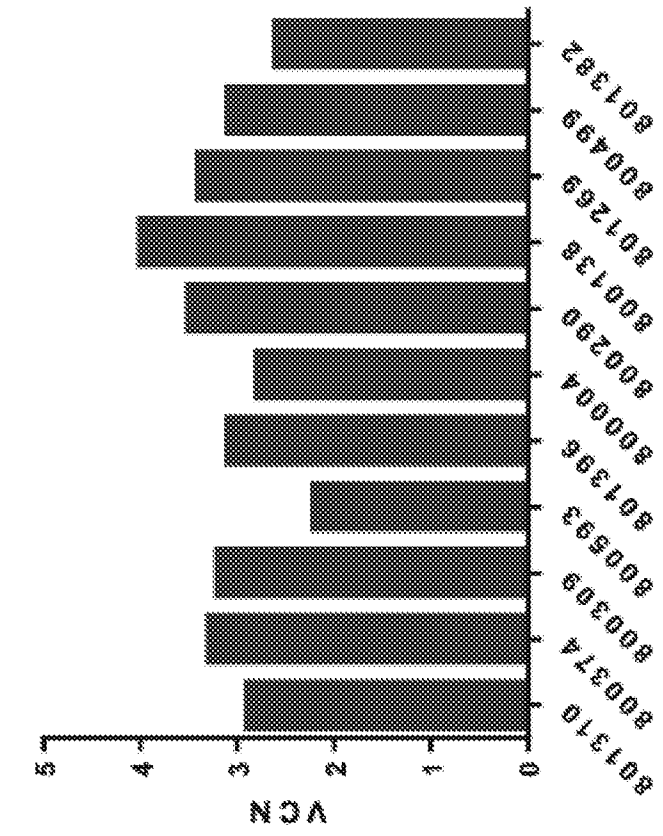
ФИГ. 10В


A
% положительных клеток после разведения
% положительных клеток
MOI
801269
800593
800159
B
MFI после разведения
MFI
MOI
C
Средние значения для трех доноров
Отношение E:T
20:1
10:1
% цитотоксичности
MOI

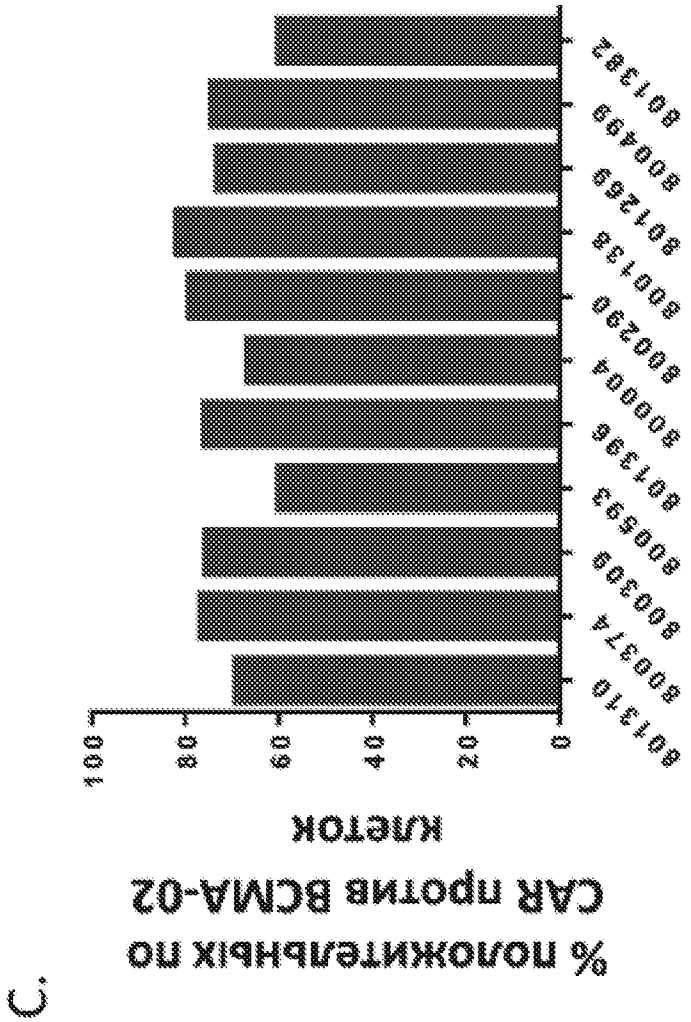
Фиг. 11


A.
Увеличение популяции
0
2
4
6
8
0
2
4
6
8
10
12
14
Дни
CAR против BCMA
Нетрансдуцированные

ФИГ. 12А

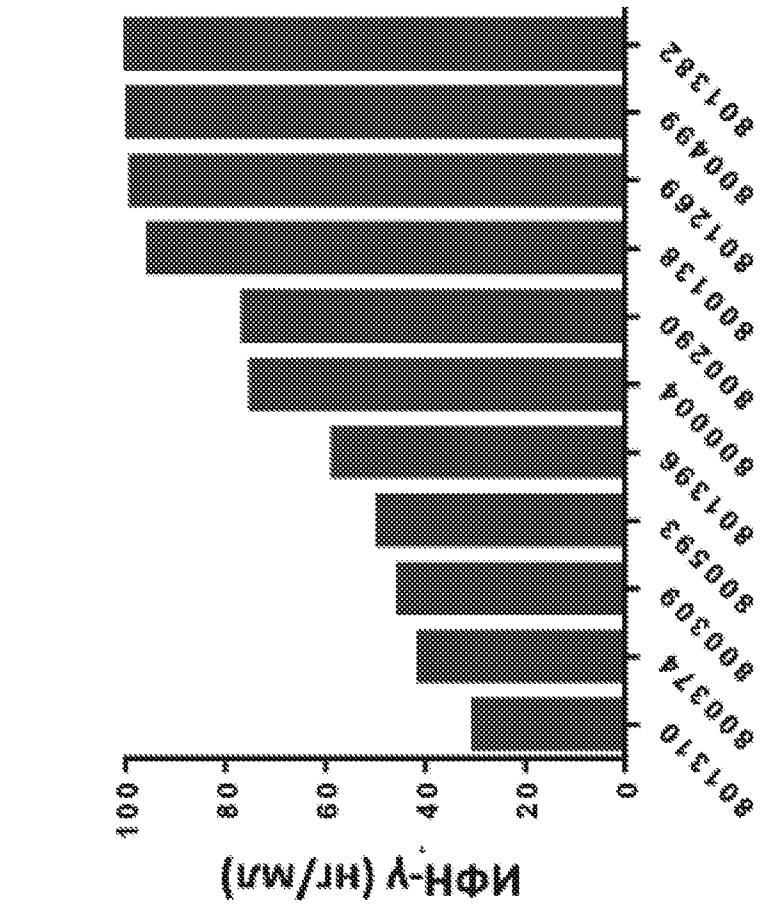

B.
VCN
0
1
2
3
4
5
801310
800374
800309
800593
801396
800004
800290
801138
801269
800499
801382

ФИГ. 12B

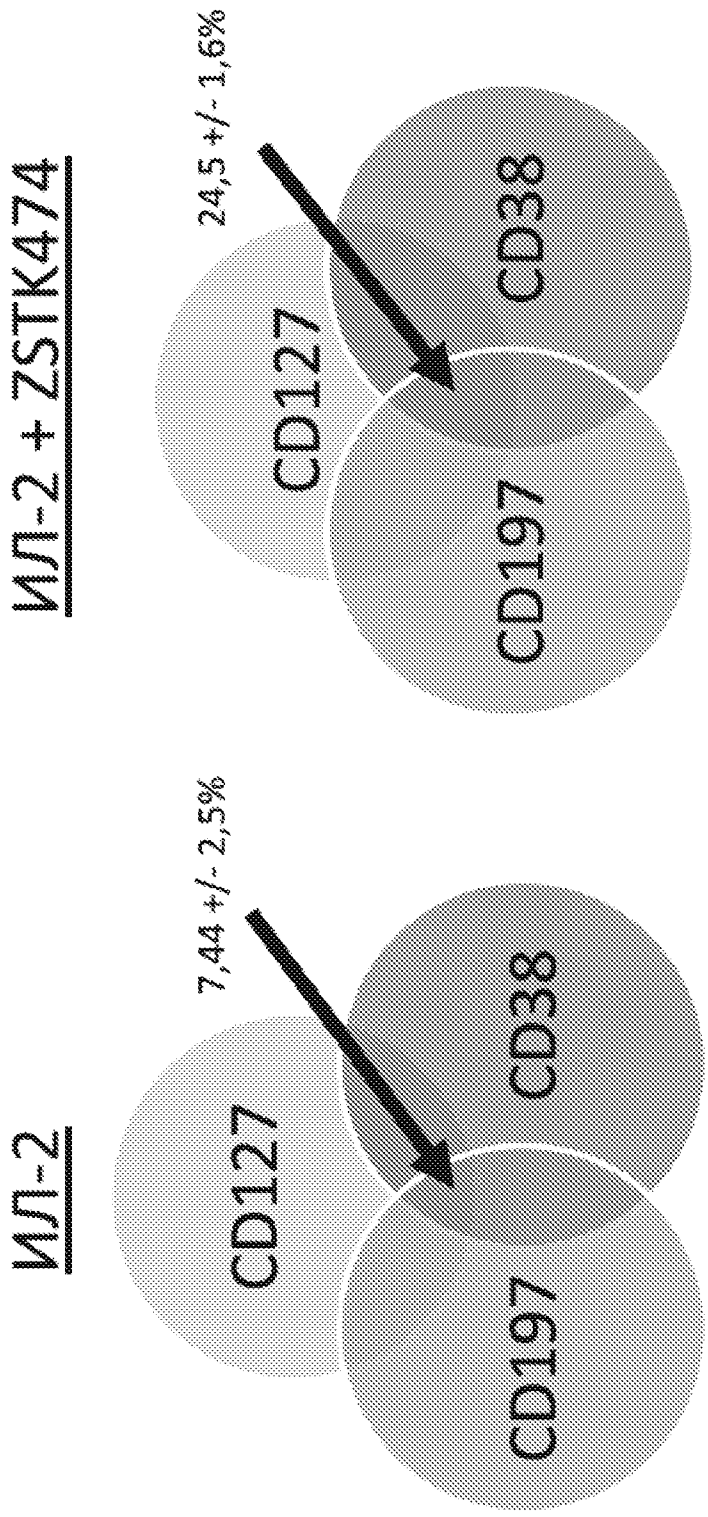

% положительных по
CAR против BCMA-02
клеток
100
80
60
40
20
0
801310
800374
800308
800593
801396
800004
800290
801138
801269
800499
801382

С.

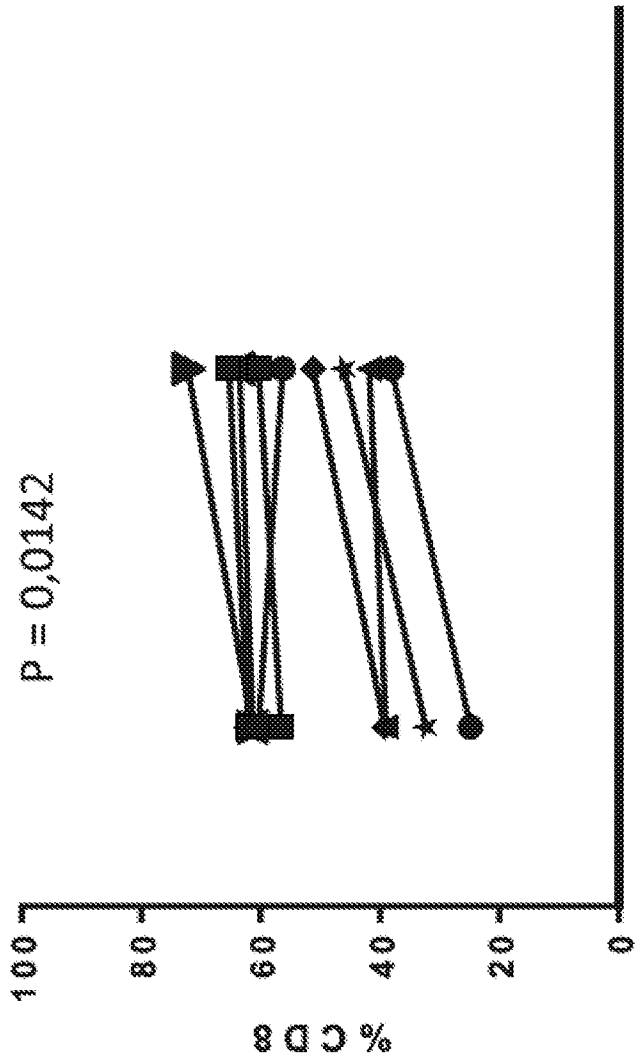
ФИГ. 12С


D.
ИФН-γ (нг/мл)
100
80
60
40
20
0
801310
800374
800309
800593
801396
800004
800290
801138
801269
800499
801382

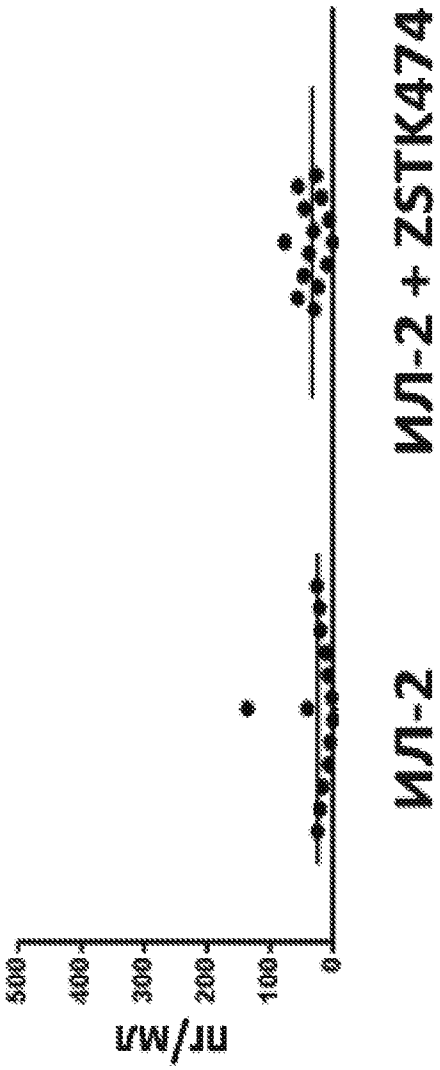
ФИГ. 12D


ИЛ-2
CD127
CD38
CD197
7,44 +/- 2,5%
ИЛ-2 + ZSTK474
CD127
CD38
CD197
24,5 +/- 1,6%

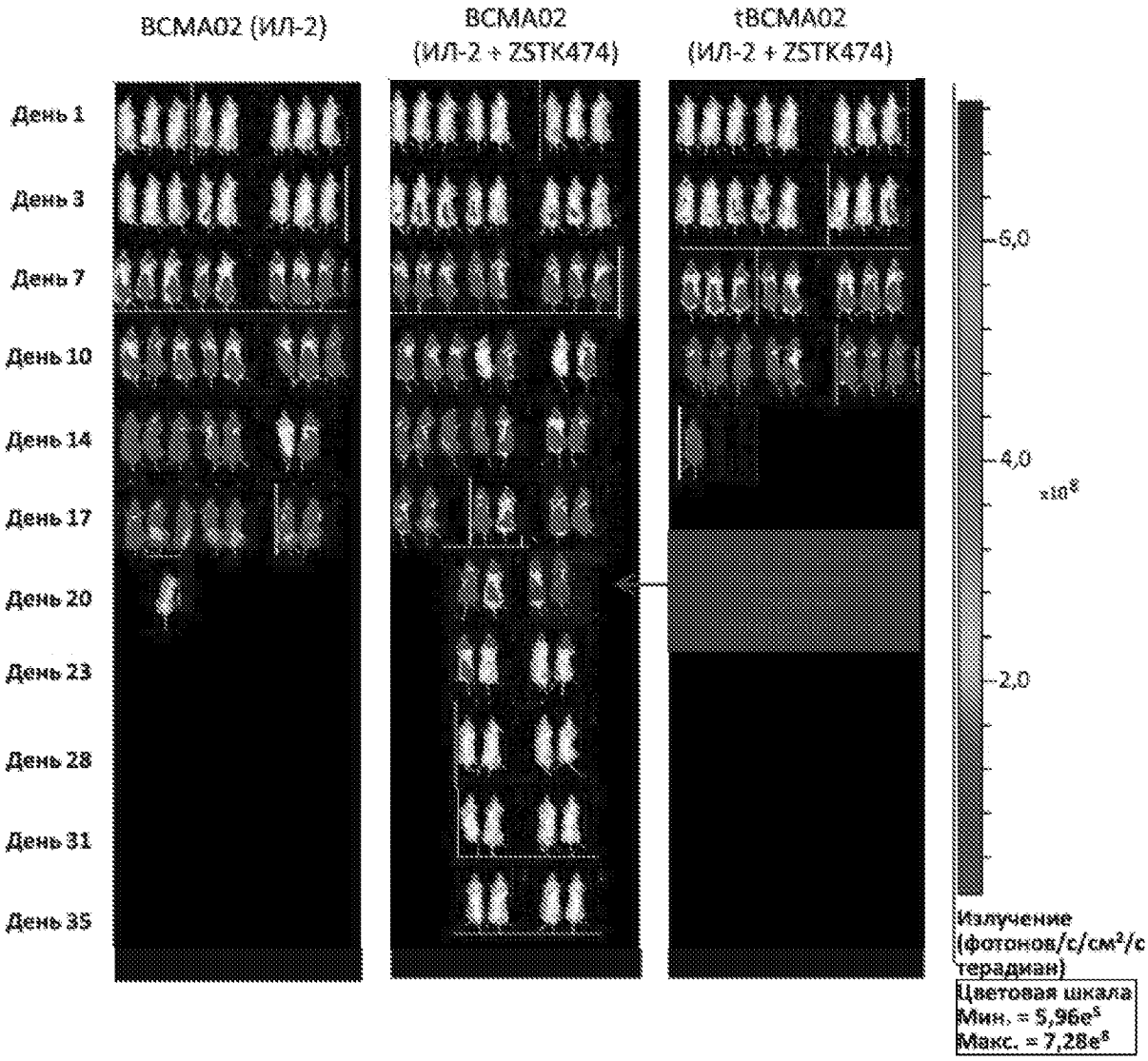
ФИГ. 13



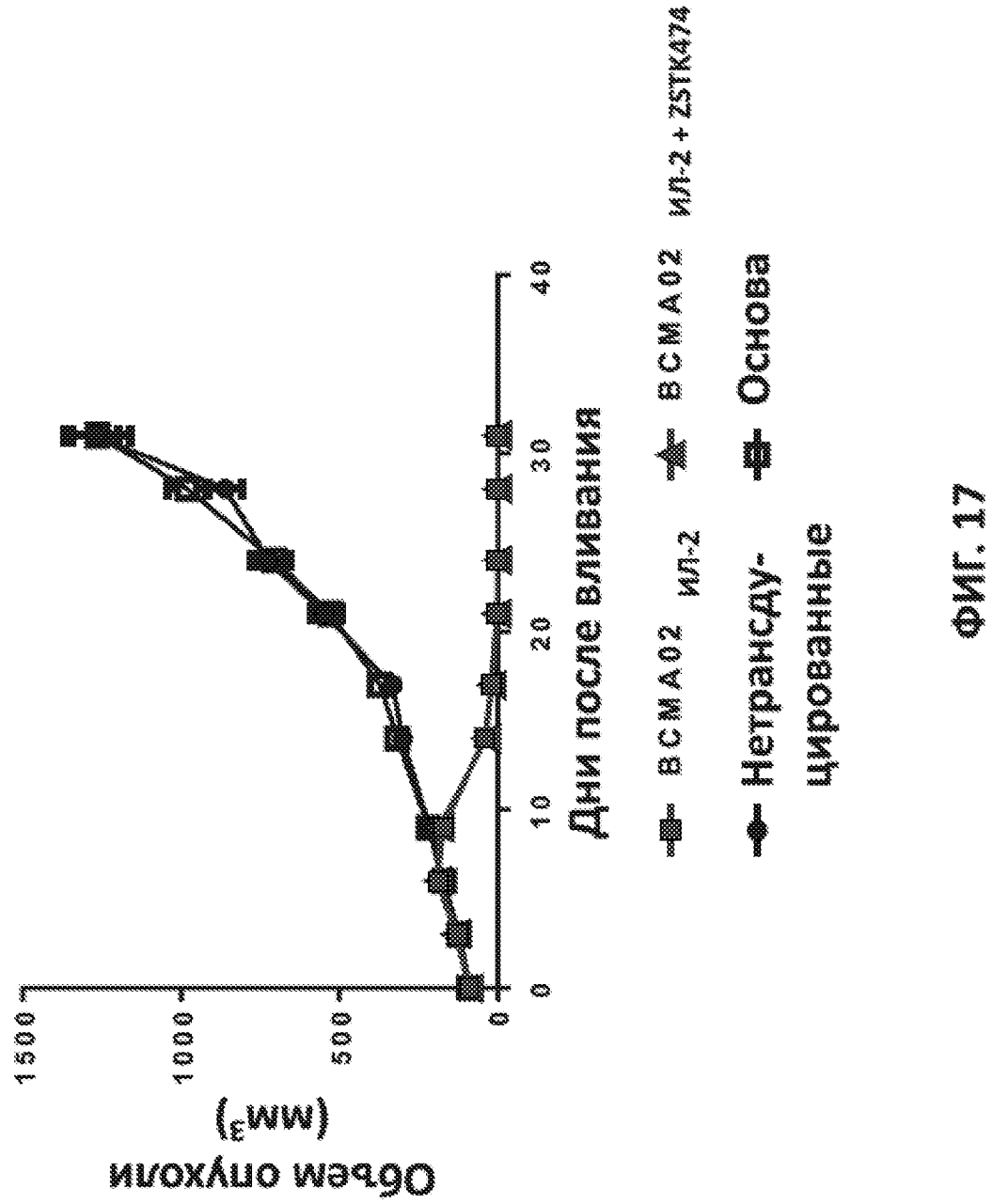
ФИГ. 14



ФИГ. 15


BCMA02 (ИЛ-2)
BCMA02
(ИЛ-2 + ZSTK474)
tBCMA02
(ИЛ-2 + ZSTK474)
День 1
День 3
День 7
День 10
День 14
День 17
День 20
День 23
День 28
День 31
День 35
6,0
4,0
2,0
x10⁸
Излучение
(фотонов/с/см²/с
терадиан)
Цветовая шкала
Мин. = 5,96e⁵
Макс. = 7,28e⁸

ФИГ. 16


Объем опухоли (мм³)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Дни после вливания
BCMA02
ИЛ-2
BCMA02
ИЛ-2 + ZSTK474
Нетрансду-цированные
Основа

ФИГ. 17