

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191296** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.09.27

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*A61K 31/454* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.11.07

---

(54) **СПОСОБЫ И КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И МОДУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОК**

---

(31) 62/757,755; 62/826,928

(32) 2018.11.08; 2019.03.29

(33) US

(86) PCT/US2019/060367

(87) WO 2020/097403 2020.05.14

(71) Заявитель:  
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Хасскарл Йенс (СН), Франкел  
Стэнли Р., Порте Майкл, Пурдехнад  
Майкл, Джессап Хайди, Цзян Юэ,  
Цинь Джим Ши Сян, Сони Неха,  
Воркс Мелисса (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится в некоторых аспектах к способам, композициям и применениям, включающим иммунотерапию, такую как адоптивная клеточная терапия, например Т-клеточную терапию и к иммуномодулирующему соединению, такому как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3-убиквитинлигазы. Предлагаемые способы, композиции и применения включают их в комбинированную терапию, включающую введение и применение одного или нескольких иммуномодулирующих соединений в комбинации с Т-клеточной терапией, такой как терапия с помощью генно-инженерных Т-клеток, включающая генно-инженерные клетки с рекомбинантным рецептором, такие как (CAR)-экспрессирующие Т-клетки с химерным рецептором антигена. Также предлагаются композиции, способы введения субъектам, промышленные изделия и наборы для применения в этих способах. В некоторых аспектах признаки способов и клеток обеспечивают увеличенную или улучшенную активность, эффективность, персистентность, размножение и/или пролиферацию Т-клеток для адоптивной клеточной терапии или эндогенных Т-клеток, рекрутированных иммунотерапевтическими агентами.

---

**A1**

**202191296**

**202191296**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568559EA/032

### СПОСОБЫ И КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И МОДУЛЯЦИИ Т-КЛЕТОК

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет Временной заявки на патент США № 62/757755, поданной 8 ноября 2018 года, и Временной заявки на патент США № U62/826928, поданной 29 марта 2019 года, содержание которых тем самым включается в качестве ссылок во всей своей полноте для всех целей.

Включение в качестве ссылки Списка последовательностей

[0002] Настоящая заявка подается вместе со Списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей приводится как файл, озаглавленный 735042019440SeqList.txt, созданный 7 ноября 2019 года, который имеет размер 320 килобайт. Информация в электронном формате Списка последовательностей включается в качестве ссылки во всей своей полноте.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

[0003] Настоящее изобретение относится к нескольким аспектам к способам, композициям и к применениям, включающим иммунотерапию, такую как адоптивная клеточная терапия, например, Т-клеточная терапия, и к иммуномодулирующему соединению, такому как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3-убиквитинлигазы. Предлагаемые способы, композиции и применения включают их же для комбинированной терапии, включающей введение и применение одного или нескольких иммуномодулирующих соединений в комбинации с Т-клеточной терапией, такой как терапия с помощью генно-инженерных Т-клеток, содержащая генно-инженерные клетки с рекомбинантным рецептором, такие как (CAR (химерный рецептор антигена))-экспрессирующие Т-клетки. Также предлагаются композиции, способы введения субъектам, промышленные изделия и наборы для использования в способах. В некоторых аспектах, признаки способов и клеток обеспечивают увеличение или улучшение активности, эффективности, персистентности, размножения и/или пролиферации Т-клеток для адоптивной клеточной терапии или эндогенных Т-клеток, рекрутированных с помощью иммунотерапевтических агентов.

#### **Уровень техники**

[0004] Для иммунотерапии доступно множество стратегий, например, введение генно-инженерных Т-клеток для адоптивной терапии. Например, доступны стратегии генной инженерии Т-клеток, экспрессирующих генно-инженерные рецепторы антигенов, такие как CAR, и введения композиций, содержащих такие клетки, субъектам. Необходимы улучшенные стратегии для улучшения эффективности клеток, например, улучшения персистентности, активности и/или пролиферации клеток при введении субъектам. Предлагаются способы, композиции, наборы и системы, для удовлетворения таких потребностей.

#### **Сущность изобретения**

[0005] В настоящем документе предлагаются способы сохранения активности Т-клеток, включающие экспонирование множества Т-клеток, имеющих фенотип истощения, для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3). В некоторых вариантах осуществления способов, предлагаемых в настоящем документе, одна или несколько Т-клеток включают Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, который специфично связывается с целевым антигеном.

[0006] В настоящем документе предлагаются способы предотвращения или ингибирования или уменьшения или замедления начала истощения Т-клеток, способ включает экспонирование множества Т-клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где, по меньшей мере, часть экспонирования осуществляется при условиях, которые индуцируют или могут индуцировать фенотип истощения у Т-клеток из этого множества в отсутствие соединения.

[0007] В настоящем документе предлагаются способы уменьшения или замедления начала истощения Т-клеток, способ включает экспонирование множества Т-клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где, по меньшей мере, часть экспонирования осуществляется при условиях, которые индуцируют или могут индуцировать фенотип истощения у Т-клеток из этого множества в отсутствие соединения.

[0008] В настоящем документе предлагаются способы повышения активности или сильнодействия Т-клеток и предотвращения или ингибирования, уменьшения или замедления начала истощения Т-клеток, включающие экспонирование множества Т-клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют с и/или связываются с цереблном (CRBN) и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos

(IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где, по меньшей мере, часть экспонирования осуществляется при условиях, которые индуцируют или могут индуцировать фенотип истощения у Т-клеток из этого множества в отсутствие соединения.

[0009] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, условия включают стимулирующие условия для Т-клеток, необязательно, включающие экспонирование, по меньшей мере, для одного стимулирующего агента для Т-клеток, который может стимулировать сигнал у Т-клеток из этого множества, указанный сигнал необязательно включает первичный и/или костимулирующий сигнал. В некоторых вариантах осуществления, состояния включают постоянное, повторяющееся, пролонгированное или продолжительное экспонирование, по меньшей мере, для одного стимулирующего агента для Т-клеток.

[0010] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит поликлональный агент, антиген, специфично распознающийся рецептором, экспрессируемым на Т-клетках из этого множества, или агент, который связывается с рецептором антигена, экспрессируемым Т-клетками из этого множества. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или включает PMA и иономицин или представляет собой или включает агонист рецептора Т-клеток или агонист комплекса с рецептором Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, агент специфично связывается с элементом комплекса TCR, необязательно, где агент специфично связывается с CD3, необязательно, с CD3 зета.

[0011] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит антитело анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток специфично связывает костимулирующую молекулу Т-клетки, где костимулирующая молекула Т-клетки необязательно представляет собой CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, CD40L или ICOS или, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток дополнительно включает агент, который специфично связывает костимулирующую молекулу Т-клетки, где костимулирующая молекула Т-клетки необязательно представляет собой CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, CD40L или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит антитело анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит или дополнительно содержит комплекс MHC-пептид, распознаваемый рецептором антигена, экспрессируемым одной или несколькими Т-клетками из этого множества, или антиген, распознаваемый рецептором антигена, экспрессируемым одной или несколькими Т-клетками из этого множества. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько Т-клеток из множества экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывает целевой антиген. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий

агент для Т-клеток связывается с рекомбинантным рецептором антигена. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или содержит антиидиотипическое антитело специфичное к рекомбинантному рецептору антигена. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или содержит целевой антиген или его часть, распознающуюся или связываемую рекомбинантным рецептором антигена, и/или, где состояния включают экспонирование для целевого антигена. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, рекомбинантный рецептор антигена представляет собой рекомбинантный рецептор Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

[0012] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, одна или несколько Т-клеток представляют собой первичные Т-клетки человека, необязательно, от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, экспонирование Т-клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения осуществляется *ex vivo*. В других вариантах осуществления, экспонирование осуществляется *in vivo* и экспонирование включает введение соединения субъекту, где Т-клетки необязательно происходят от субъекта, где введение соединения осуществляется указанному субъекту; и/или экспонирование включает введение указанного множества Т-клеток субъекту, где Т-клетки необязательно происходят от субъекта, где введение соединения осуществляется указанному субъекту. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, экспонирование Т-клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения включает указанное введение указанного соединения, и где, перед экспонированием указанному субъекту вводится композиция, содержащая множество Т-клеток, субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием.

[0013] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, экспонирование Т-клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения включает указанное введение указанного соединения, и при этом перед экспонированием указанному субъекту вводится композиция, содержащая множество Т-клеток субъекта, для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием; или указанное экспонирование включает введение указанных Т-клеток указанному субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием, где перед экспонированием указанному субъекту вводится указанное соединение; или указанное экспонирование включает введение указанных Т-клеток указанному субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием, и включает введение указанного соединения указанному субъекту.

[0014] В настоящем документе предлагаются способы лечения, которые включают введение субъекту иммуномодулирующего соединения, где указанное иммуномодулирующее соединение выбрано из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где (a) указанному субъекту, перед введением соединения, вводится Т-клеточная терапия, которая включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывает целевой антиген, или (b) перед введением указанного соединения или во время него, указанный субъект или образец крови от этого субъекта содержит или, как подтверждено, содержит одну или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, где во время введения соединения: (i) одна или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта, имеют фенотип истощения; (ii) одна или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта, как определено, имеют фенотип истощения; (iii) фенотип истощения одной или нескольких Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или маркер, или его индикаторный параметр, детектируется или измеряется у субъекта или в биологическом образце от субъекта; (iv) по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40% или, по меньшей мере, или примерно 50% от всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в биологическом образце от субъекта, имеют фенотип истощения; и/или (v) примерно или больше 10%, примерно или больше 20%, примерно или больше 30%, примерно или больше 40% или примерно или больше 50% Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в биологическом образце от субъекта имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеющих фенотип истощения, в сравнимом биологическом образце в предыдущей временной точке.

[0015] В настоящем документе предлагаются способы лечения, которые включают (a) выбор субъекта в качестве кандидата для введения иммуномодулирующего соединения, указанный выбранный субъект имеет истощенные Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; и (b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, где иммуномодулирующее соединение выбрано из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3).

[0016] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, ткань, опухоль, биологическая жидкость или биологический образец

указанного выбранного субъекта или от него: (i) содержит одну или несколько Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном и который имеет фенотип истощения; (ii) содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где, по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40%, по меньшей мере, или примерно 50%, по меньшей мере, или примерно 60%, по меньшей мере, или примерно 70% или, по меньшей мере, или примерно 80% Т-клеток в указанной ткани, жидкости, опухоли или образце экспрессируют рекомбинантный рецептор, который имеет фенотип истощения; и/или (iii) содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где примерно на 10% или около того, больше, примерно на 20% или около того, больше, примерно на 30% или около того, больше, примерно на 40% или около того, больше или примерно на 50% или около того, больше, или более чем в 2 раза больше или более чем в 3 раза больше или более чем в 5 раз больше или более чем в 10 раз больше Т-клеток в ткани, опухоли, жидкости или образце выбранного субъекта или от него, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом или количеством Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта или в сравнимой жидкости, ткани, опухоли или образце от него в более ранней временной точке, имеющих указанный фенотип истощения. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, перед указанным введением соединения, указанному субъекту вводится множество Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и более ранняя временная точка представляет собой момент времени непосредственно перед введением Т-клеток из множества, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, субъекту.

[0017] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, указанный выбор указанного субъекта включает определение того или основано на определении того, что в ткани, опухоли, биологической жидкости или биологическом образце указанного выбранного субъекта или от него: (i) содержится одна или несколько Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, и которые имеют фенотип истощения; (ii) содержится множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где, по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40%, по меньшей мере, или примерно 50%, по меньшей мере, или примерно 60%, по меньшей мере, или примерно 70% или, по меньшей мере, или примерно 80%, Т-клеток в указанной ткани, жидкости, опухоли или образце, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеют фенотип истощения; и/или (iii) содержится множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор

антигена, который связывается с целевым антигеном, где примерно на 10% или около того, больше, примерно на 20% или около того, больше, примерно на 30% или около того, больше, примерно на 40% или около того, больше или примерно на 50% или около того, больше, или более чем в 2 раза больше или более чем в 3 раза больше или более чем в 5 раз больше или более чем в 10 раз больше, чем Т-клеток в ткани, опухоли, жидкости или образце выбранного субъекта или от него, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом или количеством Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта или в сравнимой жидкости, ткани, опухоли или образце от него в более ранней временной точке, имеющих указанный фенотип истощения.

[0018] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, перед указанным введением соединения, указанному субъекту вводится множество Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и где указанная более ранняя временная точка необязательно находится после введения Т-клеток и перед указанным выбором.

[0019] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, предыдущая временная точка представляет собой момент времени: после введения Т-клеток, экспрессирующих указанный рекомбинантный рецептор, указанному выбранному субъекту и соответствует пиковому или максимальному уровню или находится перед ним, для Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, детектируемых в крови субъекта; в диапазоне 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней или более до указанного определения или выбора.

[0020] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, во время введения Т-клеточной терапии субъект имеет заболевание или состояние; во время введения Т-клеточной терапии и во время введения соединения субъект имеет заболевание или состояние; во время введения Т-клеточной терапии субъект имеет заболевание или состояние и во время введения соединения, заболевание или состояние возобновляется или прогрессирует или считается не реагирующим на указанное соединение у субъекта после введения Т-клеточной терапии.

[0021] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях. В других вариантах осуществления, фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента

специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях.

[0022] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, повышение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

[0023] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, референтная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, как известно, имеющих фенотип без истощения, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно, от одного и того же субъекта, от такого же вида, что и субъект, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения. В некоторых вариантах осуществления, референтная популяция Т-клеток (а) представляет собой популяцию, соответствующую одному субъекту, содержащую Т-клетки из основного объема, выделенные из крови субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, необязательно, где Т-клетки из основного объема не экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или (b) получается от субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, до приема введения дозы Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В других вариантах осуществления, референтная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, перед их введением субъекту, необязательно, где композиция представляет собой криоконсервированный образец.

[0024] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, один или несколько из одного или нескольких маркеров истощения представляют собой ингибиторный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из одного или нескольких маркеров истощения выбираются из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT. В некоторых вариантах осуществления, активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продуцирования одного воспалительного цитокина или их комбинации, необязательно, где один цитокин или их комбинация выбрана из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа. В некоторых вариантах осуществления, экспонирование для указанного антигена или агента специфичного к рецептору антигена включает

инкубирование вместе с агентом или агентом специфичным к рецептору антигена, необязательно, вместе с агентом, который связывает рекомбинантный рецептор, где указанный антиген необязательно представляет собой целевой антиген.

[0025] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, антиген или агент специфичный к рецептору антигена включает целевые клетки, экспрессирующие антиген, необязательно, клетки указанного заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген ассоциируется, является специфичным к ним, и/или экспрессируется на клетке или ткани, заболевании, расстройстве или состоянии. В определенных вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген выбран из интегрина  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\beta6$ ), В-клеточного антигена созревания (BCMA), BAFF-R, B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичка, раково-тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинового мотива C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, CS-1, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHA2), рецептора эстрогена, Fc-подобного рецептора 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), белка связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептора альфа фолиевой кислоты, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного антигена человека, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, антигена лейкоцитов человека A1 (HLA-A1), антигена лейкоцитов человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора домена вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, обогащенного повторами лейцинов элемента A семейства 8 (LRRC8A), антигена Ley, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мышинных (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелана A (MART-1), нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простато-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора 1 подобного рецептору тирозинкиназы (ROR1), сурвивина TACI,

гликопротеина трофобластов (TPBG, также известного как 5T4), гликопротеина 72, ассоциированного с опухолью (TAG72), белка 1 родственного тирозинкиназе (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), белка 2 родственного тирозинкиназе (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоли Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичного или патоген-экспрессируемого антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул экспрессируемых ВИЧ, вирусом гепатита С, вирусом гепатита В или из других патогенов.

[0026] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, заболевание или состояние представляет собой В-клеточную неоплазию или неоплазию, связанную с В клетками. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. В определенных вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, заболевание или состояние представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой BCMA, элемент D группы 5 класса С рецепторов, связанных с G белком (GPCR5D), CD38 (циклическую ADP рибозагидролазу), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, подмножество 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TAC1 или FcRH5. В определенных вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой BCMA.

[0027] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, биологический образец представляет собой образец крови. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец представляет собой образец опухоли, необязательно, образец от биопсии опухоли.

[0028] В настоящем документе предлагаются способы лечения, включающие (а) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и (b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблонем (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при этом после указанного введения указанной терапии и указанного соединения, индикаторный фактор размножения или активности Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и индикаторный фактор продолжительности ответа увеличиваются по сравнению с референтным способом, где: референтный способ включает введение (а) самого по себе или введение (а) без введения иммуномодулирующего

соединения; индикаторный фактор размножения или активности включает (i) меру максимального количества Т-клеток, наблюдаемых в крови или раковой ткани субъекта после указанного введения, (ii) количество дней, прошедших от указанного введения и до достижения указанного максимального количества Т-клеток в крови или раковой ткани субъекта, или (iii) площадь под кривой (AUC) количества CAR-экспрессирующих клеток как функции времени, (iv) степень ответа субъектом.

[0029] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, мера продолжительности ответа представляет собой время выживаемости без прогрессирования заболевания, выживаемости или продолжительности наилучшего ответа. В некоторых вариантах осуществления, референтный способ включает введение PL-2.

[0030] В настоящем документе предлагаются способы лечения, включающие (a) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и (b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при количестве, продолжительности и/или с частотой введения эффективной для: (1) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, у наивных или истощенных Т-клеток субъекту, который необязательно, включает Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или (2) для предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или истощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или (3) для инвертирования фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно, включающие Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанному субъекту.

[0031] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа

истощения и/или для инвертирования указанного фенотипа истощения. В некоторых вариантах осуществления, количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения. В других вариантах осуществления, количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения.

[0032] В настоящем документе предлагаются способы лечения, включающие (a) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и (b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблон (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при количестве, продолжительности и/или с частотой введения эффективной для: (1) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, у наивных или неистощенных Т-клеток, субъекту, которая необязательно, включает Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или (2) для предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, который необязательно, включает Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или (3) для инвертирование фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно, включая Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного субъекта.

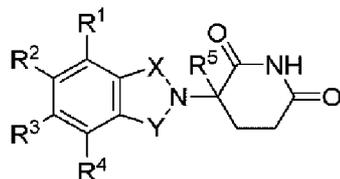
[0033] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и/или для инвертирования указанного фенотипа истощения. В некоторых вариантах осуществления, количество, продолжительность и/или частота введения

являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения. В других вариантах осуществления, количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения.

[0034] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, иммуномодулирующее соединение вводится в эффективном количестве от или примерно от 1 мг до 50 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 1 мг до 25 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 1 мг до 10 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 1 мг до 5 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 5 мг до 50 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 5 мг до 25 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 5 мг до 10 мг в день, когда оно вводится. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения (i) ежедневно в течение периода нескольких недель, (ii) ежедневно в течение не более 6 дней в неделю в течение периода нескольких недель, (ii) ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель; или ежедневно в течение не более 4 дней в неделю в течение периода нескольких недель. В определенных вариантах осуществления, введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель.

[0035] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение обедняет или деградирует Ikaros (IKZF1).

[0036] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой соединение следующей структуры:



где

один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляет собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>-;

(1) каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкокси с 1-4 атомами углерода, или

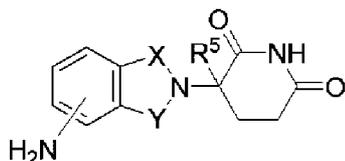
(2) один из  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  и  $R^5$  представляет собой  $-NHR^a$ , а оставшиеся  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляют собой водород, где  $R^a$  представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода;

$R^5$  представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода, бензил или галоген;

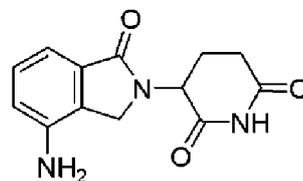
при условии, что  $R^5$  является иным, чем водород, если X и Y представляют собой  $-C(O)-$  и (i) каждый из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой фтор; или (ii) один из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой амино;

или их фармацевтически приемлемую соль.

[0037] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой соединение следующей структуры:

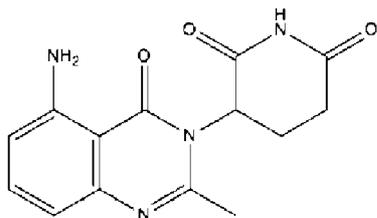


где один из X и Y представляет собой  $-C(O)-$ , а другой из X и Y представляет собой  $-C(O)-$  или  $-CH_2-$  и  $R^5$  представляет собой водород или низший алкил или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой или содержит 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-



ил)пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру: или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой соединение, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:

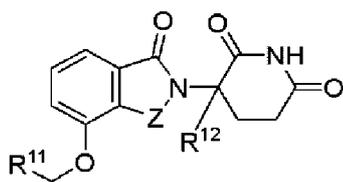


или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф (также упоминается Соединение 1). В некоторых вариантах осуществления,

соединение представляет собой 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион.

[0039] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, иммуномодулирующее соединение вводится в эффективном количестве от или примерно от 1 мг до 50 мг в день, от или примерно от 1 мг до 25 мг в день, от или примерно от 1 мг до 10 мг в день, от или примерно от 1 мг до 5 мг в день, от или примерно от 5 мг до 50 мг в день, от или примерно от 5 мг до 25 мг в день, от или примерно от 5 мг до 10 мг в день, где введение необязательно является ежедневным в ходе осуществления циклического режима.

[0040] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой соединение следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер, где:

Z представляет собой C=O или CH<sub>2</sub>;

R<sup>11</sup> представляет собой Z<sup>1</sup>-R<sup>13</sup>;

R<sup>12</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил;

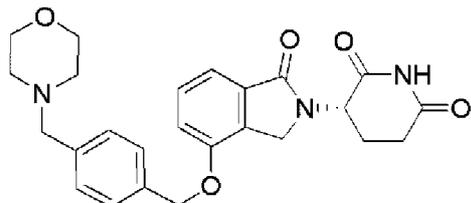
Z<sup>1</sup> представляет собой 6-10 - членный арил, гетероарил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или связь;

R<sup>13</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-арил, где арил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами; самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; амино; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероцикл, где гетероцикл необязательно является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; амино; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероарил, где гетероарил является

необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенным одним или несколькими атомами галогена; оксо; амино; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; и

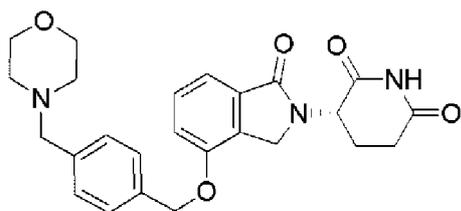
n равно 0, 1, 2 или 3.

[0041] В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой

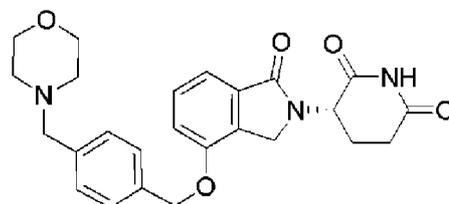


: или его фармацевтически приемлемую соль, сольват

или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления, соединение представляет собой Форму А кристаллической формы гидрохлоридной соли,



. В некоторых вариантах осуществления, картина XRPD



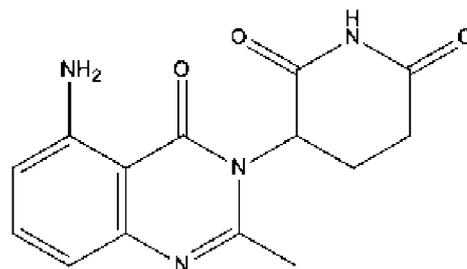
Формы А кристаллической формы гидрохлоридной соли

характеризуется пиками, расположенными при 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или во всех следующих или в следующих примерных положениях: 9,69, 12,82, 15,09, 15,94, 16,76, 17,65, 19,44, 19,80, 2230, 22,47, 22,95, 23,02, 24,29, 24,48, 24,70, 26,27, 26,77, 27,60, 29,43, 29,72 и 32,91 градуса 2θ.

[0042] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, вводится от или примерно от 0,1 мг до 1 мг в день, от или примерно от 0,1 мг до 0,6 мг в день, от или примерно от 0,1 мг до 0,3 мг иммуномодулирующего соединения, где введение необязательно является ежедневным в течение некоторого периода времени в циклическом режиме.

[0043] В настоящем документе предлагаются способы лечения, включающие (а) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который

связывается с целевым антигеном; и (b) введение субъекту соединения, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-



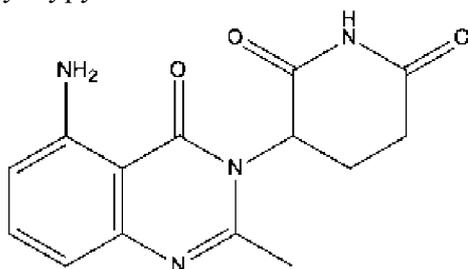
пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:

или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф (Соединение 1), где введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель.

[0044] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения начинается одновременно с Т-клеточной терапией и/или начинается в пределах одного дня до или после начала введения Т-клеточной терапии.

[0045] В некоторых вариантах осуществления, введение соединения начинается в тот же или примерно в тот же день или в пределах одного или примерно одного дня до или после начала введения Т-клеточной терапии.

[0046] В настоящем документе предлагаются способы лечения, включающие введение субъекту, имеющему рак, соединения, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



[0047]

или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф (Соединение 1), указанному субъекту вводят, до введения соединения, Т-клеточную терапию, включающую дозу генно-инженерных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, где введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель. В некоторых вариантах осуществления, раковое заболевание представляет собой В-

клеточную неоплазию, неоплазию, связанную с В клетками, не гематологический рак или плотную опухоль.

[0048] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, целевой антиген представляет собой опухолевый антиген, где целевой антиген необязательно ассоциируется, является специфичным к ним, и/или экспрессируется на клетке или ткани рака. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген выбран из В-клеточного антигена созревания (BCMA), интегрина  $\alpha\nu\beta 6$  (интегрин  $\alpha\nu\beta 6$ ), BAFF-R, B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичка, раково-тестикулярного антигена 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинового мотива С-С (CCL-1), CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD30, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD138, CD171, CS-1, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc-подобного рецептора 5 (FCRL5; также известен как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), белка связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептора альфа фолиевой кислоты, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного антигена человека, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, антигена лейкоцитов человека А1 (HLA-A1), антигена лейкоцитов человека А2 (HLA-A2), Ig-каппа, Ig-лямбда, рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора домена вставки киназы (kdr), молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, обогащенного повторами лейцинов элемента А семейства 8 (LRRC8A), антигена Ley, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мышинных (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелана А (MART-1), нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простато-специфичного антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичного мембранного антигена (PSMA), ROR1, сурвивина TACI, гликопротеина трофобластов (TPBG, также известного как 5T4), гликопротеина 72, ассоциированного с опухолью (TAG72), белка 1 родственного тирозинкиназе (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), белка 2 родственного тирозинкиназе (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2

фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоли Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичного или патоген-экспрессируемого антигена. В определенных вариантах осуществления, В-клеточная неоплазия представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления, лимфома представляет собой лимфому не-Ходжкина (NHL). В некоторых вариантах осуществления, NHL включает агрессивную NHL, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), DLBCL-NO, необязательно трансформированную медленно растущую В-клеточную лимфому; EBV-положительную DLBCL-NO; обогащенную Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточную лимфому; медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL); фолликулярную лимфому (FL), необязательно, фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В); и/или В-клеточную лимфому высокой степени с перегруппировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (двойное/тройное совпадение).

[0049] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, субъект идентифицируется или был идентифицирован как имеющий статус Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG) меньший или равный 1.

[0050] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, целевой антиген представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. В определенных вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген не представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой BCMA, элемент D группы 5 класса С рецепторов, связанных с G белком (GPCR5D), CD38 (циклическую ADP рибозагидролазу), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, подмножество 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI или FcRH5.

[0051] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, способ дополнительно включает продолжение циклического режима после окончания периода, если в конце этого периода субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD). В некоторых вариантах осуществления, циклический режим продолжается в течение более шести месяцев, если в течение шести месяцев или около того субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения. В других вариантах осуществления, циклический режим продолжается пока субъект не реализует полный ответ (CR) после лечения или пока рак не прогрессирует или не возобновляется после ремиссии после лечения.

[0052] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается, когда в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии, или после

этого. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения начинается примерно через 14 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В определенных вариантах осуществления, введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В других вариантах осуществления, введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 28 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения начинается через 21 день или около того, через 22 дня или около того, через 23 или около того, через 24 или около того, через 25 или около того, через 26 или около того, через 27 или около того, через 28 или около того после начала введения Т-клеточной терапии. В определенных вариантах осуществления, введение соединения начинается через 28 дней или около того после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, при начале введения соединения, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения Т-клеточной терапии.

[0053] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, острая токсичность представляет собой острый синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно, степени 3 или выше, CRS пролонгированной степени 3 или выше или степени 4 или 5; и/или острая токсичность представляет собой острую нейротоксичность, необязательно, степени 3 или выше, пролонгированной степени 3 или выше или нейротоксичность степени 4 или 5.

[0054] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения временно прекращается и/или циклический режим модифицируется, если субъект демонстрирует токсичность после введения соединения, необязательно, гематологическую токсичность. В некоторых вариантах осуществления, токсичность выбран из острой нейтропении, необязательно, фебрильной нейтропении, нейтропении пролонгированной степени 3 или выше. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения возобновляют, когда субъект больше не демонстрирует токсичности. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим модифицируется после возобновления введения соединения. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный циклический режим включает введение уменьшенного количества соединения и/или уменьшение частоты введения соединения. В определенных вариантах осуществления, модифицированный циклический режим включает введение уменьшенного количества соединения. В некоторых вариантах осуществления, доза соединения уменьшается и уменьшенное количество соединения находится в пределах между 1 мг или около того и 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, уменьшенное количество составляет 1 мг или около того или 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим не модифицируется после возобновления введения соединения. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим включает введение не более примерно 2 мг соединения ежедневно в течение не более

5 дней в неделю. В определенных вариантах осуществления, циклический режим включает введение 1 мг соединения или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю.

[0055] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой или содержит сольват (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой или содержит (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион.

[0056] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой или содержит сольват 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой или содержит гидрат 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В определенных вариантах осуществления, соединение представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион.

[0057] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение вводится перорально. В некоторых вариантах осуществления, период продолжается в течение 6 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект через 6 месяцев реализует полный ответ (CR). В других вариантах осуществления, циклический режим продолжается в течение этого периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до конца периода. В некоторых вариантах осуществления, субъект реализует полный ответ (CR) в течение периода введения и до конца периода введения.

[0058] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, способ дополнительно включает продолжение циклического режима после окончания периода, если в конце этого периода субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, циклический режим продолжается в течение более шести месяцев, если в течение шести месяцев или около того субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим продолжается пока субъект не реализует полный ответ (CR) после лечения или пока рак не прогрессирует или не возобновляется после ремиссии после лечения.

[0059] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается, когда в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии или после этого. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается примерно через 14 - примерно 35

дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 28 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается через 21 день или около того, через 22 дня или около того, через 23 или около того, через 24 или около того, через 25 или около того, через 26 или около того, через 27 или около того, через 28 дней или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

[0060] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения начинается через 28 дней или около того после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, при начале введения соединения, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, острая токсичность представляет собой острый синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно, степени 3 или выше, CRS пролонгированной степени 3 или выше или степени 4 или 5; и/или острая токсичность представляет собой острую нейротоксичность, необязательно, степени 3 или выше, пролонгированной степени 3 или выше или нейротоксичность степени 4 или 5.

[0061] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения временно прекращается и/или циклический режим модифицируется, если субъект демонстрирует токсичность после введения соединения, необязательно, гематологическую токсичность. В некоторых вариантах осуществления, токсичность выбрана из острой нейтропении, необязательно, фебрильной нейтропении, нейтропении пролонгированной степени 3 или выше. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения возобновляют, когда субъект больше не демонстрирует токсичности. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим модифицируется после возобновления введения соединения. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный циклический режим включает введение уменьшенного количества соединения и/или уменьшение частоты введения соединения. В определенных вариантах осуществления, модифицированный циклический режим включает введение уменьшенного количества соединения. В некоторых вариантах осуществления, доза соединения уменьшается и уменьшенное количество соединения находится в пределах между 1 мг или около того и 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю. В определенных вариантах осуществления, уменьшенное количество составляет 1 мг или около того или 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим не модифицируется после возобновления введения соединения. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим включает введение не более примерно, чем 2 мг соединения ежедневно в течение не

более 5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим включает введение 1 мг соединения или около того ежедневно в течение не более 5 дней недель.

[0062] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой или содержит сольват 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой или содержит гидрат 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-дион. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, соединение вводится перорально.

[0063] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения: инвертирует фенотип истощения Т-клеток у субъекта, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; предотвращает, ингибирует или замедляет появление фенотипа истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта или понижает уровень или степень фенотипа истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта или уменьшает процент клеток, имеющих фенотип истощения, от общего количества Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта.

[0064] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, начало введения соединения осуществляется после введения Т-клеточной терапии и после введения соединения или после его начала субъект демонстрирует восстановление или сохранение антиген- или опухоли-специфичной активности или функции Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта, где указанное восстановление, сохранение и/или начало введения указанного соединения необязательно осуществляется в момент времени после того, как Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, у субъекта или в крови субъекта продемонстрируют фенотип истощения.

[0065] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, введение соединения включает введение при количестве, частоте и/или продолжительности эффективных для: (а) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, у наивных или неистощенных Т-клеток, субъекту, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием

указанного введения указанного соединения; или (b) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или (c) инвертирования фенотипа истощения у истощенных Т-клетки, необязательно, включая Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанному субъекту. В некоторых вариантах осуществления, введение соединения включает введение при количестве, частоте и/или продолжительности эффективных для (i) воздействия указанного повышения активности и (ii) предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления указанного фенотипа истощения и/или инвертирования указанного фенотипа истощения. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки субъекта включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, и/или указанный антиген представляет собой целевой антиген.

[0066] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает: повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях. В некоторых вариантах осуществления, повышение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более. В других вариантах осуществления, уменьшение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

[0067] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, референтная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, как известно, имеющих фенотип без истощения, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно, от одного и того же субъекта из такого же вида, что и субъект, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения.

[0068] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, референтная популяция Т-клеток (а) представляет собой популяцию, соответствующую одному субъекту, содержащую Т-клетки из основного объема, выделенные из крови субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, необязательно, где Т-клетки из основного объема не экспрессируют рекомбинантный рецептор, и/или (b) получается от субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, до введения дозы Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, референтная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, перед их введением субъекту, где композиция необязательно представляет собой криоконсервированный образец.

[0069] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, один или несколько маркеров истощения представляют собой ингибиторный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько маркеров истощения выбираются из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

[0070] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продуцирования одного воспалительного цитокина или их комбинации, необязательно, где один цитокин или их комбинация выбираются из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа. В некоторых вариантах осуществления, экспонирование для указанного антигена или агента специфичного к рецептору антигена включает инкубирование вместе с антигеном или агентом специфичным к рецептору антигена, необязательно, с агентом, который связывает рекомбинантный рецептор, где указанный антиген необязательно представляет собой целевой антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген или агент специфичный к рецептору антигена включает целевые клетки, экспрессирующие антиген, необязательно, клетки указанного заболевания, расстройства или состояния. В определенных вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой антиген человека.

[0071] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный рецептор антигена, который специфично связывает целевой антиген. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфично связывается с целевым антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен включает ITAM. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен цепи CD3-зета (CD3 $\zeta$ ), необязательно, цепи CD3-зета человека. В некоторых вариантах осуществления, химерный

рецептор антигена (CAR) дополнительно включает костимулирующую сигнальную область. В других вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область включает сигнальный домен CD28 или 4-1BB, необязательно, CD28 человека или 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующий домен представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB человека.

[0072] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, CAR содержит scFv специфичный к целевому антигену; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит 4-1BB, необязательно, 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен CD3 зета, необязательно, сигнальный домен CD3 зета человека; и где CAR необязательно содержит дополнительно спейсер между трансмембранным доменом и scFv; CAR содержит, по порядку, scFv специфичный к целевому антигену; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB, необязательно, сигнальный домен 4-1BB человека и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой сигнальный домен CD3 зета, необязательно, сигнальный домен CD3 зета человека; или CAR содержит, по порядку, scFv специфичный к целевому антигену; спейсер; трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой сигнальный домен 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен CD3 зета.

[0073] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, доза генно-инженерных Т-клеток содержит от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, от  $1 \times 10^6$  до  $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, от  $5 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, доза генно-инженерных Т-клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно

$1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток. В определенных вариантах осуществления, доза генно-инженерных Т-клеток содержит  $5 \times 10^7$  или около того CAR-экспрессирующих клеток, в целом. В других вариантах осуществления, доза генно-инженерных Т-клеток содержит  $1 \times 10^8$  или около того CAR-экспрессирующих клеток.

[0074] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, доза клеток вводится парентерально, необязательно, внутривенно.

[0075] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки являются аутологичными для субъекта. В других вариантах осуществления, Т-клетки являются аллогенными для субъекта.

[0076] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, доза генно-инженерных Т-клеток содержит Т-клетки CD4+, экспрессирующие CAR, и Т-клетки CD8+, экспрессирующие CAR, и введение дозы включает введение множество отдельных композиций, указанное множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую Т-клетки CD4+ и Т-клетки CD8+, и вторая композиция содержит другие клетки среди Т-клеток CD4+ или Т-клеток CD8+.

[0077] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, перед введением, субъект предварительно кондиционируется с помощью противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, способ дополнительно включает, непосредственно перед введением, введение субъекту противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение примерно 200-400 мг/м<sup>2</sup> циклофосфида, необязательно 300 мг/м<sup>2</sup> или около того, включительно, и/или примерно 20-40 мг/м<sup>2</sup> флударабина, необязательно 30 мг/м<sup>2</sup>, ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней или, где противолимфомная терапия включает введение примерно 500 мг/м<sup>2</sup> циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение 300 мг/м<sup>2</sup> или около того циклофосфида и примерно 30 мг/м<sup>2</sup> флударабина ежедневно в течение 3 дней; и/или противолимфомная терапия включает введение 500 мг/м<sup>2</sup> или около того циклофосфида и примерно 30 мг/м<sup>2</sup> флударабина ежедневно в течение 3 дней.

[0078] В некоторых вариантах осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере,

50% субъектов, леченых согласно настоящему способу, реализуют полный ответ (CR), который является стойким или он является стойким, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих CR, в течение 6 месяцев или больше или в течение 9 месяцев или больше; и/или, где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих CR в течение 6 месяцев, сохраняют ответ, сохраняют CR и/или проживают или проживают без прогрессирования, 3 месяца или больше и/или 6 месяцев или больше и/или девять месяцев или больше; и/или, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 70% субъектов, леченых согласно настоящему способу, реализуют объективный ответ (OR) где OR необязательно является стойким или он является стойким, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих его в течение 6 месяцев или больше или в течение 9 месяцев или больше; и/или, где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих его в течение 6 месяцев сохраняют ответ или проживают 3 месяца или больше и/или 6 месяцев или больше.

[0079] Также, в настоящем документе предлагается наборы, которые содержат (а) Т-клеточную терапию, включающую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и (b) иммуномодулирующее соединение, выбранное из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3); и (c) инструкции для введения соединения и/или Т-клеточной терапии согласно любым способам, предлагаемым в настоящем документе.

#### **Краткое описание чертежей**

[0080] На Фиг.1А показано поверхностное экспрессирование ВСМА множества линий клеток миеломы (RPMI-8226, MM1.S и OPM-2). Точечная линия показывает фон и ВСМА-отрицательные линии клеток окрашиваются с помощью антитела анти-ВСМА. MFI - это медианная интенсивность флуоресценции.

[0081] На Фиг.1В показано процент уменьшения количества ВСМА-экспрессирующих целевых клеток (RPMI-8226) с помощью CAR+ Т-клеток анти-ВСМА в присутствии и в отсутствие леналидомида (10 мкМ) после 6 дней совместного культивирования. Фиг.1С показывает воздействие леналидомида на цитолитическую активность CAR+ Т-клеток анти-ВСМА против целевых клеток RPMI-8226.

[0082] На Фиг. 2А-2С показано количество IL-2 (Фиг.2А), IFN $\gamma$  (Фиг.2В) и TNF- $\alpha$  (Фиг.2С) наблюдаемых в супернатантах после инкубирования целевых клеток RPMI-8226 вместе с CAR+ Т-клетками анти-ВСМА в присутствии и в отсутствие леналидомида.

[0083] на Фиг.3А показано воздействие увеличения концентрации леналидомида на цитолитическую активность CAR+ Т-клеток анти-ВСМА против целевых клеток OPM2.

[0084] на Фиг. 3В-D показано количество IFN $\gamma$  (Фиг.3В), IL-2 (Фиг.3С) и TNF- $\alpha$  (Фиг.3D), наблюдаемое в супернатантах после инкубирования целевых клеток OPM2

вместе с CAR+ Т-клетками анти-BCMA в присутствии увеличивающихся концентраций леналидомида или в отсутствие леналидомида.

[0085] На Фиг.3Е показано цитолитическую активность антиген-специфичных CAR-Т анти-BCMA и продуцирование цитокинов CAR+ Т-клетками+ анти-BCMA, полученными от репрезентативных здоровых доноров и от пациентов с множественной миеломой, против целевых клеток OPM-2 в присутствии различных концентраций леналидомида (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида) или в отсутствие леналидомида.

[0086] На Фиг.3F показано цитолитическую активность антиген-специфичных CAR-Т анти-BCMA для CAR+ Т-клеток анти-BCMA, полученных от трех здоровых доноров и одного пациента с множественной миеломой, против целевых клеток OPM-2 и RPMI-8226 в присутствии различных концентраций леналидомида (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида) или в отсутствие леналидомида. Фиг.3G показывает продуцирование цитокинов CAR+ Т-клетками+ анти-BCMA, полученными от трех здоровых доноров и одного пациента с множественной миеломой, против целевых клеток OPM-2 в присутствии различных концентраций леналидомида (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида) или в отсутствие леналидомида. Фиг.3H показывает продуцирование цитокинов CAR+ Т-клетками+ анти-BCMA полученными от трех здоровых доноров и одного пациента с множественной миеломой, против целевых клеток RPMI-8226 в присутствии различных концентраций леналидомида (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида) или в отсутствие леналидомида.

[0087] На Фиг.4А показано размножение CAR+Т-клеток анти-BCMA после повторной стимуляции в присутствии различных концентраций леналидомида.

[0088] На Фиг.4В показано размножение CAR+Т-клеток анти-BCMA после повторной стимуляции как в присутствии, так и в отсутствие леналидомида.

[0089] На Фиг.5А показаны отсчеты клеток (прогнозируемые удвоения популяции) CAR+ Т-клеток анти-BCMA от трех доноров в каждой временной точке при анализе повторной стимуляции в присутствии несущей среды или 0,1 мкМ леналидомида. “х” показывает Т-клетки недостаточные для повторного высевания при анализе. Фиг.5В показывает медианную интенсивность флуоресценции (MFI) CD25 (гейтированы живыми CD3<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>). Фиг.5С показывает продуцирование цитокинов, нормированное на количество посеянных клеток (верхняя и левая нижняя панели), и медианную интенсивность флуоресценции (MFI) CD25 (гейтированы живыми CD3<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>) (правая нижняя панель).

[0090] На Фиг.6А показано общее количество клеток CD3<sup>+</sup> в культуре в дни 2 и 7 после инкубирования CAR+Т-клеток анти-BCMA или Т-клеток, которые не экспрессируют CAR (имитация), в присутствии или в отсутствие леналидомида. Фигуры 6В и 6С показывают экспрессирование CD25<sup>+</sup> в Т-клетках CD4<sup>+</sup> (Фиг.6В) и CD8<sup>+</sup> (Фиг.6С) в культуре на дни 2 и 7 после инкубирования CAR+Т-клеток анти-BCMA или Т-клеток, которые не экспрессируют CAR (имитация) в присутствии или в отсутствие леналидомида.

[0091] На Фиг.7А показан объем опухоли у мышей в зависимости от времени после

введения низкой дозы CAR<sup>+</sup> Т-клеток анти-BCMA в присутствии и в отсутствие леналидомида.

[0092] На Фиг.7В показан процент выживания мышей, которым вводится низкая доза CAR<sup>+</sup> Т-клеток анти-BCMA, в присутствии и в отсутствие леналидомида. Для контрольных групп Т-клетки, которые не экспрессируют CAR (имитация), вводят в присутствии и в отсутствие леналидомида, а также вводят леналидомид без Т-клеток.

[0093] На Фиг.8А показаны уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых CAR<sup>+</sup> Т-клетками+ анти-BCMA и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в день 7 и 14. Фиг.8В показывает уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых CAR<sup>+</sup> Т-клетками CD4<sup>+</sup> анти-BCMA и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в дни 21 и 36. Фиг.8С показывает уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD8<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых CAR<sup>+</sup> Т-клетками+ анти-BCMA и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в день 7 и 14. Фиг.8D показывает уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD8<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых CAR<sup>+</sup> Т-клетками+ анти-BCMA и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в дни 21 и 36.

[0094] На Фиг.8Е показаны уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых Т-клетками не-CAR<sup>+</sup> и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в день 7 и 14. Фиг.8F показывает уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых Т-клетками не-CAR<sup>+</sup> и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в дни 21 и 36. Фиг.8G показывает уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD8<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых Т-клетками не-CAR<sup>+</sup> и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в день 7 и 14. Фиг.8H показывает уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD8<sup>+</sup> в крови от мышей, леченых Т-клетками не-CAR<sup>+</sup> и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами в дни 21 и 36.

[0095] На Фиг. 9А и 9В показаны результаты опухолевой нагрузки у мышей, леченых согласно Режиму А (LenA), при котором леналидомид вводится за один день до приема CAR<sup>+</sup> Т-клеток.

[0096] На Фиг.9С показана опухолевая нагрузка индивидуальной мыши до дня 53.

[0097] На Фиг.9D показаны результаты получения изображения опухоли в день 46 после введения клеток CAR<sup>+</sup> для индивидуальных мышей, принимающих более высокую дозу CAR<sup>+</sup> ( $1 \times 10^6$ ) вместе с леналидомидом, в день -1 (Len A). Фиг.9Е показывает результаты получения изображения опухоли в день 46 после введения клеток CAR<sup>+</sup> для индивидуальных мышей, принимающих более высокую дозу CAR<sup>+</sup> ( $1 \times 10^6$ ) без леналидомида, в день -1 (Len A).

[0098] На Фиг. 9F и 9G показаны результаты опухолевой нагрузки мышей, леченых в Режиме В (LenB), при котором введение леналидомида начинается в день 14 после введения CAR<sup>+</sup>Т.

[0099] На Фиг.9H показана опухолевая нагрузка индивидуальных мышей до дня 53.

[0100] На Фиг.9I показаны результаты получения изображения опухоли (день 46 после введения клеток CAR<sup>+</sup>) для индивидуальных мышей, принимающих более высокую

дозу CAR+ ( $1 \times 10^6$ ) вместе с леналидомидом, в день -1 (Len A). Фиг.9J показывает результаты получения изображения опухоли (день 46 после введения клеток CAR+) для индивидуальных мышей, принимающих более высокую дозу CAR+ ( $1 \times 10^6$ ) без леналидомида, в день -1 (Len A).

[0101] На Фиг. 10A-10D показана выживаемость мышей в присутствии или в отсутствие леналидомида. Леналидомид вводят в Режиме А (Len A; введение леналидомида начинается в день -1) или в Режиме В (Len B; введение леналидомида начинается в день 14) в комбинации с низкими ( $5 \times 10^5$  или  $5e^5$ ) или высокими ( $1 \times 10^6$  или  $1e^6$ ) дозами CAR+ Т-клеток. Для контрольных групп, Т-клетки, которые не экспрессируют CAR (имитация), вводят в присутствии и в отсутствие леналидомида, как в Режиме А, так и в Режиме В, и леналидомид без Т-клеток также вводят как в Режиме А, так и в Режиме В.

[0102] На Фиг.10E показаны результаты оценки опухолевой нагрузки для мышей, принимающих более высокую дозу CAR+ ( $1 \times 10^6$ ) и получающих ежедневное внутривентральное введение 10 мг/кг леналидомида или контроля несущей среды, начинающееся либо в день -1 (за один день до введения CAR-T) (одновременно, леналидомид (леналидомид (C)) или несущая среда (несущая среда (C)) или в день 14 после введения клеток CAR-T (или имитации) (замедленное введение леналидомида (D)). Результаты показаны до дня 60, как анализируется с помощью биоломинесценции, измеряемой с помощью проточной цитометрии. Фиг.10F показывает процент выживших мышей в присутствии или в отсутствие леналидомида. Фигуры 10G и 10H показывают анализ с помощью проточной цитометрии имитационных контрольных клеток и CAR-T-клеток в крови мышей в дни 8, 14, 22 и 28 после инъекции CAR-T-клеток от двух доноров.

[0103] На Фиг.11 показано количество Т-клеток CD8+ и CD4+ в культурах CAR+Т-клеток анти-CD19, стимулируемых с помощью субоптимальной концентрации анти-CD3 в присутствии и в отсутствие леналидомида.

[0104] На Фиг.12A показано количество CAR+ Т-клеток/CD3+ в периферической крови, измеренное в определенных временных точках после вливания, у субъектов, сгруппированных по наилучшему общему ответу.

[0105] На Фиг.12B показаны уровни CAR+ Т-клеток/CD3+ в периферической крови, измеренные в определенных временных точках после вливания, у субъектов, которые реализуют ответ, сгруппированных по продолжению ответа через 3 месяца.

[0106] На Фиг. 12C-2D показаны уровни CAR+ Т-клеток/CD4+ и CAR+/CD8+ в периферической крови, измеренные в определенных временных точках после вливания, у субъектов, которые реализуют ответ, сгруппированных по продолжению ответа через 3 месяца.

[0107] На Фиг.13A показано количество Т-клеток CD3+/CAR+, CD4+/CAR+, CD8+/CAR+ в периферической крови субъекта с не поддающейся химиотерапии трансформированной DLBCL, измеренное в определенных временных точках. Фиг.13B изображает аксиальное изображение ПЕТ-СТ до лечения, показывающее интракраниальную аномалию в правой средней черепной ямке и обширную аномалию в

подкожных тканях в правой задней аурикулярной области. Фиг.13С представляет собой изображение PET-СТ после лечения, изображающее разрешение аномалии на Фиг.13В после лечения CAR+ Т-клетками+ анти-CD19. Фиг.13D представляет собой MRI головного мозга до лечения (T<sub>1</sub>-взвешенное изображение высокого разрешения с использованием контрастного материала; аксиальный вид), показывающий гомогенное увеличение массы в правой средней черепной ямке. Фиг.13Е представляет собой изображение MRI после лечения, показывающее почти полное разрешение увеличения массы. Фиг.13F представляет собой аксиальное изображение PET-СТ при рецидиве, показывающее повторное появление опухоли в правой задней аурикулярной области, связанное с интенсивным поглощением <sup>18</sup>F-фтордезоксигликозы (стрелка). Фиг.13G представляет собой изображения PET-СТ, показывающие разрешение опухоли в задней аурикулярной области после инцизионной биопсии и повторное размножение CAR+ Т-клеток.

[0108] На Фиг.14 показан уровень вариабельных целевых клеток в течение периода приблизительно 120 часов, когда CAR+ Т-клетки анти-CD19 инкубируются вместе с эффекторными клетками K562-CD19 при отношении эффекторных клеток к целевым (Е:Т) 5:1 в присутствии или в отсутствие 1 нМ, 5 нМ, 60 нМ, 550 нМ или 5000 нМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (контроль).

[0109] На Фиг.15А показаны уровни экспрессирования CD25+ в Т-клетках, как CD4+, так и CD8+, когда CAR+ Т-клетки анти-CD19 инкубируются вместе с эффекторными клетками K562-CD19 в присутствии леналидомида или альтернативного соединения, нацеленного на киназу.

[0110] На Фиг.15В показаны уровни экспрессирования CD25+ в Т-клетках, как CD4+, так и CD8+, когда CAR+ Т-клетки анти-CD19 инкубируются вместе с эффекторными клетками PD-1 в присутствии леналидомида или альтернативного соединения, нацеленного на киназу.

[0111] На Фиг.16 показано количество IL-10 в супернатантах культур после инкубирования CAR+ Т-клеток анти-CD19 вместе с эффекторными клетками K562-CD19 при отношении эффекторных клеток к целевым (Е:Т) 3:1 или 9:1 в присутствии или в отсутствие различных концентраций леналидомида.

[0112] На Фиг.17А показано кратное изменение количества клеток после стимуляции CAR+ Т-клеток анти-CD19 от двух доноров (pt 1 и pt 2) эффекторными клетками K562-CD19 в присутствии или в отсутствие 1 мкМ леналидомида или 50 нМ или 500 нМ альтернативного соединения, нацеленного на киназу. Фиг.17В показывает количество удвоений клеток по сравнению с начальным количеством после 2-ой и 4-ой стимуляции.

[0113] На Фиг.18А показана цитолитическая активность CAR+ Т-клеток анти-CD19 от двух донорных клеток (pt 1 и pt 2), повторно стимулируемых клетками K562-CD19 (мечеными с NucLight Red (NLR)), и в присутствии 1 мкМ леналидомида или 50 нМ или 500 нМ альтернативного соединения, нацеленного на киназу.

[0114] На Фиг.18В показан процент уничтожения целевых клеток для CAR+ Т-

клеток анти-CD19 от двух донорных клеток (1 или 2), повторно стимулируемых клетками K562-CD19, по сравнению с контролем только с несущей средой (считается за 100%).

[0115] На Фиг.19А показан график - гистограмму окрашивания СТВ клеток в целом в композиции CAR+ Т-клеток анти-ВСМА после инкубирования вместе с шариками (200 мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков) при отношении Т-клеток к шарикам 1:1 и в присутствии или в отсутствие 5 мкМ леналидомида.

[0116] На Фиг.19В и Фиг.19С показаны гистограммы проточной цитометрии для CD25 в Т-клетках CD4+ (левая панель) или Т-клетках CD8+ (правая панель), присутствующих в композиции CAR+ Т-клеток анти-ВСМА после инкубирования вместе с шариками (200 мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков), при отношении Т-клеток к шарикам или к иммобилизованным анти-CD3 1:1, соответственно, в присутствии или в отсутствие леналидомида.

[0117] На Фиг. 20А-20I показаны графики, показывающие уровни факторов транскрипции и маркеров активирования в Т-клетках CD4+ или на них (левые панели) или в Т-клетках CD8+ или на них (правые панели), присутствующих в композиции CAR+ Т-клеток анти-ВСМА после инкубирования без стимуляции или вместе с различными количествами ВСМА-конъюгированных шариков или шариков, конъюгированных с анти-CD3 и с анти-CD28, и в присутствии 0 мкМ, 0,5 мкМ или 50 мкМ леналидомида. Показаны уровни Blimp1 (Фиг.20А), CD25 (Фиг.20В), CD31 (Фиг.20С), PD-1 (Фиг.20D), Tbet (Фиг.20Е), EOMES (Фиг.20F), GATA3 (Фиг.20G), Helios (Фиг.20H) и Ikaros (Фиг.20I). 200 ВСМА, 50 ВСМА и 5 ВСМА показывают ВСМА-конъюгированные шарики, генерируемые посредством инкубирования ВСМА вместе с шариками в количестве 200, 50 и 5 мкг ВСМА приблизительно на  $4 \times 10^8$  шариков, соответственно.

[0118] На Фиг.21А-С показаны графики, показывающие уровни внеклеточного IFN-гамма (Фиг.21А), IL-2 (Фиг.21В) и TNF альфа (Фиг.21С) из культур после инкубирования композиции CAR+ Т-клеток анти-ВСМА вместе с двумя различными количествами ВСМА-конъюгированных шариков в присутствии или в отсутствие 5 мкМ леналидомида. 50 мкг ВСМА и 5 мкг ВСМА показывают ВСМА-конъюгированные шарики, генерируемые посредством инкубирования ВСМА вместе с шариками, в количестве 50 и 5 мкг ВСМА приблизительно на  $4 \times 10^8$  шариков, соответственно.

[0119] На Фиг.21D показан график, показывающие уровни внеклеточного IL-2 из культур после инкубирования вместе с композицией CAR+ Т-клеток анти-ВСМА от двух различных доноров с различными количествами ВСМА-конъюгированных шариков в присутствии 0 мкМ, 1 мкМ или 5 мкМ леналидомида. 200 ВСМА и 5 ВСМА показывают ВСМА-конъюгированные шарики, генерируемые посредством инкубирования ВСМА вместе с шариками, в количестве 200 мкг и 5 мкг ВСМА приблизительно на  $4 \times 10^8$  шариков, соответственно.

[0120] На Фиг.21Е и Фиг.21F показаны общие отсчеты клеток после культивирования композиции CAR+ Т-клеток анти-ВСМА после инкубирования в течение 4 дней (Фиг.21Е) или 7 дней (Фиг.21F) вместе с различными количествами ВСМА-

конъюгированных шариков, в присутствии 5 мкМ леналидомида. 50 ВСМА и 5 ВСМА показывают ВСМА-конъюгированные шарики, генерируемые посредством инкубирования антигена ВСМА вместе с шариками, в количестве 50 мкг и 5 мкг ВСМА приблизительно на  $4 \times 10^8$  шариков, соответственно.

[0121] На Фиг.21G показаны графики - гистограммы окрашивания CTV T-клеток CD4+ или T-клеток CD8+ в композиции CAR+ T-клеток анти-ВСМА после инкубирования в течение 4 или 7 дней вместе с ВСМА-конъюгированными шариками в присутствии 5 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (несущая среда).

[0122] На Фиг.21H и 21I показаны графики, показывающие процент T-клеток положительных относительно суррогатного маркера EGFRt, как определяется с помощью антитела анти-EGFR после инкубирования композиции CAR+ T-клеток анти-ВСМА в течение 4 дней (Фиг.21H) или 7 дней (Фиг.21I) вместе с различными количествами ВСМА-конъюгированных шариков, в присутствии 5 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (несущая среда). "50" и "5" показывают шарики, генерируемые посредством инкубирования ВСМА вместе с шариками, в количестве 50 мкг и 5 мкг ВСМА приблизительно на  $4 \times 10^8$  шариков, соответственно.

[0123] На Фиг.21J показан процент гибели клеток для целевых клеток RPMI-8226 под действием эффекторных клеток CAR+ T-клеток анти-ВСМА, которые инкубируют вместе с различными количествами ВСМА-конъюгированных шариков, в присутствии 5 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (несущая среда). Показана цитолитическая активность композиций, содержащих эффекторные клетки и целевые клетки в отношении 3:1 или 1:1, и дополнительно, в присутствии или в отсутствие леналидомида. "50" и "5" показывают ВСМА конъюгированные шарики, генерируемые посредством инкубирования ВСМА вместе с шариками, в количестве 50 и 5 мкг ВСМА приблизительно на  $4 \times 10^8$  шариков, соответственно.

[0124] На Фиг.22A показан анализ с помощью проточной цитометрии фосфорилированного STAT5 после 2 часов стимуляции CAR (stim) 50 мкг ВСМА шариков. Контроль без стимуляции показан точечной линией. Фиг.22B показывает анализ с помощью проточной цитометрии уровней внутриклеточных цитокинов на репрезентативных CAR T нормальных доноров после 24 часов стимуляции шариками с ВСМА (гейтированы на трансдуцированных живых CD3+).

[0125] На Фиг.23A-23B показаны результаты анализа серийной повторной стимуляции композиций CAR+T-клеток анти-ВСМА, которые инкубируют в течение семи дней вместе с ВСМА-конъюгированными шариками (50 мкг/мл). Показаны результаты для композиций от трех различных доноров. Фиг.23A и Фиг.23B показывают цитолитическую активность CAR+ T-клеток анти-ВСМА в каждой из временных точек для двух различных доноров.

[0126] На Фиг.24A показаны результаты антиген-специфичной цитолитической активности CAR и Фиг.24B показывает результаты продуцирования цитокинов для CAR+T-клеток анти-ВСМА, которые предварительно стимулируют шариками ВСМА (в

сравнении со свежееоттаявшими (не стимулируемыми предварительно) CAR+ Т-клетками анти-BCMA в совместных культурах, сравнивая клетки, культивируемые в присутствии и в отсутствие леналидомида. Фиг.24С показывает общую жизнеспособность и отсчеты клеток, оцениваемые для трех доноров Т-клеток CAR анти-BCMA. Фиг.24D показывает результаты анализа с помощью проточной цитометрии поверхностного экспрессирования CD25 и PD-1 (среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), для CAR+Т-клеток анти-BCMA CD4+ или CD8+ после стимуляции (до лечения) шариками BCMA в течение 7 дней, в присутствии или в отсутствие 1 мкМ леналидомида. Фиг.24Е показывает анализ среди доноров с помощью проточной цитометрии CAR+Т-клеток для медианной интенсивности флуоресценции (MFI; CD25 и Tim3) или процента положительных PD-1 и Lag3 на поверхности маркеров Т-клеток в подмножествах CAR+ CD4+ и CAR+ CD8+ (гейтированы живыми клетками CD3+). Показанные значения представляют собой процентный фон (Veh) MFI, жизнеспособность или отсчеты.

[0127] На Фиг.25А показан анализ продуцирования эффекторных цитокинов после CAR-специфичной стимуляции на 50 мкг шариков BCMA в течение 24 часов в присутствии 1 мкМ леналидомида в сравнении с фоновым (несущая среда) ответом для каждого из трех доноров.

[0128] На Фиг.25В показаны воздействия CAR+Т-клеток анти-BCMA, активируемых шариками BCMA при различных концентрациях (то есть, 5 мкг, 50 мкг и 200 мкг) в присутствии или в отсутствие леналидомида (0,1 мкМ или 1 мкМ) на продуцирование цитокинов эффекторными CAR+ Т-клетками.

[0129] На Фиг.25С показано продуцирование цитокинов CAR+ Т-клетками анти-BCMA, полученными от репрезентативных здоровых доноров и пациентов с множественной миеломой, стимулированных шариками BCMA с добавлением PD-L1 на шарики или без него, в присутствии 1 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида.

[0130] На Фиг. 26А и 26В показаны результаты анализа главных компонентов (PCA) для экспрессирования генов (на основе результатов РНК-seq; Фиг.26А) и доступности хроматина (на основе результатов АТАС-seq; Фиг.26В), в CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-BCMA, генерируемых от 4 различных доноров (Доноры 1-4), стимулируемых BCMA-конъюгированными шариками в течение 24 часов (24 час+stim) или 7 дней (d7+stim) или культивируемых без стимуляции в течение 24 часов (24 час) в присутствии или в отсутствие леналидомида.

[0131] На Фиг. 27А и 27В показаны вулканские диаграммы, изображающие статистическую значимость экспрессирования ( $\log_{10}$  установленного р-значение) с  $\log_2$  кратным изменением экспрессирования генов, включая гены или пики, которые показывают повышенное (правая сторона) или пониженное (левая сторона) экспрессирование у CAR+ Т-клеток, стимулируемых BCMA-конъюгированными шариками, в течение 24 часов (24 час+stim, Фиг.27А) или 7 дней (d7+stim, Фиг.27В), в присутствии или в отсутствие леналидомида. Таблицы показывают количество генов или пиков, которые показывают статистически значимое увеличение (up) или уменьшение

(down) экспрессирования.

[0132] На Фиг. 27С и 27D показаны вулканные диаграммы, изображающие статистическую значимость экспрессирования ( $\log_{10}$  установленного р-значение) с  $\log_2$  кратным изменением доступности хроматина G, включая гены или пики, которые показывают повышенную (правая сторона) или пониженную (левая сторона) доступность, у CAR+ Т-клеток, стимулируемых ВСМА-конъюгированными шариками, в течение 24 часов (24 час+stim, Фиг.27С) или 7 дней (d7+stim, Фиг.27D). Таблицы показывают количество генов или пиков, которые показывают статистически значимое увеличение (up) или уменьшение (down) доступности.

[0133] На Фиг. 28А и 28В показаны направленность и значимость экспрессирования для генов в путях передачи биологических сигналов, которые обогащены наборами генов, экспрессирование которых статистически значимо понижается или повышается у CAR+ Т-клеток, стимулируемых ВСМА-конъюгированными шариками, в течение 24 часов (24 час+stim, Фиг.28А) или 7 дней (d7+stim, Фиг.28В).

[0134] На Фиг.29 показан график, сравнивающий пики индивидуальной доступности хроматина (ромбы) и изменения средней доступности хроматина для каждого гена (кружки), при изменениях экспрессирования генов, для выбранных генов, вовлеченных в активирование и передачу сигналов Т-клеток.

[0135] На Фиг.30 показан анализ обогащения мотивов,  $\log$  р-значение для обогащения, преобладание и факторы транскрипции, которые, согласно предсказаниям, должны связывать мотивы для пиков с повышенной доступностью в присутствии леналидомида в культурах в день 7.

[0136] На Фиг. 31А-31С показан анализ с помощью проточной цитометрии внутриклеточного экспрессирования Ikaros или Aiolos, как в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4+ анти-CD-19 так и в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD8+ анти-CD-19. CAR-экспрессирующие Т-клетки стимулируют антиидиотипическим антителом CAR-Т при 5 мкг/мл (Фиг.31А-В) или 1 мкг/мл (Фиг.31С), обработанными леналидомидом или Соединением 1 в некотором диапазоне концентраций. Значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) для Ikaros и Aiolos нормируют и вычисляют как процент относительно контроля с несущей средой.

[0137] На Фиг. 32А и 32В показан анализ продуцирования цитокинов у CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 в присутствии Соединения 1 (Фиг.32А) или леналидомида (Фиг.32В) после инкубирования вместе с целевыми клетками. Мультиплексный анализ цитокинов супернатантов осуществляют через 24 часа из лунок в трех повторах от CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19, культивируемых совместно с целевыми клетками K562.CD19, в присутствии Соединения 1 или леналидомида при нескольких концентрациях. Концентрации IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  определяют для CAR-экспрессирующих Т-клеток от трех разных доноров для двух отношений Е:Т. Данные представляют собой среднее значение +/- S.D. (среднеквадратичное отклонение) по 3 экспериментам.

[0138] На Фиг. 33А-33D показан анализ цитолитической функции или продуцирования цитокинов CAR-экспрессирующими Т-клетками анти-CD19 в присутствии Соединения 1 или леналидомида после инкубирования вместе с целевыми клетками. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех разных доноров совместно культивируют с целевыми клетками K562.CD19 (Фиг.33А) или Granta-519 или клетками Raji (Фиг. 33В-33D) в трех повторах при двух отношениях Е:Т в присутствии Соединения 1 или леналидомида в течение 5 дней. Результаты вычисляют как нормированный показатель уничтожения. Данные представляют собой среднее значение +/- S.D. (среднеквадратичное отклонение) по 3 экспериментам.

[0139] На Фиг. 34А-34D показан анализ продуцирования цитокинов у CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 или фосфорилирования STAT5 в присутствии Соединения 1 (Фиг.34А и Фиг.34С) или леналидомида (Фиг.34В) после стимуляции антиидиотипическим антителом. Мультиплексный анализ цитокинов супернатантов осуществляют через 24 часа из лунок в трех повторах CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 совместно вместе с агонистическим антиидиотипическим антителом в присутствии 100 или 1000 нМ Соединения 1 (Фиг.34А и Фиг.34С-34D) или 500 или 5000 нМ леналидомида (Фиг.34В). Концентрации IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  (Фигуры 34А-34С) и медианную интенсивность флуоресценции фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) (Фиг.34D) определяют для CAR-экспрессирующих Т-клеток от трех разных доноров. Данные представляют собой среднее значение +/- S.D. (среднеквадратичное отклонение) по 3 экспериментам.

[0140] На Фиг. 35А и 35В показан анализ поверхностного экспрессирования маркеров на CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4+ анти-CD-19 (Фиг.35А) и CAR-экспрессирующих Т-клетках CD8+ анти-CD-19 (Фиг.35В) в присутствии Соединения 1 после стимуляции антиидиотипическим антителом. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех различных доноров стимулируют антиидиотипическим антителом при 0, 0,3, 3 или 30 мкг/мл в присутствии 100 или 1000 нМ Соединения 1. Клетки анализируют с помощью проточной цитометрии в день 4. Вычисляют абсолютное изменение медианной интенсивности флуоресценции по отношению к контролю с несущей средой для каждой концентрации антиидиотипического антитела. Данные представляют 3 эксперимента.

[0141] На Фиг. 36А и 36В показан анализ поверхностного экспрессирования маркеров на CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4+ анти-CD-19 (Фиг.36А) и CAR-экспрессирующих Т-клетках CD8+ анти-CD19 (Фиг.36В) в присутствии леналидомида после стимуляции антиидиотипическим антителом. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех разных доноров стимулируют антиидиотипическим антителом при 0, 0,3, 3 или 30 мкг/мл в присутствии 500 или 5000 нМ леналидомида. Клетки анализируют с помощью проточной цитометрии в день 4. Вычисляют абсолютное изменение медианной интенсивности флуоресценции по отношению к контролю с несущей средой для каждой концентрации антиидиотипического антитела. Данные представляют 3 эксперимента.

[0142] На Фиг. 37А и 37В показан анализ поверхностного экспрессирования CD28

на CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> анти-CD19 в присутствии Соединения 1 (Фиг.37А) или леналидомида (Фиг.37В) после серийной стимуляции. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех различных доноров стимулируют K562.CD19 при отношении Е:Т 2,5:1 каждые 3-4 дня в присутствии Соединения 1 (Фиг.37А) или леналидомида (Фиг.37В). Процент Т-клеток положительных относительно CD28 измеряют с помощью проточной цитометрии в день 28.

[0143] На Фиг.38 показан анализ цитолитической функции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 в присутствии Соединения 1 или леналидомида после серийной стимуляции. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех разных доноров через 24 дня серийной стимуляции совместно культивируют вместе с облученными целевыми клетками K562.CD19 в трех повторах при двух отношениях Е:Т в присутствии Соединения 1 или леналидомида. Результаты вычисляют как нормированный показатель гибели.

[0144] На Фиг. 39А и 39В показан анализ удвоений популяции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 в ходе 28-дневного периода серийной стимуляции в присутствии или в отсутствие Соединения 1. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех разных доноров стимулируют целевыми клетками K562.CD19 при отношении Е:Т 2,5:1 или 10:1 каждые 3-4 дня в присутствии 500 нМ Соединения 1 в течение 28 дней (представлено на оси x). Клетки считают после каждой стимуляции и вычисляют удвоение клеток. (Фиг.39А) Процент изменения удвоений клеток в день 24 серийной стимуляции в присутствии 10 нМ, 100 нМ или 500 нМ Соединения 1 показан на Фиг.39В. Данные представляют среднее значение +/- S.E.M (стандартная погрешность) для обработок в трех повторах от 3 доноров. Каждая стрелка представляет временную точку повторной стимуляции.

[0145] На Фиг. 40А и 40В показан анализ удвоений популяции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 28-дневного периода серийной стимуляции в присутствии или в отсутствие леналидомида. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех разных доноров стимулируют целевыми клетками K562.CD19 при отношении Е:Т 2,5:1 или 10:1 каждые 3-4 дня в присутствии 1000 нМ леналидомида в течение 28 дней (представлено на оси x). Клетки считают после каждой стимуляции и вычисляют удвоение клеток. (Фиг.40А) Процент изменения удвоений клеток в день 24 серийной стимуляции в присутствии 100 нМ или 1000 нМ леналидомида показан на Фиг.40В. Данные представляют среднее +/- S.E.M (стандартная погрешность) для обработок в трех повторах от 3 доноров. Каждая стрелка представляет временную точку повторной стимуляции.

[0146] На Фиг.41 показан анализ антиопухолевой эффективности CAR-экспрессирующих Т-клеток в комбинации с Соединением 1, как показано с помощью процента выживания. Мышам NOD.Cg.Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) делают внутривенную (i.v.) инъекцию  $0,5 \times 10^6$  клеток опухоли лимфомы Raji и дают возможность для осуществления прививки опухоли в течение 6 дней. В день 7, мыши либо не получают лечения, либо получают одну i.v. инъекцию CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19. В одной группе исследования (обозначается “Одновременно”), мышам вводят либо

Соединение 1, либо контроль с несущей средой за один день до введения CAR-экспрессирующих клеток (день 6), это продолжается один ежедневно в ходе исследования. Во второй группе (обозначается “Замедленное”), мышам вводят либо контроль с несущей средой, либо Соединение 1 начиная с дня 14, это происходит после появления пика размножения CAR-экспрессирующих Т-клеток и введение продолжают один ежедневно в течение исследований. Выживаемость мышей оценивают и сравнивают до дня 100 после вливания CAR-экспрессирующих Т-клеток.

[0147] На Фиг.42 показан анализ передачи сигналов CAR в присутствии Соединения 1. Уровень экспрессирования dTomato в репортерных клетках Jurkat Nur77-dTomato, экспрессирующих либо CAR анти-CD19, либо CAR анти-ROR1, как детектируется с помощью проточной цитометрии, измеряют после инкубирования в присутствии Соединения 1 или контроля с несущей средой в течение до 6 часов.

[0148] На Фиг. 43А-43М показан анализ цитолитической функции и анализ экспрессирования генов CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 в присутствии Соединения 1 или контроля с несущей средой, после продолжительной стимуляции. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 подвергаются воздействию условий хронической стимуляции, они инкубируются вместе с иммобилизованным на чашке антиидиотипическим антителом (анти-ID) в течение периода 5 или 6 дней. После 5 или 6-дневного периода культивирования, CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 удаляют из культуры и инкубируют вместе с опухолевыми сфероидами CD19+ в присутствии Соединения 1, при концентрациях в диапазоне от 0,001 мкМ до 10 мкМ или контроля с несущей средой, в течение до 10 дней. Свежеоттаявшие CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19, которые не подвергаются воздействию хронических стимулирующих условий, инкубируют вместе с опухолевыми сфероидами параллельно как контроли. Клетки оценивают в различные моменты времени на цитолитическую функцию (Фигуры 43А, 43Е и 43F), уменьшение объема опухоли (Фигуры 43В, 43С правая панель, 43D, 43F, 43G и 43H), количество CAR+Т-клеток (Фиг.43I) и продуцирование цитокинов (Фиг.43С левая панель и 43J). Фиг.43К показывает графики  $\log_2$  кратного изменения ( $\log_2FC$ ) экспрессирования генов в CAR+ Т-клетках анти-CD19, как после продолжительной стимуляции, так и после инкубирования вместе с Соединением 1 по отношению к контролю с хронической стимуляцией (ось y), в сравнении с экспрессированием генов в CAR+ Т-клетках+ анти-CD19, которые хронически стимулируют, и с клетками, которые не стимулируют, при анализе долговременной стимуляции (ось x). Фиг.43L показывает график  $\log_2$  кратного изменения для Соединения 1 (ось y) по сравнению с отсутствием Соединения 1 (ось x). Фиг.43М показывает анализ пути KEGG для данных РНК-seq CAR-Т.

[0149] На Фиг. 44А-44F показана цитолитическая функция и анализ экспрессирования генов CAR-экспрессирующих Т-клеток, подвергающихся долговременной стимуляции в присутствии Соединения 1 или леналидомида или контроля с несущей средой или IL-2, для сравнения. Экспрессирование генов анализируют с помощью РНК-seq на образцах кДНК, полученных из РНК, выделенной из долговременно

стимулируемых CAR-экспрессирующих Т-клеток или на CAR-экспрессирующих Т-клетках, которые не подвергаются долговременной стимуляции. Вычисляют дифференциальное экспрессирование (DE) на основе воздействий обработки (долговременная стимуляция по сравнению с отсутствием долговременной стимуляции), для долговременной стимуляции в присутствии соединения (например, Соединения 1 или леналидомида) или ИЛ-2 или контроля с несущей средой. Фиг.44А показывает графики  $\log_2$  кратного изменения ( $\log_2FC$ ) экспрессирования генов в CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-CD19 после долговременной стимуляции, в присутствии Соединения 1 или ИЛ-2, по отношению к контролю с хронической стимуляцией (ось y), по сравнению с экспрессированием генов в CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-CD19, которые хронически стимулируют и сравнивают с клетками, которые не стимулируют, при анализе долговременной стимуляции (ось x). Фиг.44В показывает график  $\log_2$  кратного изменения для Соединения 1 (ось y) по сравнению с отсутствием Соединения 1 (ось x). На Фигурах 44А и 44В идентифицируются гены с повышенным или пониженным экспрессированием. Фиг.44С показывает оценки обогащения набора генов для генов, показывающих повышенное или пониженное экспрессирование в присутствии Соединения 1. Фиг.44D показывает анализ пути KEGG по данным РНК-seq для CAR-Т. Клетки оценивают в различные моменты времени на цитолитическую функцию (Фиг.44Е) и продуцирование цитокинов (Фиг.44F).

[0150] На Фиг. 45А-45D показана цитолитическая функция и продуцирование цитокинов для CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 от трех доноров, стимулируемых при условиях индуцирования хронической стимуляции либо в присутствии (одновременно) или с последующей обработкой (сохранение), с помощью 0,1 мкМ и 1 мкМ Соединения 1 или контроля с несущей средой или для рекомбинантного ИЛ-2 (для сравнения), совместно культивируемых посредством инкубирования вместе с опухолевыми сфероидами Granta-519. Размер опухолевого сфероида измеряют в день 9 для Т-клеток при одновременной (Фиг.45А) или последующей (Фиг.45В) обработке Соединением 1 и концентрации цитокинов из супернатантов, собранных в день 5, измеряют для Т-клеток при одновременной (Фиг.45С) или последующей (Фиг.45D) обработке Соединением 1.

[0151] На Фиг.46 показано внутриклеточное экспрессирование Ikaros и Aiolos в стимулируемых CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-CD19 после инкубирования вместе с различными концентрациями Соединения 1 или Соединения 2.

[0152] На Фиг.47А показана пролиферация CAR+Т-клеток анти-CD19 для трех доноров (среднее  $\pm$  SEM) в присутствии различных концентраций Соединения 1 или Соединения 2. Фиг.47В показывает воздействие различных концентраций Соединения 1 или Соединения 2 на жизнеспособность клеток, когда стимуляцию осуществляют с помощью 3 мкг/мл анти-ID (левая панель) или 30 мкг/мл анти-ID (правая панель). Фиг.47С показывает анализ клеточного цикла CAR+Т-клеток анти-CD19 после обработки 1000 нМ Соединения 1 или 100 нМ Соединения 2. Фиг.47D показывает процент CAR+Т-клеток анти-CD19 в фазе клеточного цикла G1 при экспонировании для Соединения 1 или Соединения

2 при различных концентрациях. Фиг.47Е показывает уровни экспрессирования внутриклеточных цитокинов для  $IFN\gamma$ , перфорина, гранзима В и IL-2 в Т-клетках CAR анти-CD19, которые стимулируют в течение 24 часов или 72 часов 30 мкг/мл анти-ID и экспонируют для Соединения 1 или Соединения 2.

[0153] На Фиг.48А показано экспрессирование Ikaros в CAR+ Т-клетках анти-CD19, которые подвергаются хронической стимуляции в присутствии Соединения 2 (10 нМ или 100 нМ). Фиг.48В показывает цитолитическую активность, как измерено посредством количества клеток опухоли в зависимости от времени, для хронически стимулируемых клеток, которые одновременно инкубируются в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ или 0,01 мкМ), по сравнению с отсутствием соединения (контроль) перед повторным провоцированием CD19-экспрессирующими целевыми клетками. Фиг.48С показывает размер опухолевых сфероидов Granta-519 в различные моменты времени после совместного культивирования вместе с 1 мкМ Соединения 1 (левая панель) или 0,001 мкМ или 0,01 мкМ Соединения 2 (правая панель). Фиг.48D показывает средний объем опухоли для опухолевых сфероидов Granta-519 через 9 дней в присутствии Соединения 2. Фиг.48Е показывает уровни цитокинов  $IFN\gamma$ , IL-2 и TNFальфа измеренные из супернатанта хронически стимулируемых CAR+Т-клеток анти-CD19, которые совместно культивируют в течение 5 дней вместе с опухолевыми сфероидами CD19 и обрабатывают Соединением 1 или Соединением 2.

[0154] На Фиг.49А показано воздействие Соединения 2 (0,001 мкМ или 0,01 мкМ) на цитолитическую активность клеток K562, трансдуцированных CD19 (K562.CD19) клеток Raji или клеток Granta-519. Фиг.49В показывает усредненное измерение размеров опухолевых сфероидов Granta-519 в день 9 после совместного культивирования с CAR+ Т-клетками. Фиг.49С показывает измеренные уровни цитокинов  $IFN\gamma$ , IL-2 и TNFальфа из супернатанта хронически стимулируемых CAR+Т-клеток анти-CD19, которые совместно культивируют в течение 5 дней вместе с опухолевыми сфероидами CD19 и обрабатывают Соединением 1 или Соединением 2.

[0155] На Фиг.50В показано усредненное измерение размеров опухолевых сфероидов A549.CD19 в день 9 после совместного культивирования вместе с клетками CAR-Т в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ). Фиг.50В показывает измеренные уровни цитокинов  $IFN\gamma$ , IL-2 и TNFальфа из супернатанта хронически стимулируемых CAR+Т-клеток анти-CD19, которые совместно культивируют в течение 5 дней вместе с опухолевыми сфероидами CD19 и обрабатывают Соединением 1 или Соединением 2. Фиг.50С показывает количество CAR+Т-клеток в совместных культурах с опухолевыми сфероидами A549.CD19, измеренное в день 5, при обработке Соединением 2 (0,01 мкМ или 0,1 мкМ).

[0156] На Фиг.51А показана цитолитическая активность, как измерено с помощью количества клеток опухоли для клеток опухоли RL CD19+, культивируемых совместно с CAR+ Т-клетками анти-CD19 в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ). Фиг.51В показывает Фиг.51С показывает размер опухоли для опухолевых сфероидов

RL, культивируемых совместно с CAR+ Т-клетками анти-CD19 в присутствии Соединения 1 (1 мкМ) или Соединения 2 (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ).

[0157] На Фиг.52 показана жизнеспособность и отсчеты CAR+Т-клеток анти-BCMA от трех доноров в присутствии леналидомида (1000 нМ) или Соединения 2 (0,1 нМ, 1 нМ или 10 нМ) через 7 дней.

[0158] На Фиг.53А показана цитолитическая активность CAR+Т-клеток анти-BCMA от трех доноров в ходе долговременной стимуляции в присутствии леналидомида (1000 нМ) или Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ). Фигуры 53В-Д показывают продуцирование IFN-гамма (Фиг.53В), IL-2 (Фиг.53С) и TNF-альфа (Фиг.53Д) в CAR+ Т-клетках анти-BCMA от трех доноров в ходе долговременной стимуляции в присутствии леналидомида (1000 нМ) или Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ).

[0159] На Фиг.54 показана цитолитическая активность CAR+Т-клеток анти-BCMA от трех доноров в ходе хронической стимуляции в течение 7 дней BCMA-конъюгированными шариками, повторно провоцируемых BCMA-экспрессирующими клетками RPMI-8226 MM в присутствии Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ). Фигуры 54В-Д показывают продуцирование IFN-гамма (Фиг.54В), IL-2 (Фиг.54С) и TNF-альфа (Фиг.54Д) в CAR+ Т-клетках анти-BCMA от трех доноров в ходе хронической стимуляции в присутствии Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ).

[0160] На Фиг.55 показана цитолитическая активность CAR+Т-клеток анти-BCMA от трех доноров в ходе хронической стимуляции в течение 7 дней BCMA-конъюгированными шариками в присутствии резистентной к IMiD/CELMoD линии клеток DF-15R и Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ). Фигуры 55В-Д показывают продуцирование IFN-гамма (Фиг.55В), IL-2 (Фиг.55С) и TNF-альфа (Фиг.55Д) в CAR+ Т-клетках анти-BCMA от трех доноров в ходе хронической стимуляции в присутствии резистентной к IMiD/CELMoD линии клеток DF-15R и Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ).

### **Подробное описание**

[0161] В настоящем документе предлагается комбинированная терапия, включающая введение иммунотерапии, включающей функцию или активность Т-клеток, такой как Т-клеточная терапия, и иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3-убиквитинлигазы. В некоторых аспектах, предлагаемые способы усиливают или модулируют пролиферацию и/или активность Т-клеток, ассоциируемую с введением иммунотерапии или иммунотерапевтического агента, такого как композиция, содержащая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия включает введение иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог талидомида и/или ингибитор Е3-убиквитинлигазы, и введение Т-клеточной терапии, такой как композиция, содержащая клетки для адоптивной клеточной терапии, такой, например, как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки).

[0162] Терапия на основе Т-клеток, такая как adoptивная Т-клеточная терапия (включая терапию, включающую введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы специфичные для заболевания или расстройства, представляющего интерес, такие как химерные рецепторы антигена (CAR) и/или другие рекомбинантные рецепторы антигенов, а также другие adoptивные иммуноклеточные и adoptивные Т-клеточные терапии) могут быть эффективными при лечении рака, и других заболеваний и расстройств. Генно-инженерное экспрессирование рекомбинантных рецепторов, таких как химерные рецепторы антигена (CAR), на поверхности Т-клеток дает возможность для перенаправления специфичности Т-клеток. При клинических исследованиях, CAR Т-клетки, например, CAR Т-клетки анти-CD19, продуцируют стойкие, полные ответы у пациентов как с лейкозом, так и лимфомой (Porter et al. (2015) *Sci Transl Med.*, 7:303ra139; Kochenderfer (2015) *J. Clin. Oncol.*, 33: 540-9; Lee et al. (2015) *Lancet*, 385:517-28; Maude et al. (2014) *N Engl J Med*, 371:1507-17).

[0163] В определенном контексте, доступные подходы к adoptивной клеточной терапии не всегда могут быть полностью удовлетворительными. Например, в определенных случаях, хотя персистенция CAR+Т-клеток может детектироваться у многих субъектов с лимфомой, меньше полных ответов (CR) наблюдается у субъектов с NHL, по сравнению с субъектами с ALL. Более конкретно, хотя сообщается о более высоких общих долях ответа, до 80% (доля CR 47% - 60%), после вливания CAR+Т-клеток, у некоторых ответы являются нестационарными, и у субъектов, как показано, бывают рецидивы в присутствии персистентных CAR+Т-клеток (Neelapu, 58th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH): 2016; San Diego, CA, USA. Abstract No. LBA-6,2016; Abramson, *Blood*. 2016 Dec 01;128(22):4192). Другое исследование сообщает о доле долговременного CR 40% (Schuster, *Ann Hematol*. 2016 Oct;95(11):1805-10).

[0164] В некоторых аспектах, объяснением этого является иммунологическое истощение циркулирующих CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или изменения в популяциях Т-лимфоцитов. В некотором контексте, оптимальная эффективность может зависеть от способности введенных клеток к распознаванию и связыванию мишени, *например*, целевого антигена, к перемещению, локализации и к успешному проникновению в соответствующие области внутри субъекта, опухолей и их окружающих сред. В некоторых контекстах, оптимальная эффективность может зависеть от способности введенных клеток к активированию, размножению и осуществлению различных эффекторных функций, включая цитотоксическое уничтожение и секретирование различных факторов, таких как цитокины, к выживанию, включая долговременное, к дифференциации, транзиции или к вовлечению в перепрограммирование в определенные фенотипические состояния (такие как состояние долговременной памяти, менее дифференцированные и эффекторные состояния), для исключения или уменьшения иммуносупрессивных состояний в локальной окружающей среде заболевания, для обеспечения эффективных и устойчивых вторичных ответов после выведения и повторного экспонирования для целевого лиганда или антигена и предотвращения или уменьшения

истощения, анэргии, периферической толерантности, конечной дифференциации и/или дифференциации в супрессивное состояние.

[0165] В некоторых вариантах осуществления, экспонирование и персистентность генно-инженерных клеток уменьшаются или падают после введения субъекту. Кроме того, наблюдения показывают, что, в некоторых случаях, повышенное экспонирование субъекта для введенных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, повышенное количество клеток или продолжительность во времени), могут улучшить эффективность и терапевтические результаты при адоптивной клеточной терапии. Предварительный анализ, осуществляемый после введения различных CAR-экспрессирующих Т-клеток, нацеленных на CD19, субъектам с различными CD19-экспрессирующими раковыми заболеваниями во множестве клинических исследованиях показывает корреляцию между более высокой и/или более продолжительной степенью экспонирования для CAR-экспрессирующих клеток и результатами лечения. Такие результаты включают выживание и ремиссию у пациента, даже у индивидуумов с тяжелой или значительной опухолевой нагрузкой.

[0166] В некоторых вариантах осуществления, после долговременной стимуляции или экспонирования для антигена и/или экспонирования при условиях в окружающей среде опухоли, Т-клетки со временем становятся гипofункциональными и/или демонстрируют признаки, ассоциируемые с состоянием истощения. В некоторых аспектах, это уменьшает персистентность и эффективность Т-клеток против антигена и ограничивает их способность быть эффективными. Имеется потребность в способах повышения эффективности и функционирования CAR+Т-клеток, в частности, в сведении к минимуму, сокращении, предотвращении или инвертировании гипofункциональных или истощенных состояний.

[0167] Предлагаемые способы включают введение Т-клеточной терапии, такой как композиция, содержащая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида, и/или ингибитора E3 убиквитинлигазы, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение для использования в предлагаемых способах и применениях представляет собой модулирующее соединение для E3 лигазы, такое как ингибитор E3 убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение для использования в предлагаемых способах и применениях представляет собой леналидомид. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение для использования в предлагаемых способах и применениях представляет собой s Соединение 1 (3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение для использования в предлагаемых способах и применениях представляет собой Соединение 2 ((S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-

бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион).

[0168] Леналидомид, который имеет структурную формулу 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион или представляет собой его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф, представляет собой иммуномодулирующее лекарственное средство, одобренное в настоящее время для лечения множественной миеломы (ММ) и лимфомы клеток мантийной зоны (MCL), и оно клинически исследовано для терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы иммунофенотипа активированных В-клеток. В некоторых случаях, леналидомид увеличивает противоопухолевые иммунные ответы, по меньшей мере, частично, посредством модулирования активности ингибитора E3 убиквитинлигазы Цереблон (CRBN), что приводит к увеличению убиквитинирования факторов транскрипции Ikaros и Aiolos, что, в свою очередь, дает в результате изменение экспрессирования различных рецепторов на поверхности клеток опухоли (*смотри*, например, Otáhal et al. (2016) *Oncoimmunology*, April; 5(4): e1115940).

[0169] Соединение 1, которое имеет структурную формулу 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион), или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или их рацемические смеси, представляют собой иммуномодулирующее лекарственное средство, которое представляет собой плейотропную малую молекулу, которая может непосредственно ослаблять первичный рост опухоли, модулировать иммуносупрессивную окружающую среду опухоли и облегчать более устойчивый противоопухолевый воспалительный ответ. Соединение 1 придает антипролиферативную активность против В-клеток и оценивается как лечение из одного агента для нацеливания на опухоли при лимфоидных злокачественных новообразованиях В-клеток.

[0170] Соединение 2, которое имеет структурную формулу (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или их рацемические смеси, также представляет собой цереблон (CRBN), модулирующее соединение для E3 лигазы, которое модулирует CRBN, что индуцирует убиквитинирование факторов транскрипции Aiolos и Ikaros. В некоторых аспектах, убиквитинирование повышает их протеасома-зависимую деградацию. Соединение 2 сильнее связывается с CRBN и является более эффективным при деградации Aiolos и Ikaros, чем леналидомид и помалидомид. Как показано в настоящем документе, Соединение 2 также в 10-20 раз сильнее при деградации Ikaros и Aiolos, по сравнению с Соединением 1. Соединение 2 имеет непосредственное антипролиферативное воздействие на клетки лимфомы. Как показано в настоящем документе, Соединение 2 также усиливает функционирование Т-клеток.

[0171] Иммуномодулирующие лекарственные средства, такие как Соединение 1, Соединение 2 и леналидомид, как показано, непосредственно воздействуют на выживаемость злокачественных лимфоцитов посредством деградации факторов

транскрипции семейства Ikaros. Молекулярная мишень для таких соединений идентифицирована как белок Цереблон (CRBN), рецептор субстрата комплекса Cullin 4 RING и E3 убиквитинлигазы. Связывание с гидрофобным трехтриптофановым карманом в CRBN способствует рекрутменту, убиквитинированию и последующей протеасомальной деградации нескольких белковых субстратов, включая Aiolos (IKZF3) и Ikaros (IKZF1). (Fischer, *Nature*. 2014 Aug; 512, 49-53; Chamberlain, *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Sep;21(9):803-9; Gandhi, *Br J Haematol*. 2014 Mar;164(6):811-21; Lu, *Science*. 2014 Jan 17;343(6168):305-9; и Krönke, *Oncoimmunology*, 2014; 3(7): e941742.) Ikaros экспрессируется на незрелых стадиях миелоидной дифференциации и регулирует раннюю дифференциацию нейтрофилов (Dumortier *et al.* (2003) *Blood* 101:2219). Таким образом, в некоторых случаях, обеднение Ikaros, например, при введении иммуномодулирующего соединения, например, Соединения 1, субъектам может, в некоторых случаях, приводить в результате к нейтропении. Для ослабления нейтропении при сохранении противоопухолевой активности против В-клеточных лимфом, как обнаружено, доза 4 мг Соединения 1, принимаемая в течение пяти дней с последующим двухдневным периодом покоя (5/7 дней), представляет собой максимально переносимую дозу (MTD) для лечения субъектов с DLBCL (Carpio *et al.* (2015) *Blood*, 126:1594). Смотри также опубликованную заявку на Международный патент № WO2017096024.

[0172] В дополнение к их клеточной автономной активности против злокачественных В клеток, модулирующие соединения для E3 лигазы, такие как Соединение 1, также оказывают костимулирующие воздействия на иммунные клетки, такие как Т и NK-клетки. Эта активность также, как показано, осуществляется посредством медируемой CRBN деградации Aiolos и Ikaros, которые представляют собой отрицательные регуляторы экспрессирования молекул активации и цитокинов, таких как интерлейкин-2 (IL-2). (Gandhi, *Br J Haematol*. 2014 Mar;164(6):811-21, Krönke, *Oncoimmunology*, 2014; 3(7): e941742.).

[0173] Предлагаемые способы основаны на тех наблюдениях, что иммуномодулирующее соединение, такое как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор E3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, как описано, улучшает функционирование Т-клеток, включая функции, связанные со способностью продуцировать один или несколько цитокинов, цитотоксичностью, размножением, пролиферацией и персистенностью Т-клеток. В некоторых аспектах, предлагаемые способы усиливают или модулируют пролиферацию и/или активность Т-клеток, ассоциированную с введением Т-клеточной терапии (*например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток). Обнаружено, что такие способы и применения обеспечивают улучшение или повышение функциональности Т-клеток или реализуют ее и тем самым улучшают противоопухолевую эффективность.

[0174] В настоящем документе также обнаружено, что, в дополнение к потенцированию функции Т-клеток, такие иммуномодулирующие соединения, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, демонстрируют воздействия

инвертирования, замедления или предотвращения истощения Т-клеток, в том числе посредством повышения передачи сигналов Т-клеток и/или изменения одного или нескольких генов, которые дифференциально регулируются после хронической (долговременной) стимуляции. Таким образом, хотя в некоторых случаях агенты, которые повышают или потенцируют активность Т-клеток, могут приводить клетки в состояние истощения, в настоящем документе обнаружено, что активность таких иммуномодулирующих соединений, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, при оказании потенцирующего воздействия на активность Т-клеток не связана с истощением Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы, включая введение таких иммуномодулирующих соединений, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, способны потенцировать активность наивных Т-клеток и замедлять, ограничивать, уменьшать, ингибировать или предотвращать истощение.

[0175] Кроме того, наблюдения в настоящем документе показывают, что иммуномодулирующие соединения, например, леналидомид или Соединение 1, демонстрируют активность при сохранении Т-клеток от истощения Т-клеток, например, восстанавливая или частично восстанавливая одну или несколько активностей Т-клеток после того, как клетки показывают признаки истощения. Заметим, что результаты в настоящем документе показывают, что экспонирование Т-клеток, которые хронически стимулируются и демонстрируют признаки истощенных Т-клеток, для иммуномодулирующего соединения, описанного в настоящем документе, такого как Соединение 1, способны восстанавливать активность или восстанавливают или частично восстанавливают свою активность. Эти результаты не наблюдаются для интерлейкина 2 (IL-2), который в некоторых случаях представляет собой модулятор последующих процессов, индуцируемых под действием таких иммуномодулирующих соединений. Наблюдение в настоящем документе поддерживает то, что предлагаемые способы также могут реализовать улучшение или повышение стойкости ответов по сравнению с определенными альтернативными способами, например, в конкретных группах леченых субъектов.

[0176] Эти наблюдения осуществляют с использованием анализа хронической стимуляции, чтобы сделать CAR Т-клетки гипофункциональными (например, с уменьшением цитолиза и секретирования IL-2). Используя эту модель, исследуют CAR Т-клетки чтобы оценить влияние иммуномодулирующих соединений, которые ингибируют E3 лигазу, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, на функции CAR+Т-клеток, когда они присутствуют в ходе (одновременно) или после (сохранение) экспонирования для условий, приводящих к гипофункциональному истощенному состоянию. При повторном провоцировании антигеном, данные, полученные в настоящем документе, демонстрируют, что одновременная обработка CAR+Т-клеток при таких условиях инвертирует активность и фенотипы, включая генные сигнатуры, ассоциируемые с гипофункциональностью CAR+Т-клеток, и сохраняют больше эффекторных функций.

Подобным же образом, результаты показывают, что иммуномодулирующие соединения, которые ингибируют ЕЗ лигазу, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, могут сохранять или восстанавливать функции Т-клеток, включая продуцирование цитокинов и цитолитическую активность истощенных Т-клеток. Кроме того, такие результаты наблюдаются для различных целевых антигенов и различных CAR.

[0177] В некоторых вариантах осуществления, влияние на истощение Т-клеток, как наблюдается для иммуномодулирующих соединений, таких как леналидомид или Соединение 1, не наблюдается или не индуцируется для ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления, такое воздействие, как способность уменьшать, предотвращать или замедлять истощение Т-клеток или сохранять или восстанавливать активность Т-клеток у истощенных Т-клеток не индуцируется физиологически релевантным количеством или терапевтически эффективным количеством ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления, воздействие, индуцируемое иммуномодулирующим соединением, например, леналидомидом или Соединением 1, такое как способность уменьшать, предотвращать или замедлять истощение Т-клеток или сохранять или восстанавливать активность Т-клеток у истощенных Т-клеток, индуцируется больше или примерно больше в 1,2 раза, 2,0 раза, 3 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 10,0 раз или больше, по сравнению с тем, что наблюдается для ИЛ-2 или индуцируется ИЛ-2, например, физиологически релевантным количеством или терапевтически эффективным количеством ИЛ-2.

[0178] Наблюдения, осуществляемые в настоящем документе, демонстрируют также, что иммуномодулирующие соединения, которые ингибируют ЕЗ лигазу, демонстрируют активность увеличения продуцирования эффекторных цитокинов CAR+ Т-клетками, в то же время уменьшают их скорость пролиферации. Эти результаты не связаны с воздействием соединений на жизнеспособность Т-клеток. Это воздействие пролиферации наблюдается при различных концентрациях и, как обнаружено, вызывается аккумуляцией Т-клеток в фазе G1. Эта независимость продуцирования эффекторных цитокинов от скорости пролиферации может быть клинически полезной, например, ограничивая дифференциацию Т-клеток *in vivo*, которая могла бы ограничивать эффективность.

[0179] Приведенные данные показывают, что комбинированная терапия иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор ЕЗ убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, в способах, включающих Т-клетки, например, включающих введение адоптивной Т-клеточной терапии, дает улучшение функций Т-клеточной терапии, например, потенцируя активность Т-клеток и уменьшая, предотвращая или замедляя истощение Т-клеток или сохраняя клетки от истощения Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, комбинация клеточной терапии (например, введение генно-инженерных Т-клеток) с иммуномодулирующим соединением, *например*, леналидомидом или Соединением 1, улучшает или усиливает одну или несколько функций и/или воздействий Т-клеточной терапии, такие как персистенция, размножение, цитотоксичность и/или терапевтические результаты, например, способность уничтожать

или уменьшать нагрузку опухоли или другого заболевания или целевых клеток.

[0180] В конкретных аспектах, в настоящем документе обнаружено, что иммуномодулирующее соединение, такое как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор E3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, способствует продлению функционирования и/или выживаемости клеток Т-клеточной терапии (например, CAR+Т-клеток) после активирования, в том числе, после встречи с антигеном. В некоторых аспектах, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2 увеличивает способность таких Т-клеток к долговременной персистенции или функционированию, например, предотвращая истощение или гибель клеток. В конкретных вариантах осуществления, комбинированная терапия с иммуномодулирующим соединением, которое представляет собой ингибитор E3 лигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, может обеспечить полезный терапевтический подход для усиления и пролонгирования активности CAR+Т-клеток при злокачественных новообразованиях В клеток посредством модулирования окружающей микросреды опухоли, посредством улучшения персистенции противоопухолевой функции CAR+Т-клеток. В некоторых случаях, соединение может также иметь непосредственные противоопухолевые воздействия на клетки лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, такие улучшения могут давать в результате комбинированную терапию, демонстрирующую улучшенные общие ответы, например, уменьшение опухолевой нагрузки и/или повышенную выживаемость, по сравнению с субъектами лечеными с помощью монотерапии, включающей введение Т-клеточной терапии (например, CAR+Т-клеток) или иммуномодулирующего соединения (например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2,) самих по себе. В некоторых аспектах, предлагаемые способы увеличивают общий ответ и/или выживаемость в или более чем в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 10 раз или более по сравнению с альтернативным лечением, например, по сравнению с монотерапией, включающей введение Т-клеточной терапии (например, CAR+Т-клеток) или иммуномодулирующего соединения (например, леналидомида или Соединения 1) самих по себе.

[0181] Предлагаемые способы включают введение Соединения 1 в эффективном количестве для демонстрации модулирующего воздействия на Т-клетки. В настоящем документе обнаружено, что конкретные дозы иллюстративных иммуномодулирующих соединений, как описано, например, леналидомида или Соединения 1, увеличивают или усиливают функции Т-клеток Т-клеточной терапии, например, терапии CAR+Т-клеток. В некоторых случаях, слишком высокие дозы могут отрицательно влиять на функцию Т-клеток. Как показано в настоящем документе, пролонгированное лечение Соединением 1 при физиологически релевантных концентрациях (10 или 100 нМ) может повысить долговременный пролиферативный потенциал CAR-экспрессирующих Т-клеток, в то время как более высокие концентрации, например, такие как или примерно, как 500 мМ, могут быть вредными для долговременных характеристик продукта. В некоторых вариантах осуществления, доза Соединения 1, которая вводится, составляет от или примерно от 1 мг

примерно до 10 мг, например, от или примерно от 1 мг примерно до 5 мг. Доза может вводиться ежедневно в курсе лечения или циклическом режиме.

[0182] Сходные результаты наблюдают для иммуномодулирующего лекарственного средства леналидомида, хотя его активность действия на Т-клетки ниже, чем у Соединения 1. В CAR-экспрессирующих Т-клетках, экспрессирование Ikaros уменьшается концентрационно зависимым образом в присутствии леналидомида или Соединения 1 при сходных значениях половинной максимальной эффективной концентрации (EC50), однако, величина потерь Ikaros после лечения Соединением 1 больше. В определенных вариантах осуществления, дозы 40-150 нМ Соединения 1 (коррелирующие с уровнем дозы ~1 мг) дают в результате 50% деградацию Ikaros в Т-клетках (*например*, CAR-экспрессирующих Т-клетках). Кроме того, исследования *in vitro*, оценивающие воздействие Соединения 1 на антиген-зависимое продуцирование цитокинов с помощью CAR-экспрессирующих Т-клеток, направленных на CD19, демонстрируют повышение уровней IFN $\gamma$  и IL-2 по сравнению с контролем с несущей средой или с эквимоллярными концентрациями леналидомида. Таким образом, введение Соединения 1, согласно предлагаемым способам, может увеличить активность CAR-экспрессирующих клеток для лечения рака посредством потенцирования и/или восстановления функций и активности Т-клеток у генно-инженерных Т-клеток, а в некоторых аспектах, может также демонстрировать автономные противоопухолевые воздействия на клетки.

[0183] В конкретных вариантах осуществления, Соединение 2 можно использовать в любых предполагаемых способах. Как описано, данные показывают, что Соединение 2 в 10-20 раз более сильнодействующее чем Соединение 1 и таким образом также является более сильнодействующим чем Соединение 1. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают введение Соединения 2 в количестве эффективном для демонстрации модулирующего воздействия на Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество в 10-20 меньше, чем количество Соединения 1 для такого же или сходного воздействия. В некоторых вариантах осуществления, доза Соединения 2, которая вводится, составляет от или примерно от 0,1 мг примерно до 1 мг, например, от или примерно от 0,3 мг примерно до 0,6 мг. Доза может вводиться ежедневно в курсе лечения или в циклическом режиме.

[0184] В некоторых вариантах осуществления, комбинация с иммуномодулирующим соединением, хотя и улучшает один или несколько результатов или функциональных атрибутов, не вызывает одного или нескольких побочных воздействий или нежелательных изменений в Т-клетках, например, не уменьшает способности клеток к активированию, секретированию одного или нескольких желаемых цитокинов, к размножению и/или персистенции, например, как измерено в анализе *in vitro*, по сравнению с такими клетками, культивируемыми при условиях в основном таких же, но в отсутствие иммуномодулирующего соединения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, предлагаются способы и комбинации, которые дают в результате улучшения функции или фенотипа Т-клеток, например, собственной функциональности Т-

клеток и/или собственного фенотипа Т-клеток, как правило, без ослабления одного или нескольких других желаемых свойств функциональности, например, функциональности CAR Т-клеток.

[0185] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы могут потенцировать Т-клеточную терапию, например, терапию с помощью CAR+Т-клеток, которая, в некоторых аспектах, может улучшить результаты лечения. В некоторых вариантах осуществления, способы являются особенно преимущественными для субъектов, у которых клетки Т-клеточной терапии демонстрируют слабое размножение, становятся истощенными, демонстрируют уменьшенную или пониженную персистентность у субъекта и/или у субъектов, которые имеют рак, который является резистентным или плохо поддается лечению с помощью другой терапии, является агрессивным или вызывающим высокий риск рака, и/или которые демонстрируют или вероятно демонстрируют относительно более низкую долю ответа на CAR Т-клеточную терапию, вводимую без иммуномодулирующего соединения, по сравнению с другим типом рака или по сравнению с введением другой Т-клеточной терапии.

[0186] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы используют в то время, когда Т-клеточная терапия (например, CAR Т-клетки) может демонстрировать или вероятно демонстрирует признаки истощения. В некоторых вариантах осуществления, фенотип истощения становится очевиден после того, как Т-клетки, достигшие пикового размножения, начинают уменьшаться в количестве в крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способы экспонирования или приведения в контакт Т-клеток Т-клеточной терапии (CAR+Т-клеток) с иммуномодулирующим соединением, которое ингибирует Е3 лигазу, например, леналидомидом, Соединением 1 или Соединением 2, осуществляются не в то время, когда Т-клетки демонстрируют увеличение гипофункционального или истощенного состояния, по сравнению со временем непосредственно перед экспонированием Т-клеток для антигена (фон) или до той временной точки, в которой клетки экспонируются для антигена, но продолжают пролиферацию и еще не реализуют пикового размножения. В некоторых вариантах осуществления, увеличение гипофункционального или истощенного состояния можно определить по повышению экспрессирования маркера истощения, по сравнению с предыдущей более ранней временной точкой. В некоторых вариантах осуществления, увеличение гипофункционального или истощенного состояния, такое как увеличение экспрессирования маркера истощения, происходит в момент времени после введения Т-клеточной терапии (например, CAR+Т-клеток) субъекту, имеющему заболевание или состояние, ассоциированное с антигеном, на который нацелена Т-клеточная терапия. Т-клетки, такие как Т-клетки в периферической крови после введения субъекту, могут отслеживаться на маркеры активирования или истощения Т-клеток, такие как PD-1, TIM-3 и LAG-3.

[0187] В некоторых аспектах, предлагаемые способы могут усилить, увеличить или потенцировать Т-клеточную терапию с тем, чтобы преодолеть отсутствие

персистентности и/или истощения Т-клеток, например, у субъектов, у которых в дни 12-15 или около того после начала введения Т-клеточной терапии, в крови детектируется меньше 10 мкл, например, меньше 5 мкл или меньше 1 мкл таких клеток или их подмножества CD8+ или CD3+. В некоторых вариантах осуществления, субъект, который принимает введение Т-клеточной терапии, например, CAR+Т-клеток, отслеживается на присутствие, отсутствие или уровень Т-клеток терапии у субъекта, например, в биологическом образце субъекта, например, в крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, такое как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводят субъекту, который принимает Т-клеточную терапию (например, CAR Т-клетки), но у которого такие клетки медленно размножаются и/или находятся на пороговом уровне или ниже в образце от субъекта, например, в образце крови, в то время, когда сильное или устойчивое размножение CAR+Т-клеток у субъекта, как правило, наблюдается у множества субъектов, которым вводят Т-клеточную терапию (например, CAR-Т), в некоторых случаях, такую же Т-клеточную терапию (например, те же CAR Т-клетки). В некоторых аспектах, иммуномодулирующее соединение, такое как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводят, если в день 12-15 или около того после начала введения Т-клеточной терапии в крови детектируется меньше 10 мкл, например, меньше 5 мкл или меньше 1 мкл таких клеток или их подмножества CD8+ или CD3+.

[0188] В определенных аспектах, предлагаемые способы могут усиливать, увеличивать или потенцировать Т-клеточную терапию у субъектов, у которых наблюдается пиковый ответ на Т-клеточную терапию, но у которых этот ответ, например, присутствие Т-клеток и/или уменьшение нагрузки опухоли, становится меньше или больше не детектируется. В некоторых аспектах, иммуномодулирующее соединение, такое как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится субъекту в течение недели, например, в течение 1, 2 или 3 дней после того, как: (i) в крови субъекта может детектироваться пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии; (ii) количество клеток Т-клеточной терапии детектируемых в крови, после того, как они могут детектироваться в крови, не детектируется, или оно уменьшается, или необязательно уменьшается по сравнению с предыдущей временной точкой после введения Т-клеточной терапии; (iii) количество клеток Т-клеточной терапии детектируемых в крови уменьшается в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз или около того или более от пикового или максимального количества клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови субъекта после начала введения Т-клеточной терапии; (iv) после того, как пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии детектируется в крови субъекта, количество клеток, Т-клеток или клеток, полученных из Т-клетки, детектируемый в крови от субъекта, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1% или меньше 0,1% от моноклеаров

периферической крови (РВМС) в целом в крови субъекта; (v) субъект демонстрирует прогрессирование заболевания и/или оно возобновляется после ремиссии после лечения с помощью Т-клеточной терапии; и/или (vi) субъект демонстрирует увеличение опухолевой нагрузки по сравнению с опухолевой нагрузкой в некоторый момент времени до или после введения Т-клеток и до начала введения иммуномодулирующего соединения.

[0189] В некоторых вариантах осуществления, эти способы можно использовать для лечения заболевания или состояния, например, В-клеточной неоплазии или гематологической неоплазии и, в частности, таких заболеваний, состояний или злокачественных новообразований, при которых ответы, например, полный ответ, на лечение только Т-клеточной терапией, такой как композиция, содержащая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки), является относительно низким по сравнению с лечением с помощью других видов Т-клеточной терапии или с лечением других заболеваний или злокачественных новообразований (например, CR меньше или меньше примерно, чем у 60%, меньше примерно, чем у 50% или меньше примерно, чем у 45% субъектов, леченых таким образом) и/или когда субъект не отвечает на лечение иммуномодулирующим соединением, таким как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, сами по себе.

[0190] В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия, предлагаемая в настоящем документе предназначена для использования у субъекта, имеющего рак, у которого после начала введения Т-клеточной терапии, такой как композиция, содержащая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, CAR-экспрессирующие Т-клетки, он возобновляется после ремиссии после лечения Т-клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, субъектам, которые имеют рецидив после такой ремиссии, вводят иммуномодулирующее соединение, такое как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2. В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия, предлагаемая в настоящем документе, предназначена для использования у субъекта, имеющего заболевание или состояние, например, рак, при котором количество иммуномодулирующего соединения, вводимого как отдельный агент и/или в отсутствие введения Т-клеточной терапии, является недостаточным, для ослабления, уменьшения или предотвращения заболевания или состояния или его симптома или результата, например, недостаточным для ослабления, уменьшения или предотвращения заболевания или состояния субъекта или его симптома или результата. В некоторых вариантах осуществления, способ тем самым уменьшает или ослабляет симптом или результат или нагрузку заболевания или состояния до такой степени, которая больше чем комбинация (i) степени уменьшения или ослабления осуществляемой посредством введения иммуномодулирующего агента самого по себе, необязательно, в среднем у популяции субъектов, имеющих это заболевание или состояние,

и (ii) степени уменьшения или ослабления посредством введения Т-клеточной терапии отдельно, необязательно, в среднем, у популяции субъектов, имеющих заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, способ уменьшает или ослабляет такие симптомы, результаты или нагрузки заболевания, например, по сравнению со средним значением у популяции субъектов, имеющих заболевание или состояние, больше чем в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз, 20,0 раз, 30,0 раз, 40,0 раз, 50,0 раз или около того или более.

[0191] В некоторых вариантах осуществления, предложенную комбинированную терапию используют в лечении определенных заболеваний или состояний, например, рака, при этом оптимальную стимуляцию рекомбинантного рецептора антигена, например, CAR Т-клетки, сложно достичь и/или она не наблюдается consistently. В некоторых вариантах осуществления, стимуляция меньше оптимальной может представлять собой результат низких или недоступных уровней антигена заболевания *in vivo*, например, на опухоли или в ней. В некоторых вариантах осуществления, определенные раковые заболевания, такие как NHL, например, NHL с высоким риском или агрессивная, такая как DLBCL, и/или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) может ассоциироваться с дефектами или с уменьшением собственной функциональности Т-клеток, которая в некоторых случаях подвергается влиянию самого заболевания. Например, патогенез многих раковых заболеваний, таких как CLL и NHL, например, DLBCL, может ассоциироваться с иммунодефицитом, приводя к облегчению роста опухоли и иммунной эвазии, например, из-за иммуносупрессии Т-клеток, например, запускаемой одним или несколькими факторами в окружающей среде опухоли. В некоторых случаях, ослабление собственных дефектов Т-клеток, получаемых от раковых заболеваний таких пациентов при использовании в комбинации с адаптивной клеточной терапией, может обеспечить более сильные ответы на адаптивную Т-клеточную терапию, например, на CAR Т-клеточную терапию. В некоторых случаях, стимуляция меньше оптимальной может вызываться различиями в уровнях экспрессирования CAR на генно-инженерных Т-клетках, вводимых субъекту. В любом из таких вариантов осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, может усилить стимуляцию или активность таких Т-клеток у субъекта *in vivo*.

[0192] В некоторых вариантах осуществления предполагаемых способов, одно или несколько свойств вводимых генно-инженерных клеток можно улучшить или повысить или увеличить по сравнению с вводимыми клетками референтной композиции, например, увеличенное или более продолжительное размножение и/или персистенность таких введенных клеток у субъекта или повышение, или увеличение вторичного ответа при повторной стимуляции антигеном. В некоторых вариантах осуществления, повышение может представлять собой, по меньшей мере, 1,2-кратное, по меньшей мере, 1,5-кратное, по меньшей мере, 2-кратное, по меньшей мере, 3-кратное, по меньшей мере, 4-кратное, по

меньшей мере, 5-кратное, по меньшей мере, 6-кратное, по меньшей мере, 7-кратное, по меньшей мере, 8-кратное, по меньшей мере, 9-кратное или, по меньшей мере, 10-кратное увеличение такого свойства или признака по сравнению с таким же свойством или признаком при введении референтной клеточной композиции. В некоторых вариантах осуществления, увеличение одного или нескольких таких свойств или признаков может наблюдаться или присутствовать в диапазоне 7 дней, 14 дней, 21 день, в диапазоне одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или 12 месяцев после введения генно-инженерных клеток и начала введения иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида, и/или ингибитора E3 убиквитинлигазы, например, леналидомида или Соединения 1.

[0193] В некоторых вариантах осуществления, референтная клеточная композиция может представлять собой композицию Т-клеток из крови субъекта, не имеющего или, как ожидается, не имеющего рака, или представлять собой популяцию Т-клеток, полученных, выделенных, генерируемых, продуцируемых, инкубируемых и/или вводимых при таких же или по существу таких же условиях за исключением того, что они не инкубируются или не вводятся в присутствии иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления, референтная клеточная композиция содержит генно-инженерные клетки, которые являются по существу такими же, включая экспрессирование такого же рекомбинантного рецептора, например, CAR. В некоторых аспектах, такие Т-клетки обрабатываются идентично или, по существу, идентично, например, производятся сходным образом, приготавливаются сходным образом, вводятся в таком или примерно таком же дозированном количестве, и другие сходные факторы.

[0194] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы дают в результате генно-инженерные клетки с улучшенной персистенцией и/или лучшим сильнодействием для субъекта, которому их вводят. В некоторых вариантах осуществления, персистенция генно-инженерных клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки, у субъекта больше по сравнению с тем, чего можно было бы достигнуть с помощью альтернативных способов, таких как включающие введение референтной клеточной композиции, например, введения Т-клеточной терапии, но в отсутствие введения иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления, персистенция повышается, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз или более.

[0195] В некоторых вариантах осуществления, степень или величину персистенции введенных клеток можно детектировать или количественно определять после введения их субъекту. Например, в некоторых аспектах, используют количественную PCR (qPCR) для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток) в крови или сыворотке или органе или ткани (например, в области заболевания) субъекта. В некоторых аспектах, персистенция

количественно определяется как количество копий ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, например, CAR, на микрограмм ДНК или как количество рецептор-экспрессирующих, например, CAR-экспрессирующих, клеток на микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество мононуклеаров периферической крови (PBMCs), или лейкоцитов или Т-клеток на микролитр образца. В некоторых вариантах осуществления также можно осуществлять анализы с помощью проточной цитометрии, детектирующие клетки, экспрессирующие рецептор, как правило, с использованием антител специфичных к рецепторам. Анализы на клеточной основе можно также использовать для детектирования количества или процента функциональных клеток, таких как клетки способные связывать и/или нейтрализовать и/или индуцировать ответы, например, цитотоксичные ответы, против клеток заболевания или состояния, или экспрессирующие антигены, распознаваемые рецептором. В любом из таких вариантов осуществления, величину или уровень экспрессирования другого маркера, ассоциируемого с рекомбинантным рецептором, (например, CAR-экспрессирующих клеток) можно использовать чтобы различить вводимые клетки и эндогенные клетки субъекта.

[0196] Также предлагаются способы генной инженерии, приготовления и продуцирования клеток, композиций, содержащих клетки и/или иммуномодулирующее соединение, и наборов, и устройств, содержащих их и предназначенных для использования, продуцирования и введения клеток и/или иммуномодулирующего соединения, например, согласно предлагаемым способам комбинированной терапии.

[0197] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упоминаемые в настоящей заявке, включаются как ссылки во всей своей полноте для всех целей до такой же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация включалась индивидуально как ссылка. Если определение, приведенное в настоящем документе, противоречит или иным образом не соответствует определениям, приведенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ как ссылки, определение, приведенное в настоящем документе, преобладает над определением, которое включено в настоящий документ в качестве ссылки.

[0198] Заглавия разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для целей упорядочения и не должны рассматриваться как ограничивающие описанный предмет изобретения.

## I. КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

[0199] В настоящем документе предлагаются способы комбинированной терапии для лечения заболевания или расстройства, например, рака или пролиферативного заболевания, которые включают введение субъекту комбинированной терапии из 1) иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида, и/или ингибитора Е3 убиквитинлигазы, например, леналидомида или Соединения 1 и Соединения 2, 2) Т-клеточной терапии, например, CAR-экспрессирующих клеток, например, Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления,

иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор E3 убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия представляет собой адоптивную иммунную клеточную терапию, включающую Т-клетки, которые специфично распознают и/или нацелены на антиген, ассоциированный с заболеванием или расстройством, например, раком или пролиферативным заболеванием. Также предлагаются комбинации и промышленные изделия, такие как наборы, которые содержат композицию, содержащую Т-клеточную терапию, и/или композицию, содержащую иммуномодулирующее соединение, и применения таких композиции и комбинаций для лечения или предотвращения заболеваний, состояний и расстройств, включая раковые заболевания.

[0200] В некоторых вариантах осуществления, такие способы могут включать введение иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида, и/или ингибитора E3 убиквитинлигазы, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, до, одновременно с ним, в ходе, в ходе курса (включая однократно и/или периодически в ходе курса), и/или после введения (например, после начала введения) Т-клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующих Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, введение может включать последовательные или чередующиеся введения иммуномодулирующего соединения и Т-клеточной терапии

[0201] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия представляет собой адоптивную клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия представляет собой или содержит инфильтрирующую опухоль лимфоцитарную (TIL) терапию, трансгенную TCR терапию или экспрессирующую рекомбинантный рецептор клеточную терапию (необязательно, Т-клеточную терапию), которая необязательно представляет собой экспрессирующую химерный рецептор антигена (CAR) клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления, терапия представляет собой терапию, нацеленную на В клетки. В некоторых вариантах осуществления, терапия нацелена на антиген созревания В-клеток (BCMA). В некоторых вариантах осуществления, терапия нацелена на CD19. В некоторых вариантах осуществления, клетки и режимы дозирования для введения клеток могут включать любые клетки и режимы, как описано в следующем далее подразделе А под заглавием “Введение Т-клеточной терапии”.

[0202] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение потенцирует функциональность Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение запускает антимиеломную активность. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение изменяет супрессивную окружающую среду.

[0203] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой структурный или функциональный аналог или производное талидомида. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор E3 убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой леналидомид или

соединение с такими же как у леналидомида или сходными свойствами, включая аналоги или производные, стереоизомер леналидомида или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой Соединение 1, как описано, или соединение с такими же или сходными свойствами как у Соединения 1, включая аналоги или производные, стереоизомер Соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой Соединение 1, как описано, или соединение такими же или сходными свойствами, как у Соединения 1, включая аналоги или производные, стереоизомер Соединения 1 или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, режимы дозирования для введения иммуномодулирующего соединения могут включать любые соединения, как описано в следующем далее подразделе В под заглавием “Введение иммуномодулирующего соединения”.

[0204] В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки) и иммуномодулирующее соединение приготавливают как фармацевтические композиции для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективные количества одного или обоих агентов для комбинированной терапии, *например*, Т-клетки для адоптивной клеточной терапии и иммуномодулирующее соединение, как описано. В некоторых вариантах осуществления, агенты приготавливают для введения в отдельных фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления, любые фармацевтические композиции предлагаемые в настоящем документе можно приготовить в дозированных формах, соответствующих каждому способу введения.

[0205] В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия, которая включает введение Т-клеточной терапии, включая генно-инженерные клетки, такой как CAR Т-клеточная терапия, и иммуномодулирующего соединения, вводится субъекту или пациенту, имеющему заболевание или состояние, которое должно лечиться (*например*, рак) или имеет риск возникновения заболевания или состояния (*например*, рака). В некоторых аспектах, эти способы лечат, *например*, ослабляют один или несколько симптомов заболевания или состояния, например, уменьшая опухолевую нагрузку при раке, экспрессирующем антиген, распознаваемый иммунотерапией или иммунотерапевтическим агентом, например, распознаваемый генно-инженерными Т-клетками.

[0206] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние, которое лечится, может представлять собой любое заболевание, при котором экспрессирование антигена ассоциируется и/или вовлекается в этиологию заболевания, состояния или расстройства, *например*, вызывает, обостряет или иным образом вовлекается в такое заболевание, состояние или расстройство. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со злокачественным

новообразованием или трансформацией клеток (*например*, рак), аутоиммунным или воспалительным заболеванием, или инфекционным заболеванием, *например*, вызываемым бактериальным, вирусным или другим патогеном. Иллюстративные антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые могут лечиться, включают любой из антигенов, описанных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор экспрессируемый на генно-инженерных клетках комбинированной терапии, включая химерный рецептор антигена или трансгенный TCR, специфично связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

[0207] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой опухоль, такую как плотная опухоль, лимфома, лейкоз, опухоль крови, метастатическая опухоль или другой тип рака или опухоли.

[0208] В некоторых вариантах осуществления, рак или пролиферативное заболевание представляет собой В-клеточную неоплазию или гематологическую неоплазию. В некоторых вариантах осуществления рак или пролиферативное заболевание представляет собой лимфобластный лейкоз (ALL), лимфому не-Ходжкина (NHL) или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, раковое заболевание представляет собой CLL. В некоторых вариантах осуществления, способы можно использовать для лечения миеломы, лимфомы или лейкоза. В некоторых вариантах осуществления, способы можно использовать для лечения лимфомы не-Ходжкина (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), острого миелоидного лейкоза (AML) или миеломы, *например*, множественной миеломы (MM). В некоторых вариантах осуществления, способы можно использовать для лечения MM или DLBCL.

[0209] В некоторых вариантах осуществления, антиген, ассоциированный с заболеванием или расстройством, выбираемым из группы, состоящей из ROR1, В- антигена клеточного созревания (BCMA), Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, СЕА и поверхностного антигена гепатита В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, ERHa2, ErbB2, 3 или 4, димеров erbB, EGFR vIII, FBP, FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, антигена Leu, молекулы клеточной адгезии L1, (L1-CAM), антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы (PRAME), сурвивина EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, рецептора  $\alpha 2$  IL-13 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-A1 MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, фолатного рецептора а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин  $\alpha v \beta 6$ , 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, Foetal AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой, антигена рака яичек, мезотелина, лигандов MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простато-

специфичного антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, опухоли Вильямса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138 и патоген-специфичного антигена. В некоторых вариантах осуществления, антиген ассоциируется или представляет собой универсальную метку.

[0210] В некоторых вариантах осуществления рак или пролиферативное заболевание экспрессирует ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы используют Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (*например*, CAR-Т-клетки), которые нацелены на ВСМА.

[0211] В некоторых вариантах осуществления рак или пролиферативное заболевание экспрессирует CD19. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы используют Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (*например*, CAR-Т-клетки), которые нацелены на CD19.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, способы можно использовать для лечения негематологического рака, такого как как плотная опухоль. В некоторых вариантах осуществления, способы можно использовать для лечения рака мочевого пузыря, легких, головного мозга, меланомы (*например*, мелкоклеточного рака легких, меланомы), рака молочной железы, шейки матки, яичников, ободочной и прямой кишки, поджелудочной железы, рака эндометрия, пищевода, почек, печени, простаты, кожи, щитовидной железы или матки. В некоторых вариантах осуществления, рак или пролиферативное заболевание представляет собой раковое заболевание: рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак ободочной и прямой кишки, рак молочной железы, рак простаты, рак почек, гепатоклеточный рак, рак легких, рак яичников, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак щитовидной железы, рак матки, рак ЖКТ, рак пищевода, рак головы и шеи, меланому, нейроэндокринные раковые заболевания, раковые заболевания CNS (центральной нервной системы), опухоли головного мозга, рак костей или саркому мягких тканей.

[0213] В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, но, не ограничиваясь этим, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барра (EBV), аденовирус, ВК полиомавирусы. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, *например*, ревматоидный артрит (RA), диабет Типа I, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание желудка, псориаз, склеродермия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, множественный склероз, астма и/или заболевание или состояние, ассоциированное с трансплантатом.

[0214] Для предотвращения или лечения заболевания, соответствующая доза иммуномодулирующего соединения (*например*, леналидомида, Соединения 1 или

Соединения 2,) и/или иммунотерапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки), может зависеть от типа заболевания, которое должно лечиться, конкретного иммуномодулирующего соединения, клеток и/или рекомбинантных рецепторов, экспрессируемых на клетках, тяжести и хода заболевания, способа введения, от того вводится ли иммуномодулирующее соединение и/или Т-клеточная терапия для превентивных или терапевтических целей, от предыдущей терапии, частоты введения, клинической истории субъекта и ответа на клетки, и от решения лечащего врача. Композиции и клетки в некоторых вариантах осуществления удобно вводить субъекту за один раз или в виде ряда сеансов лечения. Описываются иллюстративные режимы и временные графики дозирования для предлагаемой комбинированной терапии.

[0215] В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия и иммуномодулирующее соединение вводятся как часть дополнительного комбинированного лечения, которое можно вводить одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством. В некоторых контекстах, Т-клеточная терапия, например, генно-инженерные Т-клетки, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки, вводятся совместно с другой терапией достаточно близкой по времени, так что Т-клеточная терапия усиливает воздействие одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят до одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия, например, генно-инженерные Т-клетки, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки, вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, способы комбинированной терапии дополнительно включают противолимфому терапию, такую как введение химиотерапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия дополнительно включает введение другого терапевтического агента, такого как противораковый агент, ингибитор контрольной точки или другой иммуномодулирующий агент. Использование включает применения комбинированной терапии в таких способах и видах лечения и использование таких композиций при приготовлении медикаментов для осуществления таких способов комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы и их применения тем самым лечат заболевание или состояние, или расстройство, такое как рак или пролиферативное заболевание в субъекта.

[0216] До, в ходе или после введения иммунотерапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточной терапии) и/или иммуномодулирующего соединения, биологическая активность Т-клеточной терапии, *например*, биологическая активность популяции генно-инженерных клеток, в некоторых вариантах осуществления измеряется, *например*, с помощью любого из ряда известных способов. Параметры оценки включают способность генно-инженерных клеток к разрушению целевых клеток, персистентность и другие меры активности Т-клеток, например, измеренные с использованием любого соответствующего способа известного в данной области, такого как анализы,

дополнительно описанные ниже в Разделе III. В некоторых вариантах осуществления, биологическая активность клеток, *например*, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток, измеряется с помощью анализа цитотоксичной гибели клеток, экспрессирования и/или секретирования одного или нескольких цитокинов, пролиферации или размножения, *например*, при повторной стимуляции антигеном. В некоторых аспектах биологическая активность измеряется посредством оценки тяжести заболевания и/или клинического результата, такой как уменьшение массы или нагрузки опухоли. В некоторых вариантах осуществления, введение одного или нескольких агентов комбинированной терапии и/или любое повторное введение терапии может определяться на основе результатов анализов до, в ходе, в ходе курса или после введения одного или нескольких агентов комбинированной терапии.

[0217] В некоторых вариантах осуществления, комбинированное воздействие иммуномодулирующего соединения в комбинации с клеточной терапией может быть синергическим по сравнению с лечением, включающим только иммуномодулирующее соединение или монотерапию с клеточной терапией. *Например*, в некоторых вариантах осуществления, способы, предлагаемые в настоящем документе, дают в результате увеличение или улучшение желаемого терапевтического воздействия, такого как увеличение или улучшение уменьшения, или ингибирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с раковым заболеванием.

[0218] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение увеличивает размножение или пролиферацию генно-инженерных Т-клеток, таких как CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, увеличение размножения или пролиферации наблюдается *in vivo* при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления, увеличение количества генно-инженерных Т-клеток, *например*, CAR+Т-клеток, увеличивается больше или примерно больше, чем в 1,2 раз, 1,5 раз, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз или больше.

#### A. ВВЕДЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

[0219] В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений, предлагаемых в настоящем документе, комбинированная терапия включает введение субъекту иммунной клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки). Введение такой терапии может начинаться до, после и одновременно с введением одного или нескольких иммуномодулирующих соединений, как описано.

[0220] В некоторых вариантах осуществления, терапия на клеточной основе представляет собой или включает введение клеток, таких как иммунные клетки, *например*, Т-клетки или NK клетки, которые нацелены на молекулу, экспрессируемую на поверхности повреждения, такого как опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки экспрессируют рецептор Т-клеток (TCR) или другой антигенсвязывающий рецептор. В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как трансгенный TCR или химерный

рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления, клетки являются аутологичными для субъекта. В некоторых вариантах осуществления, клетки являются аллогенными для субъекта.

[0221] В некоторых аспектах, Т-клеточная терапия представляет собой или содержит инфильтрующую опухоль лимфоцитарную (TIL) терапию, трансгенную TCR терапию или Т-клеточную терапию, включающую генно-инженерные клетки, такую как клеточная терапия с экспрессированием рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор специфично связывается с лигандом, таким как лиганд, ассоциированный с заболеванием или состоянием, *например*, ассоциируется или экспрессируется на клетке опухоли или рака. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия включают введение генно-инженерных Т-клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена (CAR).

[0222] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые клетки экспрессируют и/или получают с помощью генной инженерии для экспрессирования рецепторов, таких как рекомбинантные рецепторы, включая рецепторы, содержащие лиганд-связывающие домены или их фрагменты связывания, и рецепторы Т-клеток (TCR) и их компоненты, и/или не-TCR функциональные рецепторы антигена, такие как химерные рецепторы антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфично связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAR, который содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфично связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, такой как антиген представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой TCR-подобный CAR и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (MHC).

[0223] Некоторые генно-инженерные клетки, включая генно-инженерные клетки, содержащие рекомбинантные рецепторы, описаны в Разделе II, ниже. Иллюстративные рекомбинантные рецепторы, включая CAR и рекомбинантные TCR, а также способы генной инженерии и введения рецепторов в клетки, включают те, что описаны, например, в публикациях заявок на Международный патент WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, WO2016/0046724, WO2016/014789, WO2016/090320, WO2016/094304, WO2017/025038, WO2017/173256, публикациях заявок на патент США US2002131960, US2013287748, US20130149337, патенты США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353, 8479118 и 9765342 и заявки на Европейский патент EP2537416 и/или рецепторы, описанные Sadelain *et al.*, *Cancer Discov.*, 3(4): 388-398 (2013); Davila *et al.*, *PLoS ONE* 8(4): e61338 (2013); Turtle *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39 (2012); Wu *et al.*, *Cancer*, 18(2): 160-75 (2012). В

некоторых аспектах, генно-инженерные рецепторы антигенов включают CAR, как описано в патенте США №: 7446190, и те, которые описаны в публикации заявки на Международный патент №: WO/2014055668 A1.

[0224] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает  $\alpha\beta6$  интегрин (интегрин  $\alpha\beta6$ ), В-клеточный антиген созревания (BCMA), B7-Н3, B7-Н6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), антиген рака яичка, раково-тестикулярный антиген 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, лиганд 1 хемокинового мотива С-С (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликан с хондроитинсульфатами 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), усеченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), мутацию рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин В2, рецептор эфрина А2 (EPHa2), рецептор эстрогена, Fc-подобный рецептор 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), белок связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептор альфа фолиевой кислоты, ганглиозид GD2, О-ацетилованный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), рецептор 5D, связанный с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный антиген человека, ассоциированный с меланомой (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, антиген лейкоцитов человека А1 (HLA-A1), антиген лейкоцитов человека А2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептор домена вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, обогащенный повторами лейцинов элемента А семейства 8 (LRRC8A), антиген Leu, антиген, ассоциированный с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), онкофетальный антиген, преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простато-специфичный антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичный мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор 1 подобный рецептору тирозинкиназы (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобластов (TPBG также известный как 5T4), гликопротеин 72, ассоциированный с опухолью (TAG72), белок 1 родственник тирозинкиназе (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), белок 2 родственник тирозинкиназе (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомеразу или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоль Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичный или патоген-экспрессируемый антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, вирусом гепатита

С, вирусом гепатита В, или другие патогены. Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточной неоплазией, такие как любой из ряда известных маркеров В клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0225] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает патоген-специфичный или патоген-экспрессируемый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген от ВИЧ, вируса гепатита С, вируса гепатита В, и тому подобное), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0226] В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия включает введение субъекту клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфично распознает и/или нацелен на антиген, ассоциированный с раком и/или присутствующий на универсальной метке. В некоторых вариантах осуществления, антиген, который распознается или на который нацеливаются Т-клетки, представляет собой ROR1, В-клеточный антиген созревания (BCMA), карбоангидразу 9 (CAIX), tEGFR, Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, СЕА и поверхностный антиген гепатита В, антифолатный рецептор, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеры erbB, EGFR vIII, белок связывания фолиевой кислоты (FBP), FCRL5, FCRH5, фетальный рецептор ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептор домена вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, антиген Ley, молекулы клеточной адгезии L1, (L1-CAM), антиген, ассоциированный с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, преимущественно экспрессируемый антигеном меланомы (PRAME), сурвивин, TAG72, B7-H6, рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2, PSCA, фолатный рецептор альфа, CD44v6, CD44v7/8, интегрин  $\alpha v \beta 6$ , 8H9, NCAM, рецепторы VEGF, 5T4, Foetal AchR, лиганды NKG2D, CD44v6, двойной антиген, антиген рака яичек, мезотелин, мышинный CMV, муцин 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, рецептора 5D, связанный с белком G (GPCR5D), онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, эфрин В2, CD123, c-Met, GD-2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), CE7, опухоль Вильямса 1 (WT-1), циклин, циклин А2, CCL-1, CD138, необязательно, антиген человека любого из рассмотренных выше; патоген-специфичный антиген.

[0227] Способы введения генно-инженерных клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут использоваться в комбинации с предлагаемыми способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, *например*, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238 to Gruenberg et al; в патенте США № 4690915, Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*. 8(10):577-85). Смотри, *например*,

Themeli *et al.*, (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara *et al.*, (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

[0228] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, *например*, адоптивная Т-клеточная терапия, осуществляется с помощью аутологичного переноса, при котором клетки выделяются и/или иным образом приготавливаются от субъекта, который должен принимать клеточную терапию, или от образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают у субъекта, *например*, пациента, который нуждается в лечении, и эти клетки после выделения и процессирования вводятся этому же субъекту.

[0229] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, *например*, адоптивная Т-клеточная терапия, осуществляется с помощью аллогенного переноса, при котором клетки выделяются и/или иным образом приготавливаются от субъекта иного, чем субъект, который должен принимать или который в конечном счете принимает Т-клеточную терапию, *например*, первый субъект. В таких вариантах осуществления, клетки затем вводятся другому субъекту, *например*, второму субъекту из того же вида. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты являются генетически идентичными. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты являются генетически сходными. В некоторых вариантах осуществления, второй субъект экспрессирует такой же класс или супертип HLA, как и первый субъект.

[0230] В определенных вариантах осуществления, клетки или индивидуальные популяции подтипов клеток вводятся субъекту в диапазоне примерно от одного миллиона примерно до 100 миллиардов клеток и/или как количество клеток на килограмм массы тела, такое, например, как 1 миллион - примерно 50 миллиардов клеток (например, примерно 5 миллионов клеток, примерно 25 миллионов клеток, примерно 500 миллионов клеток, примерно 1 миллиард клеток, примерно 5 миллиардов клеток, примерно 20 миллиардов клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 40 миллиардов клеток, или диапазон определяется любыми двумя из рассмотренных выше значений), например, примерно 10 миллионов - примерно 100 миллиардов клеток (например, примерно 20 миллионов клеток, примерно 30 миллионов клеток, примерно 40 миллионов клеток, примерно 60 миллионов клеток, примерно 70 миллионов клеток, примерно 80 миллионов клеток, примерно 90 миллионов клеток, примерно 10 миллиардов клеток, примерно 25 миллиардов клеток, примерно 50 миллиардов клеток, примерно 75 миллиардов клеток, примерно 90 миллиардов клеток, или диапазон определяется любыми двумя из рассмотренных выше значений) и в некоторых случаях примерно 100 миллионов клеток - примерно 50 миллиардов клеток (например, примерно 120 миллионов клеток, примерно 250 миллионов клеток, примерно 350 миллионов клеток, примерно 450 миллионов клеток, примерно 650 миллионов клеток, примерно 800 миллионов клеток, примерно 900 миллионов клеток, примерно 3 миллиарда клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 45 миллиардов клеток), или любое абсолютное значение в этих диапазонах и/или как значение на килограмм массы тела. Дозы могут изменяться в зависимости от конкретных атрибутов

заболевания или расстройства и/или пациента и/или других видов лечения.

[0231] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект является человеком, доза содержит меньше примерно, чем  $1 \times 10^8$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), в целом, Т-клеток или мононуклеаров периферической крови (РВМС), например, в диапазоне примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток, например,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  или  $1 \times 10^8$  или таких клеток в целом или в диапазоне между любыми двумя рассмотренными выше значениями.

[0232] Клетки могут вводиться с помощью любых пригодных для использования средств. Клетки вводятся в режиме дозирования для достижения терапевтического воздействия, например, уменьшения опухолевой нагрузки. Дозирование и введение могут зависеть частично от временного графика введения иммуномодулирующего соединения, которое может вводиться до, после и/или одновременно с началом введения Т-клеточной терапии. Различные временные графики дозирования Т-клеточной терапии включают, но, не ограничиваясь этим, одно или множество введений в различных временных точках, введение болюса и импульсное вливание.

### ***1. Композиции и препараты***

[0233] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток Т-клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия, содержащая генно-инженерные клетки с рекомбинантным рецептором антигена, *например*, CAR или TCR, предлагается как композиция или препарат, такой как фармацевтическая композиция или препарат. Такие композиции можно использовать согласно предлагаемым способам, например, при предотвращении или лечении заболеваний, состояний и расстройств.

[0234] В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия, такая как генно-инженерные Т-клетки (*например*, CAR Т-клетки), приготавливают вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, имеется множество пригодных для использования препаратов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Пригодные для использования консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и бензалконийхлорид. В некоторых аспектах, используется смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси, как правило, присутствуют в количестве примерно от 0,0001% примерно до 2% масс от композиции в целом. Носители описаны, *например*, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях и включают, но, не ограничиваясь этим: буферы, такие как фосфатный, цитратный буфер, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол);

низкомолекулярные (меньше примерно, чем 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (*например*, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

[0235] Буферные агенты в некоторых аспектах включаются в композиции. Пригодные для использования буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах, используют смесь двух или более буферных агентов. Буферные агенты или их смеси, как правило, присутствуют в количестве примерно от 0,001% примерно до 4% масс от композиции в целом. Способы приготовления вводимых фармацевтических композиций известны. Иллюстративные способы описаны более подробно, например, в Remington: Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[0236] Препараты могут содержать водные растворы. Препарат или композиция может также содержать несколько активных ингредиентов полезных для конкретного показания заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится с помощью клеток или агентов, где соответствующие активности не влияют отрицательно друг на друга. Такие активные ингредиенты удобно представлять в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, *например*, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, флуороурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин, и тому подобное.

[0237] Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит Т-клетки в количествах эффективных для лечения или предотвращения заболевания или состояния, например, терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическая или профилактическая эффективность в некоторых вариантах осуществления отслеживается с помощью периодической оценки леченых субъектов. Для многократных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение не повторяют, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако и другие режимы дозирования могут быть полезными и могут определяться. Желаемая доза может доставляться посредством одного введения болюса композиции, множества введений болюса композиции или посредством введения композиции непрерывным вливанием.

[0238] Клетки можно вводить с использованием стандартных методик, препаратов

и/или устройств для введения. Предлагаются препараты и устройства, такие как шприцы и флаконы для хранения и введения композиций. Относительно клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или прогениторы можно получать от одного субъекта и вводить тому же субъекту или другому, совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови или из их потомства (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*), можно вводить посредством местной инъекции, включая катетерное введение, системную инъекцию, местную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. Когда вводят терапевтическую композицию (например, фармацевтическую композицию, содержащую генномодифицированные иммунореактивные клетки), она, как правило, приготавливается в форме стандартной единичной дозы для инъекций (раствора, суспензии, эмульсии).

[0239] Препараты включают препараты для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, пульмонарного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального или суппозиторного введения. В некоторых вариантах осуществления, агент или популяции клеток вводят парентерально. Термин “парентерально”, как используется в настоящем документе, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, агент или популяции клеток вводят субъекту, используя периферическую системную доставку посредством внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[0240] В некоторых вариантах осуществления композиции предлагаются как стерильные жидкие препараты, например, изотонические водные растворы, суспензии, эмульсии, дисперсии или вязкие композиции, которые в некоторых аспектах могут с помощью буферов доводиться до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготавливать, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. В дополнение к этому, жидкие композиции несколько удобнее вводить, в частности, посредством инъекции. С другой стороны, вязкие композиции можно приготавливать в соответствующем диапазоне вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, солевой раствор, фосфатный буферный солевой раствор, полиол (например, глицерол, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и пригодные для использования их смеси.

[0241] Стерильные растворы для инъекций можно приготавливать посредством введения клеток в растворитель, например, в смеси с соответствующим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза, или что-либо подобное. Композиции также можно лиофилизировать. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие агенты (например, метилцеллюлозу), буферные агенты для поддержания pH, гелеобразующие добавки или добавки для

увеличения вязкости, консерванты, ароматизирующие агенты, красители, и тому подобное, в зависимости от способа введения и желаемого препарата. В некоторых аспектах можно ознакомиться со стандартными текстами для приготовления соответствующих препаратов.

[0242] Могут добавляться различные добавки, которые усиливают стабильность и стерильность композиций, включая антимикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов может обеспечиваться различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, и тому подобное. Пролонгированное поглощение фармацевтической формы, вводимой как инъекция, может осуществляться при использовании агентов, замедляющих поглощение, например, алюминия моностеарата и желатина.

[0243] Препараты, которые должны использоваться для введения *in vivo*, как правило, являются стерильными. Стерильность можно легко получить, например, посредством фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

[0244] Для предотвращения или лечения заболевания, соответствующая доза может зависеть от типа заболевания, которое лечится, типа агента или агентов, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и хода заболевания, от того вводится ли агент или клетки для превентивных или терапевтических целей, от предыдущей терапии, клинической истории субъекта и ответа на агент или клетки, и от решения лечащего врача. Композиции в некоторых вариантах осуществления удобно вводить субъекту за один раз или как ряд сеансов лечения.

[0245] В некоторых случаях, клеточная терапия вводится как одна фармацевтическая композиция, содержащая клетки. В некоторых вариантах осуществления, данная доза вводится посредством введения одного болюса клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, она вводится посредством введения множества болюсов клеток или агентов, например, в течение периода не более 3 дней, или посредством введения непрерывным вливанием клеток или агентов.

## ***2. Временной график дозирования и введения***

[0246] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток вводится субъектам согласно предлагаемым способам комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, размер или временной график дозирования определяется как функция конкретного заболевания или состояния субъекта. Можно эмпирически определить размер или временной график дозирования для конкретного заболевания с учетом предлагаемого описания.

[0247] В определенных вариантах осуществления, клетки или индивидуальные популяции подтипов клеток вводятся субъекту в диапазоне примерно от 0,1 миллиона примерно до 100 миллиардов клеток и/или как количество клеток на килограмм массы тела субъекта, такое, *например*, как от 0,1 миллиона примерно до 50 миллиардов клеток (*например*, примерно 5 миллионов клеток, примерно 25 миллионов клеток, примерно 500 миллионов клеток, примерно 1 миллиард клеток, примерно 5 миллиардов клеток, примерно

20 миллиардов клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 40 миллиардов клеток, или их диапазон определяется любыми двумя из рассмотренных выше значений), от 1 миллиона примерно до 50 миллиардов клеток (*например*, примерно 5 миллионов клеток, примерно 25 миллионов клеток, примерно 500 миллионов клеток, примерно 1 миллиард клеток, примерно 5 миллиардов клеток, примерно 20 миллиардов клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 40 миллиардов клеток, или их диапазон определяется любыми двумя из рассмотренных выше значений), *например*, примерно от 10 миллионов примерно до 100 миллиардов клеток (*например*, примерно 20 миллионов клеток, примерно 30 миллионов клеток, примерно 40 миллионов клеток, примерно 60 миллионов клеток, примерно 70 миллионов клеток, примерно 80 миллионов клеток, примерно 90 миллионов клеток, примерно 10 миллиардов клеток, примерно 25 миллиардов клеток, примерно 50 миллиардов клеток, примерно 75 миллиардов клеток, примерно 90 миллиардов клеток, или их диапазон определяется любыми двумя из рассмотренных выше значений), и в некоторых случаях примерно от 100 миллионов клеток примерно до 50 миллиардов клеток (*например*, примерно 120 миллионов клеток, примерно 250 миллионов клеток, примерно 350 миллионов клеток, примерно 450 миллионов клеток, примерно 650 миллионов клеток, примерно 800 миллионов клеток, примерно 900 миллионов клеток, примерно 3 миллиардов клеток, примерно 30 миллиардов клеток, примерно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими двумя диапазонами и/или на килограмм массы тела субъекта. Дозы могут изменяться в зависимости от конкретных атрибутов заболевания или расстройства и/или пациента и/или других видов лечения. В некоторых вариантах осуществления, такие значения относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; в других вариантах осуществления, они относятся к количеству Т-клеток или РВМС или введенных клеток в целом.

[0248] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, от или примерно от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, или от или примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей количество клеток, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере,  $1 \times 10^5$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, по меньшей мере, или, по меньшей мере,  $1 \times 10^6$ , по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере,  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере,  $1 \times 10^8$  таких клеток.

[0249] В некоторых вариантах осуществления, *например*, когда субъект является человеком, доза содержит меньше примерно, чем  $5 \times 10^8$  клеток, экспрессирующих

рекомбинантный рецептор (например, CAR), в целом, Т-клеток или мононуклеаров периферической крови (PBMC), например, в диапазоне примерно  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^8$  таких клеток, например,  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  таких клеток в целом или количество в диапазоне между любыми двумя рассмотренными выше значениями.

[0250] В некоторых вариантах осуществления, количество относится к общему количеству CD3+ или CD8+, в некоторых случаях также к клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор (например, CAR+). В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  Т-клеток CD3+ или CD8+, в целом, или клеток CD3+ или CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, от или примерно от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  Т-клеток CD3+ или CD8+, в целом, или клеток CD3+ или CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или от или примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  Т-клеток CD3+ или CD8+, в целом, или клеток CD3+ или CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  клеток CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+, в целом, от или примерно от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  клеток CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+, в целом, или от или примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+ в целом, в каждом случае, включительно.

[0251] В некоторых вариантах осуществления, доза генно-инженерных клеток содержит от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,

$1 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^7$ - $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $2,5 \times 10^7$ - $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^8$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, или  $2,5 \times 10^8$ - $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом.

[0252] В некоторых вариантах осуществления, доза генно-инженерных клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток.

[0253] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, от или примерно от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом или от или примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы клеток, содержащей количество клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, Т-клеток, в целом, или мононуклеаров периферической крови (РВМС), в целом, по меньшей мере, или, по меньшей мере,  $1 \times 10^6$ , по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^7$ , по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^8$  таких клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество относится к общему количеству CD3+ или CD8+, в некоторых случаях, также к клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор

(например, CAR+). В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$ , Т-клеток CD3+ или CD8+, в целом, или клеток CD3+ или CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, от или примерно от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$ , Т-клеток CD3+ или CD8+, в целом, или клеток CD3+ или CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или от или примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$ , Т-клеток CD3+ или CD8+, в целом, или клеток CD3+ или CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  клеток CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+, в целом, от или примерно от  $5 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  клеток CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+, в целом, или от или примерно от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  клеток CD3+/CAR+ или CD8+/CAR+, в целом, в каждом случае, включительно.

[0254] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки дозы включают Т-клетки CD4+, Т-клетки CD8+ или Т-клетки CD4+ и CD8+.

[0255] В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъект является человеком, Т-клетки CD8+ дозы, включая дозу, содержащую Т-клетки CD4+ и CD8+, содержат примерно от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^8$  клеток CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), в целом, например, в диапазоне примерно от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  таких клеток,  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  таких клеток, в целом, или количество в диапазоне между любыми двумя рассмотренными выше значениями. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводится множество доз, и каждая из доз или доза в целом может находиться в диапазоне любых из рассмотренных выше величин. В некоторых вариантах осуществления, дозирование клеток включает введение от или примерно от  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  Т-клеток CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, от  $1 \times 10^7$  до  $2,5 \times 10^7$  Т-клеток CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, от или примерно от  $1 \times 10^7$  до  $0,75 \times 10^8$  Т-клеток CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления, дозирование клеток содержит введение  $1 \times 10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  или около того Т-клеток CD8+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в целом.

[0256] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводится субъекту как одна доза или вводится только один раз за период две недели один месяц, три месяца, шесть месяцев, 1 год или более.

[0257] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение дозы, содержащей количество клеток, которое равно, по меньшей мере, равно или, по меньшей мере, примерно равно, или равно, или примерно равно  $0,1 \times 10^6$  клеток/кг массы тела субъекта,  $0,2 \times 10^6$  клеток/кг,  $0,3 \times 10^6$  клеток/кг,  $0,4 \times 10^6$  клеток/кг,  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг,  $1 \times 10^6$  клеток/кг,  $2,0 \times 10^6$  клеток/кг,  $3 \times 10^6$  клеток/кг или  $5 \times 10^6$  клеток/кг.

[0258] В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает

введение дозы, содержащей количество клеток в диапазоне между или в диапазоне примерно между  $0,1 \times 10^6$  клеток/кг массы тела субъекта и  $1,0 \times 10^7$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг и  $5 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг и  $3 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг и  $2 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг и  $1 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $1,0 \times 10^6$  клеток/кг массы тела субъекта и  $5 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $1,0 \times 10^6$  клеток/кг и  $3 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $1,0 \times 10^6$  клеток/кг и  $2 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $2,0 \times 10^6$  клеток/кг массы тела субъекта и  $5 \times 10^6$  клеток/кг, в диапазоне между или примерно между  $2,0 \times 10^6$  клеток/кг и  $3 \times 10^6$  клеток/кг или в диапазоне между или примерно между  $3,0 \times 10^6$  клеток/кг массы тела субъекта и  $5 \times 10^6$  клеток/кг, в каждом случае, включительно.

[0259] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит их количество в диапазоне между или примерно между  $2 \times 10^5$  клеток/кг и  $2 \times 10^6$  клеток/кг или около того, например, в диапазоне между или примерно между  $4 \times 10^5$  клеток/кг и  $1 \times 10^6$  клеток/кг или около того или в диапазоне между или примерно между  $6 \times 10^5$  клеток/кг и  $8 \times 10^5$  клеток/кг или около того. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не более  $2 \times 10^5$  клеток (*например*, антиген-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клетки/кг), например, не более или не более примерно, чем  $3 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $4 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $5 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $6 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $7 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $8 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $9 \times 10^5$  клеток/кг, не более или не более примерно, чем  $1 \times 10^6$  клеток/кг или не более или не более примерно, чем  $2 \times 10^6$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $2 \times 10^5$  или около того клеток (*например*, антиген-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм массы тела субъекта (клетки/кг), например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $3 \times 10^5$  клеток/кг или около того, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $4 \times 10^5$  клеток/кг около того, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или при или примерно  $5 \times 10^5$  клеток/кг, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $6 \times 10^5$  клеток/кг или около того, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $7 \times 10^5$  клеток/кг или около того, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $8 \times 10^5$  клеток/кг или около того, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $9 \times 10^5$  клеток/кг или около того, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $1 \times 10^6$  клеток/кг или около того или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или  $2 \times 10^6$  клеток/кг или около того.

[0260] В контексте адоптивной клеточной терапии, введение данной “дозы” клеток охватывает введение данного количества или числа клеток как одной композиции и/или одного непрерывного введения, *например*, как одну инъекцию или непрерывное вливание,

а также охватывает введение данного количества или числа клеток как разделенной дозы, предлагаемой во множестве индивидуальных композиций или вливаний в течение заданного периода времени, который не больше 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах, доза представляет собой одно или непрерывное введение указанного количества клеток, осуществляемое или начинаемое в одной временной точке. В некоторых контекстах, однако, дозу вводят во множестве инъекций или вливаний за период не больше трех дней, например, один ежедневно в течение трех дней или двух дней или с помощью множества вливаний в однодневный период.

[0261] Таким образом, в некоторых аспектах, клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы вводят во множестве композиций, коллективно содержащих все клетки дозы.

[0262] Термин “разделенная доза” относится к дозе, которая разделена так, что она вводится в течение нескольких дней. Этот тип дозирования охватывается настоящими способами и рассматривается как одна доза. В некоторых вариантах осуществления, клетки разделенной дозы вводят во множестве композиций, коллективно содержащих все клетки дозы, за период не более трех дней.

[0263] Таким образом, доза клеток может вводиться как разделенная доза. Например, в некоторых вариантах осуществления, доза может вводиться субъекту за 2 дня или за 3 дня. Иллюстративные способы отдельного дозирования включают введение 25% дозы в первый день и введение остальных 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления, 33% дозы можно вводить в первый день, а остальные 67% вводят во второй день. В некоторых аспектах, 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят во второй день и 60% дозы вводят в третий день. В некоторых вариантах осуществления, разделенную дозу не распределяют больше чем на 3 дня.

[0264] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, как правило, является достаточно большой, чтобы быть эффективной при уменьшении нагрузки заболевания.

[0265] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводятся в желаемой дозировке, которая в некоторых аспектах содержит желаемую дозу или количество клеток или типа (типов) клеток и/или желаемое отношение типов клеток. Таким образом, дозировка клеток в некоторых вариантах осуществления основывается на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и на желаемом отношении индивидуальных популяций или подтипов, таком как отношение CD4<sup>+</sup> к CD8<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления, дозировка клеток основывается на желаемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в индивидуальных популяциях или индивидуальных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления, дозировка основывается на комбинации таких признаков, например, желаемого количества клеток в целом, желаемого отношения и желаемого общего количества клеток в индивидуальных популяциях.

[0266] В некоторых вариантах осуществления, популяции или подтипы клеток, такие как Т-клетки CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>, вводят при допустимой погрешности, или в ее пределах,

желаемой дозы клеток в целом, например, желаемой дозы Т-клеток. В некоторых аспектах, желаемая доза представляет собой желаемое количество клеток или желаемое количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят Т-клетки, *например*, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза представляет собой минимальное количество клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела, или превышает его. В некоторых аспектах, среди клеток в целом, вводимых как желаемая доза, индивидуальные популяции или подтипы присутствуют при желаемом выходном отношении (например, отношении  $CD4^+$  к  $CD8^+$ ), или около него, *например*, в пределах определенной допустимой погрешности или ошибки такого отношения.

[0267] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят при допустимой погрешности или в ее пределах, для желаемой дозы одной или нескольких индивидуальных популяций или подтипов клеток, таких как желаемая доза клеток  $CD4^+$  и/или желаемая доза клеток  $CD8^+$ . В некоторых аспектах, желаемая доза представляет собой желаемое количество клеток подтипа или популяции или желаемое количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому клетки вводятся, *например*, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза составляет или превышает минимальное количество клеток популяции или подтипа или минимальное количество клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

[0268] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основывается на желаемой фиксированной дозе клеток в целом и на желаемом отношении и/или основывается на желаемой фиксированной дозе одного или нескольких, *например*, каждого, из индивидуальных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основывается на желаемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и желаемом отношении клеток  $CD4^+$  и  $CD8^+$  и/или основывается на желаемой фиксированной или минимальной дозе клеток  $CD4^+$  и/или  $CD8^+$ .

[0269] В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в допустимом диапазоне или в пределах желаемого выходного отношения множества популяций или подтипов клеток, например, клеток  $CD4^+$  и  $CD8^+$  или их подтипов. В некоторых аспектах, желаемое отношение может представлять собой конкретное отношение или может представлять собой некоторый диапазон отношений. Например, в некоторых вариантах осуществления, желаемое отношение (*например*, отношение клеток  $CD4^+$  и  $CD8^+$ ) находится в пределах между 1:5 или около того и 5:1 или около того (или больше примерно, чем 1:5 и меньше примерно, чем 5:1) или в диапазоне между 1:3 или около того, и 3:1 или около того (или больше примерно, чем 1:3 и меньше примерно, чем 3:1), например, в диапазоне между 2:1 или около того и 1:5 или около того (или больше примерно, чем 1:5 и меньше примерно, чем 2:1, например, составляет или примерно составляет 5:1, 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9: 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах, допустимая погрешность находится в пределах примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4% примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%,

примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50% от желаемого отношения, включая любое значение в этих диапазонах.

[0270] В конкретных вариантах осуществления, количества и/или концентрации клеток относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR). В других вариантах осуществления, количества и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или мононуклеаров периферической крови (РВМС).

[0271] В некоторых аспектах, размер дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предыдущее лечение, *например*, химиотерапию, нагрузку заболевания у субъекта, такую как нагрузка, объем, размер опухоли или степень, величина или тип метастаз, стадию и/или вероятность или частоту развития токсичных результатов у субъекта токсичных результатов, *например*, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

[0272] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения в комбинации с клетками способно значительно увеличить размножение или пролиферацию клеток и таким образом уменьшить дозу клеток, которая может вводиться субъекту. В некоторых случаях, предлагаемые способы позволяют уменьшить дозу таких клеток, которые должны вводиться, для достижения такой же или лучшей эффективности лечения, как для дозы в способе, в котором клеточную терапию вводят без введения иммуномодулирующего соединения, *например*, по меньшей мере, в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз меньше, чем доза в способе, в котором клеточную терапию вводят без введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида или Соединения 1.

[0273] В некоторых вариантах осуществления, *например*, доза содержит количество клеток в диапазоне между или примерно между  $5,0 \times 10^6$  и  $2,25 \times 10^7$ ,  $5,0 \times 10^6$  и  $2,0 \times 10^7$ ,  $5,0 \times 10^6$  и  $1,5 \times 10^7$ ,  $5,0 \times 10^6$  и  $1,0 \times 10^7$ ,  $5,0 \times 10^6$  и  $7,5 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$  и  $2,25 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^6$  и  $2,0 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^6$  и  $1,5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^6$  и  $1,0 \times 10^7$ ,  $1,0 \times 10^7$  и  $2,25 \times 10^7$ ,  $1,0 \times 10^7$  и  $2,0 \times 10^7$ ,  $1,0 \times 10^7$  и  $1,5 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$  и  $2,25 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$  и  $2,0 \times 10^7$ ,  $2,0 \times 10^7$  и  $2,25 \times 10^7$ . В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит количество клеток, которое находится в пределах между, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  и примерно  $15 \times 10^6$  клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, *например*, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые представляют собой CD8+. В некоторых вариантах осуществления, такая доза, *например*, такое целевое количество клеток относится к клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор во вводимой композиции, в целом.

[0274] В некоторых вариантах осуществления, *например*, более низкая доза содержит меньше примерно, чем  $5 \times 10^6$  клеток, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), Т-клеток и/или РВМС на килограмм массы тела субъекта, *например* меньше примерно, чем  $4,5 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $3,5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $1,5 \times$

$10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$  или  $1 \times 10^5$  таких клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления, более низкая доза содержит меньше примерно, чем  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  или  $1 \times 10^6$  таких клеток на килограмм массы тела субъекта или их количество в диапазоне между любыми двумя рассмотренными выше значениями. В некоторых вариантах осуществления, такие значения относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; в других вариантах осуществления, это относится к количеству вводимых Т-клеток или РВМС или клеток в целом.

[0275] В некоторых вариантах осуществления, субъект принимает множество доз, например, две или более доз или множество последовательных доз клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъект принимает следующую дозу, например, вторую дозу, которая вводится приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, множество последовательных доз вводят после первой дозы, так что дополнительная доза или дозы вводятся после введения последующей дозы. В некоторых аспектах, количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же как или сходным с первой дозой и/или последующей дозой. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъекту может вводиться одна или несколько последующих доз клеток. В некоторых вариантах осуществления, последующую дозу клеток вводят позже, чем через или примерно позже, чем через 7 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней или 35 дней после начала введения первой дозы клеток. Последующая доза клеток может быть больше, приблизительно такой же или меньше, чем первая доза. В некоторых вариантах осуществления, введение Т-клеточной терапии, например, введение первой и/или второй дозы клеток, может повторяться.

[0276] В некоторых вариантах осуществления, начало введения клеточной терапии, *например*, дозы клеток или первой дозы из разделенной дозы клеток, осуществляют до (перед), одновременно или после (последовательно или после) введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, *Соединения 1* или *Соединения 2*.

[0277] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток или последующая доза клеток вводится одновременно с началом введения иммуномодулирующего соединения в соответствии с способами комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток или последующая доза клеток вводится в тот же день, когда начинают вводить иммуномодулирующее соединение в соответствии с способами комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток или последующая доза клеток вводится в диапазоне 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней после начала введения иммуномодулирующего соединения в соответствии с способами комбинированной терапии.

[0278] В некоторых вариантах осуществления, доза клеток или последующая доза

клеток вводится до старта или начала введения иммуномодулирующего соединения в соответствии с предлагаемой комбинированной терапией. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток вводится, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 1 час, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 2 часа, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 3 часа, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 6 часов, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 12 часов, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 1 день, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 2 дня, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 3 дня, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 4 дня, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 5 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 6 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 7 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 12 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 14 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 15 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 21 день, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 28 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 30 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 35 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно за 42 дня по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 60 дней или, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, за 90 дней перед введением иммуномодулирующего соединения в соответствии с предлагаемой комбинированной терапией.

[0279] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения (например, леналидомида или Соединения 1) в соответствии с предлагаемой комбинированной терапией происходит в момент времени, в который понижается функциональность Т-клеток, ассоциированных или вероятно ассоциированных с предыдущим введением иммунотерапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-Т-клеточная терапия), по сравнению с функциональностью Т-клеток в момент времени перед началом иммунотерапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточная терапия) или в предыдущей временной точке после начала Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает, после введения дозы клеток Т-клеточной терапии, *например*, адоптивной Т-клеточной терапии, но до введения иммуномодулирующего соединения, оценку образца от субъекта относительно одной или нескольких функций Т-клеток, таких как размножение или персистенность клеток, например, как определяется по их уровню или их количеству в крови или по другим фенотипам или желаемым результатам, как описано в настоящем документе, *например*, как описано в Разделе III. В некоторых вариантах осуществления, способ включает, после введения дозы клеток Т-клеточной терапии, *например*, адоптивной Т-клеточной терапии, но перед введением иммуномодулирующего соединения, оценку образца от субъекта относительно экспрессирования одного или нескольких маркеров истощения. Различные параметры для определения или оценки режима комбинированной терапии описаны в Разделе III.

## В. ВВЕДЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ

[0280] Предлагаемые способы, композиции, комбинации, наборы и применения комбинированной терапии включают введение иммуномодулирующего соединения, такого как структурный или функциональный аналог или производное талидомида, и/или ингибитора E3 убиквитинлигазы, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, которые могут вводиться до, после, в ходе, одновременно или примерно одновременно, последовательно и/или чередуясь с введением Т-клеточной терапии, *например*, введением Т-клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена (CAR).

[0281] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой одно соединение из класса иммуномодулирующих соединений, которое представляет собой структурный или функциональный аналог или производное талидомида и/или ингибитор E3 убиквитинлигазы. В конкретных вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор E3 убиквитинлигазы.

[0282] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение связывает цереблон (CRBN). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение связывает комплекс CRBN и E убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение связывает CRBN и комплекс CRBN и E убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение ап-регулирует экспрессию белка или гена CRBN. В некоторых аспектах, CRBN представляет собой субстратный адаптор для CRL4<sup>CRBN</sup> E3 убиквитинлигазы и модулирует специфичность фермента. В некоторых вариантах осуществления, связывание CRB или комплекса CRBN и E убиквитинлигазы ингибирует активность E3 убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение индуцирует убиквитинирование IKZF1 (Ikaros) и IKZF3 (Aiolos) и/или индуцирует деградацию IKZF1 (Ikaros) и IKZF3 (Aiolos). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение индуцирует убиквитинирование казеинкиназы 1A1 (CK1 $\alpha$ ) посредством E3 убиквитинлигазы CRL4<sup>CRBN</sup>. В некоторых вариантах осуществления, убиквитинирование CK1 $\alpha$  дает в результате деградацию CK1 $\alpha$ .

[0283] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор фактора транскрипции Ikaros (IKZF1). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает убиквитинирование Ikaros. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает деградацию Ikaros. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение даун-регулирует экспрессирование белка или гена Ikaros. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения вызывает понижение уровней белка Ikaros.

[0284] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор фактора транскрипции Aiolos (IKZF3). В некоторых

вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает убиквитинирование Aiolos. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает деградацию Aiolos. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение даун-регулирует экспрессирование белка или гена Aiolos. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения вызывает понижение уровней белка Aiolos.

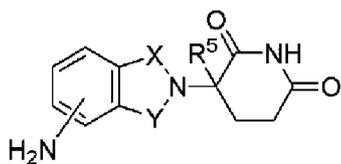
[0285] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор факторов транскрипции, как Ikaros (IKZF1), так и Aiolos (IKZF3). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает убиквитинирование как Ikaros, так и Aiolos. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает деградацию как Ikaros, так и Aiolos. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение усиливает убиквитинирование и деградацию как Ikaros, так и Aiolos. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения вызывает понижение как уровней белка Aiolos, так и уровней белка Ikaros.

[0286] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой селективное цитокин-ингибиторное лекарственное средство (SelCID). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение ингибирует активность фосфодиэстеразы-4 (PDE4). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение подавляет ферментативную активность CDC25 фосфатаз. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение изменяет внутриклеточную миграцию фосфатаз CDC25.

[0287] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение для комбинированной терапии представляет собой талидомид (2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1H-изоиндол-1,3(2H)-дион) или аналог или производное талидомида. В определенных вариантах осуществления, производное талидомида включает структурные варианты талидомида, которые имеют сходную биологическую активность. Иллюстративные производные талидомида включают, но, не ограничиваясь этим леналидомид (REVLIMMUNOMODULATORY COMPOUND™; Celgene Corporation), помалидомид (также известный как ACTIMMUNOMODULATORY COMPOUND™ или POMALYST™ (Celgene Corporation)), CC-1088, CDC-501 и CDC-801, и соединения, описанные в патентах США №№ 5712291; 7320991; и 8716315; в заявке на патент США № 2016/0313300 и в публикациях №№ WO 2002/068414 и WO 2008/154252.

[0288] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующие соединения представляют собой 1-оксо- и 1,3 диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины, замещенные амина на бензольном кольце, как описано в патенте США № 5635517, который включается в настоящий документ в качестве ссылки.

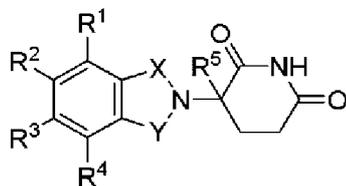
[0289] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение следующей формулы:



[0290], где один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляют собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>- и R<sup>5</sup> представляет собой водород или низший алкил или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления, X представляет собой -C(O)- и Y представляет собой -CH<sub>2</sub>-. В некоторых вариантах осуществления, как X, так и Y представляют собой -C(O)-. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>5</sup> представляет собой водород. В других вариантах осуществления, R<sup>5</sup> представляет собой метил.

[0291] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение, которое принадлежит к классу замещенных 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)фталевых иммуномодулирующих соединений и замещенных 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолов, таких как те, которые описаны в патентах США №№ 6281230; 6316471; 6335349; и 6476052 и в заявке на Международный патент № PCT/US97/13375 (Международная публикация № WO 98/03502), каждая из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки.

[0292] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение следующей формулы:



где

один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляют собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>-;

(1) каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкокси с 1-4 атомами углерода, или

(2) один из R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> представляет собой -NHR<sup>a</sup>, а оставшиеся R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляют собой водород, где R<sup>a</sup> представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода;

R<sup>5</sup> представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода, бензил или галоген;

при условии, что R<sup>5</sup> является иным, чем водород, если X и Y представляют собой -C(O)- и (i) каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляет собой фтор или (ii) один из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляет собой амино;

или их фармацевтически приемлемую соль.

[0293] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение

представляет собой соединение, которое принадлежит к классу изоиндол-иммуномодулирующих соединений, описанных в патенте США № 7091353, публикации патента США № 2003/0045552 и заявке на Международный патент № PCT/USOI/50401 (Международная публикация № WO02/059106), каждая из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки. Например, в некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой [2-(2,6-диоксо-пиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил]амид; сложный трет-бутиловый эфир (2-(2,6-диоксо-пиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил)карбаминовой кислоты; 4-(аминометил)-2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-изоиндолин-1,3-дион; N-(2-(2,6-диоксо-пиперидин-3-ил)-1,3-диоксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-4-илметил)ацетамид; N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}циклопропилкарбоксамид; 2-хлор-N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}ацетамид; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-3-пиридилкарбоксамид; 3-{1-оксо-4-(бензиламино)изоиндолин-2-ил}пиперидин-2,6-дион; 2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-4-(бензиламино)изоиндолин-1,3-дион; N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}пропанамид; N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}-3-пиридилкарбоксамид; N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}гептанамид; N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)метил}-2-фурилкарбоксамид; {N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)карбамоил}метилацетат; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)пентанамид; N-(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-2-тиенилкарбоксамид; N-{(2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил]метил}(бутиламино)карбоксамид; N-[[2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил]метил}(октиламино)карбоксамид; или N-[[2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил]метил}(бензиламино)карбоксамид.

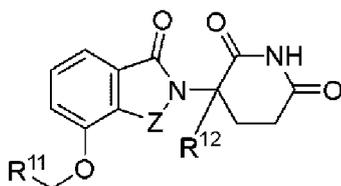
[0294] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение, которое принадлежит к классу изоиндол-иммуномодулирующих соединений, описанных в публикации заявки на патент США № 2002/0045643, в Международной публикации № WO 98/54170 и в патенте США № 6395754, каждый из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой тетразамещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолины, описанные в патенте США № 5798368, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 1-оксо- и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины, описанные в патенте США № 6403613, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой 1-оксо- или 1,3-диоксоизоиндолин замещенный в 4- или 5-положении индолинового кольца, как описано в патенте США № 6380239 и в патенте США № 7244759, которые, оба,

включаются в настоящий документ в качестве ссылки.

[0295] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 2-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил)-4-карбамоил-масляную кислоту или 4-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил)-4-карбамоил-масляную кислоту. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 4-карбамоил-4-{4-[(фуран-2-ил-метил)-амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил}-масляную кислоту, 4-карбамоил-2-{4-[(фуран-2-ил-метил)-амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил}-масляную кислоту, 2-{4-[(фуран-2-ил-метил)-амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил}-4-фенилкарбамоил-масляную кислоту или 2-{4-[(фуран-2-ил-метил)-амино]-1,3-диоксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил}-пентандиоевую кислоту.

[0296] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой изоиндолин-1-он или изоиндолин-1,3-дион, замещенный в 2-положении 2,6-диоксо-3-гидроксипиперидин-5-илом, как описано в патенте США № 6458810, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион или его энантиомер или смесь энантиомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион.

[0297] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 4'-арилметокси-изоиндолиновое соединение, как описано в патенте США № 9828361, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение следующей формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер, где:

Z представляет собой C=O или CH<sub>2</sub>;

R<sup>11</sup> представляет собой Z<sup>1</sup>-R<sup>13</sup>;

R<sup>12</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил;

Z<sup>1</sup> представляет собой 6-10 - членный арил, гетероарил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или связь;

R<sup>13</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-арил, где арил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами; самими по

себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероцикл, где гетероцикл необязательно является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе, необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе, замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероарил, где гетероарил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; и

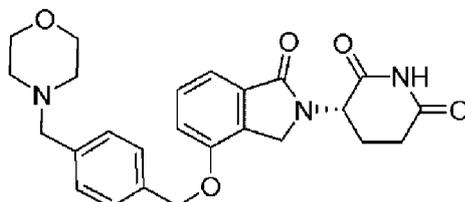
n равно 0, 1, 2 или 3.

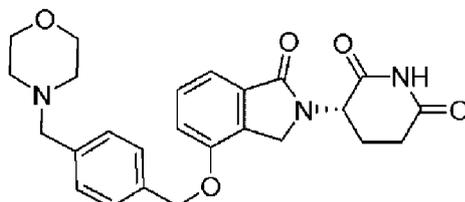
[0298] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион называется также (3S)-3-[7-[[4-(морфолин-4-илметил)фенил]метокси]-3-оксо-1H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-дион, (S)-3-(4-((4-(морфолинометил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион или ибердомид. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ибердомид или ибердомид гидрохлорид.

[0299] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой энантиомер или смесь энантиомеров (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-

изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (R)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой сольват (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой гидрат (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соль или твердую форму 3-(4-((4-(морфолинометил)бензил)окси)-1-охоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона или их стереоизомер, как описано в патенте США № 9629849, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль 3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона. Например, в некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой гидрохлоридную соль (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона. В определенных вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой Форму А кристаллической формы гидрохлоридной соли (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона, как описано в патенте США № 9629849. В некоторых вариантах осуществления, Форма А кристаллической формы гидрохлоридной соли (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона характеризуется пиками, расположенными при  $t$  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или во всех следующих или в следующих примерных положениях: 9,69, 12,82, 15,09, 15,94, 16,76, 17,65, 19,44, 19,80, 2230, 22,47, 22,95, 23,02, 24,29, 24,48, 24,70, 26,27, 26,77, 27,60, 29,43, 29,72 и 32,91 градуса  $2\theta$ . В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой соль, гидрат, ангидрат или сольват гидрохлоридной соли 3-(4-((4-(морфолинометил)бензил)окси)-1-охоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее

соединение представляет собой полиморф (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение



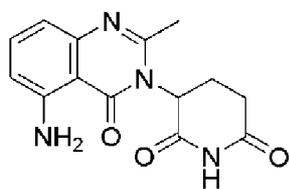
представляет собой , или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф (ниже - Соединение 2).

[0300] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение является таким, как описано в Oshima, K. *et al.*, *Nihon Rinsho.*, 72(6):1130-5 (2014); Millrine, D. *et al.*, *Trends Mol Med.*, 23(4):348-364 (2017); и Collins, *et al.*, *Biochem J.*, 474(7):1127-1147 (2017).

[0301] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ингибитор E3 убиквитинлигазы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой производное талидомида. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой структурный и/или функциональный аналог талидомида. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой леналидомид, помалидомид, авадомид или их фармацевтически приемлемую соль.

[0302] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой леналидомид, помалидомид, авадомид, стереоизомер леналидомида, помалидомида, авадомид или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой леналидомид, стереоизомер леналидомида или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф.

[0303] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой авадомид, который также известен как 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру



(Формула I) или представляет собой его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный

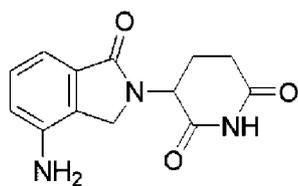
кристалл, клатрат или полиморф (ниже - Соединение 1).

[0304] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой энантиомер или смесь энантиомеров 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой сольват 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой гидрат 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой полиморф 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение имеет структуру Формулы I.

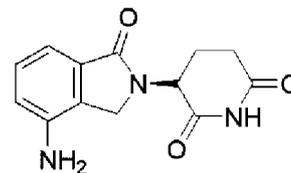
[0305] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой леналидомид, который также известен как 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион или представляет собой его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, леналидомид представляет собой 2,6-пиперидиндион, 3-(4-амино-1,3-дигидро-1-оксо-2Н-изоиндол-2-ил)-, 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)-2,6-пиперидиндион, 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)-2,6-пиперидиндион, 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион, 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион, 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион, всех их можно использовать взаимозаменяемо, или представляет собой его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф.

[0306] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (*R*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (*S*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой смесь (*R*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона и (*S*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона.

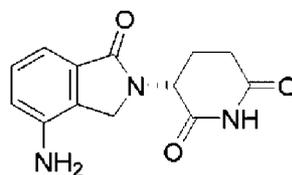
[0307] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение



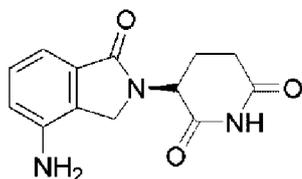
представляет собой (Формула II) или его энантиомер или смесь энантиомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления,



иммуномодулирующее соединение представляет собой (Формула IA) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующее

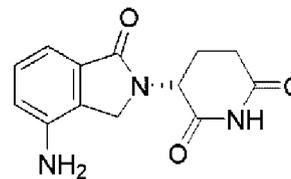


соединение представляет собой (Формула IB) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В определенных вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение



содержит смесь

(Формула IIIA) и

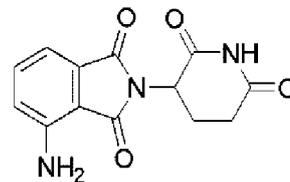


(Формула IIIB) или их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты, со-кристаллы, клатраты или полиморфы.

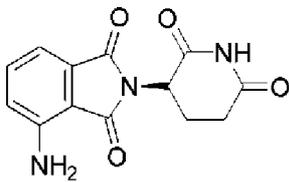
[0308] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой энантиомер или смесь энантиомеров 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона или их фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой сольват (*R*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона и/или (*S*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой гидрат (*RS*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона и/или (*S*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль (*R*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона и/или (*S*)-3-(4-

амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой леналидомид или 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение имеет структуру Формулы II. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение имеет структуру Формулы IIА или Формулы IIВ или представляет собой их смесь.

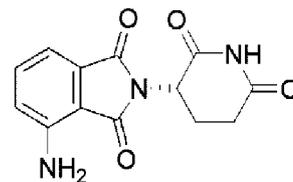
[0309] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой помалидомид, который также известен как 4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион или представляет собой его энантиомер или смесь энантиомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления,



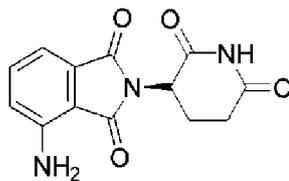
иммуномодулирующее соединение представляет собой (Формула III) или его энантиомер или смесь энантиомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой



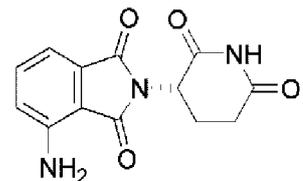
(Формула IIIА) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В других вариантах осуществления,



иммуномодулирующее соединение представляет собой (Формула IIIB) или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф. В определенных вариантах осуществления, иммуномодулирующее



(Формула IIIА) и

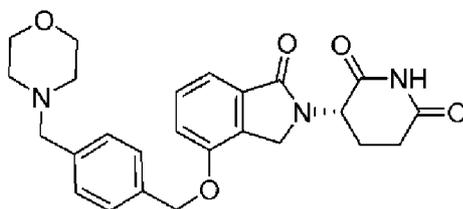


соединение содержит смесь

(Формула IIIB) или их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты, со-кристаллы, клатраты или полиморфы.

[0310] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой энантиомер или смесь энантиомеров 4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона или фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф 4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (*R*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион и/или (*S*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион или фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф (*R*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона и/или (*S*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой сольват (*R*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона и/или (*S*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой гидрат (*R*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона и/или (*S*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль (*R*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона и/или (*S*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой (*R*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион, (*S*)-4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион или их смесь в любом отношении. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение имеет структуру Формулы III. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение имеет структуру Формулы IIIА или Формулы IIIВ или их смесь.

[0311] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ибердомид, который также известен как (*S*)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион, имеющий



следующую структуру

(Формула IV) или представляет

собой его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф (ниже - Соединение 2). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой ибердомид гидрохлорид.

[0312] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой или содержит леналидомид. Леналидомид одобрен FDA для лечения

множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, ассоциированного с делецией 5q, а совсем недавно - рецидивной/не поддающейся лечению лимфомы мантийных клеток (MCL). Леналидомид представляет собой синтетическое производное талидомида и, как понимают в настоящее время, множество иммуномодулирующих воздействий, включая укрепление образования иммунных синапсов между Т-клеткой и антиген-презентирующими клетками (APC). Например, в некоторых случаях, леналидомид модулирует ответы Т-клеток и дает в результате увеличение продуцирования интерлейкина (IL)-2 в Т-клетках CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, индуцирует сдвиг ответов Т-хелперов (Th) от Th2 до Th1, ингибирует размножение регуляторного подмножества Т-клеток (Treg) и улучшает функционирование иммунологических синапсов при фолликулярной лимфоме (FL) и хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) (Otahal et al., Oncoimmunology (2016) 5(4):e1115940). Леналидомид также имеет прямую туморицидную активность у пациентов с множественной миеломой (ММ) и прямо или косвенно модулирует выживаемость клеток опухоли CLL, воздействуя на стромальные клетки, такие как трофоцитоподобные клетки, находящиеся в **обнаруживающей** в окружающей микросреде лимфоидных тканей.

### ***1. Композиции и препараты***

[0313] В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений комбинированной терапии, предлагаемой в настоящем документе, комбинированная терапия может вводиться в одной или нескольких композициях, *например*, в фармацевтической композиции, содержащей иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2.

[0314] В некоторых вариантах осуществления, композиция, *например*, фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид или Соединение 1, может содержать носители, такие как разбавитель, вспомогательное вещество, наполнитель или несущая среда, вместе с которыми вводятся иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2 и/или клетки. Примеры пригодных для использования фармацевтических носителей описаны в “Remington’s Pharmaceutical Sciences” by E. W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, как правило, в очищенной форме, вместе с пригодным для использования количеством носителя, чтобы обеспечить форму для соответствующего введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масло из нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. Также в качестве жидких носителей можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерола, в частности, для растворов для инъекций. Фармацевтические композиции могут содержать один или несколько разбавителей, вспомогательных веществ, антиадгезивов, связующих, покрытий, наполнителей, ароматизаторов, красителей, смазывающих веществ, глидантов,

консервантов, детергентов, сорбентов, эмульгирующих агентов, фармацевтических наполнителей, буферных агентов для поддержания рН или подсластителей и их комбинация. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может представлять собой жидкость, твердый продукт, лиофилизированный порошок, иметь форму геля и/или представлять собой их комбинацию. В некоторых аспектах, выбор носителя определяется частично конкретным ингибитором и/или способом введения.

[0315] Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях и включают, но, не ограничиваясь этим: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (меньше примерно, чем 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (*например*, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG), стабилизаторы и/или консерванты. Композиции, содержащие иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид или Соединение 1, могут также лиофилизироваться.

[0316] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции могут приготавливаться для введения с помощью любого известного способа, включая внутримышечную, внутривенную, интрадермальную, внутриочаговую, внутрибрюшинную инъекцию, подкожное, внутриопухоловое, эпидуральное, назальное, пероральное, вагинальное, ректальное, местное, локальное, ушное, ингаляционное, буккальное (*например*, сублингвальное) и трансдермальное введение или любой способ. В некоторых вариантах осуществления также рассматриваются другие способы введения. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляется посредством вливания болюса, посредством инъекции, *например*, внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транс-мембранной инъекции, подсклеральной инъекции, интрахороидальной инъекции, интракамеральной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, подконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, околобульбарной инъекции или постериоральной окологсклеральной доставки. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют парентерально, интрапульмонарно и интраназально и, если это желательно для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные вливания включает внутримышечное,

внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят посредством введения одного болюса. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят посредством введения множества болюсов, например, в течение периода не более 3 дней или введение с помощью непрерывного вливания.

[0317] В некоторых вариантах осуществления, введение может быть локальным, местным или системным, в зависимости от локуса лечения. В некоторых вариантах осуществления локальное введение в область, нуждающуюся в лечении, может реализоваться, например, но, не ограничиваясь этим, посредством локального вливания в ходе хирургической операции, посредством местного нанесения, *например*, в комбинации с обработкой ран после хирургической операции, посредством инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория или посредством импланта. В некоторых вариантах осуществления, композиции также можно вводить вместе с другими биологически активными агентами, либо последовательно, поочередно, либо в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления, введение также может включать системы с контролируемым высвобождением, включая препараты с контролируемым высвобождением и устройство с контролируемым высвобождением, например, посредством насоса. В некоторых вариантах осуществления, введение является пероральным.

[0318] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически и терапевтически активные соединения и их производные, как правило, приготавливают и вводят в стандартных единичных дозированных формах или во множестве дозированных форм. Каждая стандартная единичная доза содержит заданное количество терапевтически активного соединения достаточное для оказания желаемого терапевтического воздействия в ассоциации с необходимым фармацевтическим носителем, несущей средой или разбавителем. В некоторых вариантах осуществления, стандартные единичные дозированные формы, включают, но, не ограничиваясь этим, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии и пероральные растворы или суспензии, и эмульсии масла и воды, содержащие соответствующие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Стандартные единичные дозированные формы могут содержаться в ампулах и шприцах или в индивидуально упакованных таблетках или капсулах. Стандартные единичные дозированные формы можно вводить как их часть или как их множество. В некоторых вариантах осуществления, множество дозированных форм представляет собой множество идентичных стандартных единичных дозированных форм, упакованных в одном контейнере для введения в виде отдельной стандартной единичной дозированной формы. Примеры множества дозированных форм включают флаконы, бутылки с таблетками или капсулами или бутылки объемом в одну или несколько пинт или галлонов.

[0319] Активные ингредиенты могут заключаться в микрокапсулы, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые

микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. В определенных вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, приготавливается как комплекс включения, такой как комплекс включения циклодекстрина, или как липосомы. Липосомы могут служить для нацеливания клеток хозяев (например, Т-клеток или НК клеток) на конкретную ткань. Доступно множество способов приготовления липосом, например, как описано, например, в Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980) и в патентах США 4235871, 4501728, 4837028 и 5019369.

[0320] Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, в некоторых аспектах может использовать системы доставки с заданным высвобождением во времени, с задержкой высвобождения и распределенным высвобождением, так что доставка композиции осуществляется заранее и имеет время достаточное, чтобы вызывать сенсбилизацию области, которая должна лечиться. Доступно и известно множество типов систем доставки с высвобождением. Такие системы могут устранить многократные введения композиции, тем самым повышая удобство для субъекта и врача.

[0321] Композиции, содержащие иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, может также лиофилизироваться. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие агенты (например, метилцеллюлозу), буферные агенты для поддержания pH, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизирующие агенты, красители, и тому подобное, в зависимости от способа введения и от желаемого препарата. В некоторых аспектах, можно ознакомиться со стандартными текстами для приготовления пригодных для использования препаратов.

[0322] Могут добавляться различные добавки, которые улучшают стабильность и стерильность композиций, включая antimicrobial консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов может обеспечиваться различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, и тому подобное. Пролонгированное поглощение фармацевтической формы для инъекций можно получить при использовании агентов для замедления поглощения, например, алюминия моностеарата и желатина.

[0323] Можно приготавливать препараты с пролонгированным высвобождением. Соответствующие примеры препаратов с пролонгированным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, эти матрицы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

[0324] В некоторых вариантах осуществления, композиция, содержащая иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Пригодные для использования фармацевтически приемлемые соли добавления кислот

включая соли, которые получают из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и из органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, *p*-толуолсульфоновая кислота.

## **2. Временной график дозирования иммуномодулирующего соединения**

[0325] В некоторых вариантах осуществления предлагаемый способ комбинированной терапии включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуномодулирующего лекарственного средства (иммуномодулирующего соединения), *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, и клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например, CAR-экспрессирующих Т-клеток*).

[0326] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, начинается до, после, в ходе, в ходе курса, одновременно, примерно одновременно, последовательно и/или поочередно с введением клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например, CAR-экспрессирующие Т-клетки*). В некоторых вариантах осуществления, способ включает начало введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, перед введением Т-клеточной терапии. В других вариантах осуществления, способ включает начало введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, после введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, временной график дозирования включает начало введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, параллельно или одновременно с введением Т-клеточной терапии.

[0327] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2*, вводится в некотором цикле. В некоторых вариантах осуществления, цикл включает период введения, в котором вводится иммуномодулирующее соединение, *например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2*, за ним следует период покоя, в ходе которого иммуномодулирующее соединение, *например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2*, не вводится. В некоторых вариантах осуществления, общее количество дней цикла, *например, от начала или старта введения иммуномодулирующего соединения, больше или примерно больше или составляет примерно 21 день, 28 дней, 30 дней, 40 дней, 50 дней, 60 дней или больше.*

[0328] В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, осуществляется, по меньшей мере, в одном цикле и начало введения Т-клеточной терапии происходит в тот же день, необязательно, одновременно. В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, по меньшей мере, в одном цикле осуществляется до начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах

осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, по меньшей мере, в одном цикле осуществляется одновременно или в тот же день, что и начало введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится с опережением от или примерно от 0 до 30 дней, *например*, 0-15 дней, 0-6 дней, 0-96 часов, 0-24 часов, 0-12 часов, 0-6 часов или 0-2 часов, 2 часов - 15 дней, 2 часа - 6 дней, 2 часа - 96 часов, 2 часа - 24 часов, 2 часа - 12 часов, 2 часа - 6 часов, 6 часов - 30 дней, 6 часов - 15 дней, 6 часов - 6 дней, 6 часов - 96 часов, 6 часов - 24 часа, 6 часов - 12 часов, 12 часов - 30 дней, 12 часов - 15 дней, 12 часов - 6 дней, 12 часов - 96 часов, 12 часов - 24 часа, 24 часа - 30 дней, 24 часа - 15 дней, 24 часа - 6 дней, 24 часа - 96 часов, 96 часов - 30 дней, 96 часов - 15 дней, 96 часов - 6 дней, 6 дней - 30 дней, 6 дней - 15 дней или 15 дней - 30 дней до начала Т-клеточной терапии. В некоторых аспектах, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится не более примерно, чем за 96 часов, за 72 часов, за 48 часов, 24 часа, за 12 часов, за 6 часов, за 2 часа или за 1 час до начала Т-клеточной терапии.

[0329] В некоторых из таких любых вариантах осуществления, в которых иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, дается до клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточной терапии), введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, продолжается через регулярные интервалы до начала клеточной терапии и/или в течение некоторого времени после начала клеточной терапии.

[0330] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится или его продолжают вводить после введения клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в пределах примерно 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 48 часов, 96 часов, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, 14 дней, 15 дней, 21 день, 24 дней, 28 дней, 30 дней, 36 дней, 42 дней, 60 дней, 72 дней или 90 дней или около того после начала введения клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают непрерывное введение, *например*, через регулярные интервалы, иммуномодулирующего соединения после начала введения клеточной терапии.

[0331] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится до или примерно до 1 дня, до или примерно до 2 дней, до или примерно до 3 дней, до или примерно до 4 дней, до или примерно до 5 дней, до или примерно до 6 дней, до или примерно до 7 дней, до или примерно до 12 дней, до или примерно до 14 дней, до или примерно до 21 день, до или примерно до 24 дней, до или примерно до 28 дней, до или примерно до 30 дней, до или примерно до 35 дней, до или примерно до 42 дней, до или примерно до 60 дней или до или

примерно до 90 дней, до или примерно до 120 дней, до или примерно до 180 дней, до или примерно до 240 дней, до или примерно до 360 дней или до или примерно до 720 дней или более после начала введения клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточная терапия).

[0332] В некоторых из любых таких указанных выше вариантов осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится до и после начала введения клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR Т-клеточная терапия).

[0333] В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, когда или после того, необязательно, непосредственно после того или в пределах 1-3 дней после того, как: (i) в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии; (ii) количество клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови, после их детектирования в крови, не детектируется или уменьшается, необязательно, уменьшается по сравнению с предыдущей временной точкой после введения Т-клеточной терапии; (iii) количество клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови, уменьшается в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 10 раз или более по сравнению с пиковым или максимальным количеством клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови субъекта после начала введения Т-клеточной терапии; (iv) в момент времени после детектирования пикового или максимального уровня клеток Т-клеточной терапии, когда детектируемое количество Т-клеток или клеток, полученных из Т-клеток в крови субъекта, меньше, чем 10%, меньше, чем 5%, меньше, чем 1% или меньше, чем 0,1% от общего количества мононуклеаров периферической крови (РВМС) в крови субъекта; (v) субъект демонстрирует прогрессирование заболевания и/или оно возобновляется после ремиссии после лечения с помощью Т-клеточной терапии; и/или (iv) субъект демонстрирует увеличение опухолевой нагрузки по сравнению с опухолевой нагрузкой в момент времени до или после введения Т-клеток и перед началом введения иммуномодулирующего соединения.

[0334] В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, по меньшей мере, в одном цикле осуществляется после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, осуществляется, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 1 день, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 2 дня, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 3 дня, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 4 дня, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 5 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 6 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 7 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 8 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 9 дней, по меньшей мере,

или примерно, по меньшей мере, через 10 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно через 12 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, 14 дней, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно через 15 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 21 день, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно через 24 дня, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 28 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 30 дней, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 35 дней или, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 42 дня, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 60 дней или, по меньшей мере, или примерно, по меньшей мере, через 90 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, осуществляется по меньшей мере, через 2 дня, по меньшей мере, через 1 неделю, по меньшей мере, через 2 недели, по меньшей мере, через 3 недели или, по меньшей мере, через 4 недели после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, осуществляется через 2-28 дней или 7-21 день после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, осуществляется через время, которое 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19, дней, 20 дней, 21 день, 24 дней или 28 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится несколько раз в день, два раза в день, ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю после начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится один раз в день. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится два раза в день. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится три раза в день. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится через день. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится один раз в день. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение периода введения в течение множества последовательных дней, например до или примерно до 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более 30 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение больше или примерно

больше чем 7 последовательных дней, примерно больше чем или больше чем 14 последовательных дней, примерно больше чем или больше чем 21 последовательных дней, примерно больше чем или больше чем 21 последовательных дней или 28 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение периода введения до 21 последовательного дня. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение периода введения до 21 последовательного дня, где цикл включает более 30 дней, от начала введения иммуномодулирующего соединения.

[0335] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид или Соединение 1, вводится в течение периода введения не больше примерно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или не больше 30 последовательных дней. В определенных вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится один ежедневно в течение 14 дней в 21-дневном цикле лечения. В определенных вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится один ежедневно в течение 21 дня в 28-дневном цикле лечения. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение периода введения в течение не более 14 последовательных дней.

[0336] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в цикле, где цикл включает введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, в течение множества последовательных дней, за ними следует период покоя, в ходе которого иммуномодулирующее соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, период покоя больше примерно 1 дня, больше примерно 3 последовательных дней, больше примерно 5 последовательных дней, больше примерно 7 последовательных дней, больше примерно 8 последовательных дней, больше примерно, чем 9 последовательных дней, больше примерно 10 последовательных дней, больше примерно 11 последовательных дней, больше примерно 12 последовательных дней, больше примерно 13 последовательных дней, больше примерно 14 последовательных дней, больше примерно 15 последовательных дней, больше примерно 16 последовательных дней, больше примерно 17 последовательных дней, больше примерно 18 последовательных дней, больше примерно 19 последовательных дней, больше примерно 20 последовательных дней или больше примерно 21 или более последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления, период покоя больше 7 последовательных дней, больше последовательных дней, больше 21 дня или больше 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, период покоя больше примерно 14 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления, цикл введения иммуномодулирующего соединения не включает период покоя.

[0337] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в цикле, где цикл повторяется, по меньшей мере, один раз. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение, по меньшей мере, 2 циклов, по меньшей мере, 3 циклов, по меньшей мере, 4 циклов, по меньшей мере, 5 циклов, по меньшей мере, 6 циклов, по меньшей мере, 7 циклов, по меньшей мере, 8 циклов, по меньшей мере, 9 циклы, по меньшей мере, 10 циклов, по меньшей мере, 11 циклов или, по меньшей мере, 12 циклов. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 циклов.

[0338] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится шесть раз в день, пять раз в день, четыре раза в день, три раза в день, два раза в день, один раз в день, через день, каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю или только один раз до или после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид или Соединение 1, вводится во множестве доз через регулярные интервалы до, в ходе, в ходе курса и/или после периода введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в одной или нескольких дозах через регулярные интервалы до введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид или Соединение 1, вводится в одной или нескольких дозах через регулярные интервалы после введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько доз иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, можно вводить одновременно с введением дозы Т-клеточной терапии.

[0339] В некоторых вариантах осуществления, доза, частота, продолжительность, временной график и/или порядок введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, определяется на основе конкретных порогов или критериев из результатов стадии скрининга и/или оценки результатов лечения, описанных в настоящем документе, *например*, описанных в Разделе III настоящего документа.

[0340] В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение клеточной терапии субъекту, которому ранее вводили терапевтически эффективное количество иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение вводится субъекту перед введением дозы клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, лечение иммуномодулирующим соединением происходит в то же самое время, когда вводятся дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее

соединение вводится после введения дозы клеток.

[0341] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится ежедневно в течение 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 дня или более 21 дня. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится два раза ежедневно в течение 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 дня или более 21 дня. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится три раза ежедневно в течение 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 дня или более 21 дня. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится через день в течение 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 дня или более 21 дня.

[0342] В некоторых вариантах осуществления способов, предлагаемых в настоящем документе, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, и Т-клеточная терапия вводятся одновременно или примерно одновременно.

[0343] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в дозе от или примерно от 0,1 мг примерно до 100 мг, от или примерно от 0,1 мг до 50 мг, от или примерно от 0,1 мг до 25 мг, от или примерно от 0,1 мг до 10 мг, от или примерно от 0,1 мг до 5 мг, от или примерно от 0,1 мг до 1 мг, от или примерно от 1 мг до 100 мг, от или примерно от 1 мг до 50 мг, от или примерно от 1 мг до 25 мг, от или примерно от 1 мг до 10 мг, от или примерно от 1 мг до 5 мг, от или примерно от 5 мг до 100 мг, от или примерно от 5 мг до 50 мг, от или примерно от 5 мг до 25 мг, от или примерно от 5 мг до 10 мг, от или примерно от 10 мг до 100 мг, от или примерно от 10 мг до 50 мг, от или примерно от 10 мг до 25 мг, от или примерно от 25 мг до 100 мг, от или примерно от 25 мг до 50 мг или от или примерно от 50 мг до 100 мг, в каждом случае, включительно. В некоторых вариантах осуществления, количество представляет собой вводимое раз в день количество иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

[0344] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1, вводится в дозе от или примерно от 1 мг примерно до 20 мг, *например*, от или примерно от 1 мг примерно до 10 мг, примерно от 2,5 мг примерно до 7,5 мг, примерно от 5 мг примерно до 15 мг, *например*, примерно 5 мг, 10 мг, 15 мг или 20 мг. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид или Соединение 1 вводится в дозе примерно от 10 мкг/кг до 5 мг/кг, *например*, примерно 100 мкг/кг - примерно 2 мг/кг, примерно 200 мкг/кг to примерно 1 мг/кг, примерно 400 мкг/кг - примерно 600 мкг/кг, *например*, примерно 500 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления, количество представляет собой вводимое раз в день количество иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида или Соединения 1. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение

представляет собой Соединение 1. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в количестве, для ежедневной дозировки, в целом, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 0,1 мг в день, 0,5 мг в день, 1,0 мг в день, 2,5 мг в день, 5 мг в день, 10 мг в день, 25 мг в день, 50 мг в день или 100 мг в день. В некоторых вариантах осуществления, доза иммуномодулирующего соединения, например, леналидомида или Соединения 1, составляет или примерно составляет 25 мг в день. В конкретных вариантах осуществления, доза иммуномодулирующего соединения, например, леналидомида или Соединения 1 составляет или примерно составляет 10 мг в день. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой Соединение 1.

[0345] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид или Соединение 1, вводится в количестве больше или больше примерно, чем 1 мг, 2,5 мг, 5 мг, 7,5 мг, 10 мг, 15 мг и меньше 25 мг. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид или Соединение 1, вводится в количестве больше или больше примерно, чем 1 мг в день, 2,5 мг в день, 5 мг в день, 7,5 мг в день, 10 мг в день, 15 мг в день и меньше 25 мг в день. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение представляет собой Соединение 1.

[0346] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают введение эффективного количества Соединения 2 в день субъекту для модулирования активности и/или функции Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 2 вводится при дозе от или примерно от 0,1 мг до или примерно до 1 мг. В некоторых вариантах осуществления, это количество составляет или примерно составляет 0,1 мг, составляет или примерно составляет 0,2 мг, составляет или примерно составляет 0,3 мг, составляет или примерно составляет 0,4 мг, составляет или примерно составляет 0,5 мг, составляет или примерно составляет 0,6 мг, составляет или примерно составляет 0,7 мг, составляет или примерно составляет 0,8 мг, составляет или примерно составляет 0,9 мг или составляет или примерно составляет 1,0 мг или любое значение в пределах между любыми рассмотренными выше значениями. В некоторых вариантах осуществления, количество Соединения 2 вводится в циклическом режиме, включающем ежедневное введение в течение трех недель в четырехнедельном периоде или цикле. Введение Соединения 2 осуществляется в течение некоторого периода времени, например, как правило, в течение нескольких недель, например, в течение одного месяца или больше, двух месяцев или больше, трех месяцев или больше, четырех месяцев или больше, пяти месяцев или больше, или шести месяцев или больше. В настоящем документе описаны иллюстративные режимы дозирования. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают введение субъекту эффективного количества Соединения 1 в день для модулирования активности и/или функции Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество составляет не более 3 мг в день. В некоторых вариантах

осуществления, эффективное количество составляет от или примерно от 1 мг примерно до 3 мг ежедневно в течение продолжительности периода, например, составляет или примерно 1 мг в день, 1,5 мг в день, 2,0 мг в день, 2,5 мг в день или 3 мг в день. В некоторых вариантах осуществления, количество Соединения 1 вводится в циклическом режиме, включающем ежедневное введение в течение не более 5 дней в неделю. Введение Соединения 1 осуществляется в течение некоторого периода времени, например, как правило, в течение нескольких недель, например, в течение одного месяца или больше, двух месяцев или больше, трех месяцев или больше, четырех месяцев или больше, пяти месяцев или больше или шести месяцев или больше. В настоящем документе описываются иллюстративные режимы дозирования. В некоторых вариантах осуществления, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, Соединение 1 вводится в течение последовательных дней недели (например, каждые 3, 4 или 5 дней) за этим следует несколько дней покоя, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в циклическом режиме или, по меньшей мере, в течение одной недели циклического режима, в количестве (например, от 1 мг до 3 мг в день) в течение 5 дней, за ними следует период покоя два дня, когда соединение не вводится (5/7 дней в неделю).

[0347] В некоторых аспектах, предлагаемые способы сводят к минимуму или устраняют токсичность после введения субъекту Т-клеточной терапии и/или иммуномодулирующего соединения, например, леналидомида или Соединения 1. В некоторых аспектах, способы, предлагаемые в настоящем документе, включают введение доз, которые существенно ниже, чем дозы, которые идентифицируются как MTD для соединения.

[0348] Например, сообщается, что для Соединения 1 начальная доза 2 мг для 5/7 дней в 2 раза ниже, чем MTD, когда 3 мг Соединения 1 дают 5/7 дней (Carpio *et al.* (2015)). В некоторых аспектах, предлагаемые способы осуществляются посредством введения количества соединения, которое равно или меньше 3 мг в день, для 5/7 дней, например, составляет или примерно составляет 2,5 мг, 2,0 мг, 1,5 мг, 1,0 мг для 5/7 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится субъекту в течение достаточного времени после приема противолимфомной терапии, так что миелосупрессивные воздействия Соединения 1 и противолимфомной терапии сводятся к минимуму. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинают в момент времени после или, как ожидается, после, или, вероятно, после, появления пика CAR Т-клеток в крови субъекта, например, через 14 дней или более после начала введения Т-клеток, например, через 14-28 дней, например, через 21 день или около того, или через 28 дней после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в то время, когда субъект не демонстрирует острой токсичности после введения клеточной терапии.

[0349] В некоторых вариантах осуществления, способы и применения включают введение Соединения 1. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1

начинаются после (следует после) начала клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается, когда детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии в крови субъекта или после этого. В некоторых случаях, начало введения Соединения 1 осуществляется через неделю или в пределах недели, например, в пределах 1, 2 или 3 дней (i) после момента времени, когда в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии; (ii) после того, как количество клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови, после их детектирования в крови, становится не детектируемым или уменьшается, необязательно, уменьшается по сравнению с предыдущей временной точкой после введения Т-клеточной терапии; (iii) после того количество клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови, уменьшается в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 10 раз или больше по сравнению с пиковым или максимальным количеством клеток Т-клеточной терапии, детектируемых в крови субъекта после начала введения Т-клеточной терапии; (iv) в момент времени после детектирования пикового или максимального уровня клеток Т-клеточной терапии в крови субъекта, когда количество клеток, детектируемых в крови от субъекта или полученных из этих клеток, меньше 10%, меньше 5%, меньше 1% или меньше 0,1% от общего количества мононуклеаров периферической крови (РВМС) в крови субъекта; (v) после того, как субъект демонстрирует прогрессирование заболевания и/или оно возобновляется после ремиссии после лечения с помощью Т-клеточной терапии; и/или (vi) после того, как субъект демонстрирует увеличение опухолевой нагрузки по сравнению с опухолевой нагрузкой в момент времени до или после введения клеток и перед началом введения Соединения 1. В определенных аспектах, предлагаемые способы осуществляют для усиления, увеличения или потенцирования Т-клеточной терапии и у субъектов, у которых наблюдают пиковый ответ на Т-клеточную терапию, но у которых ответ, *например*, присутствие Т-клеток и/или уменьшение опухолевой нагрузки, уменьшается или больше не детектируется.

[0350] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается примерно через 14 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается примерно через 21 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается примерно через 21 - примерно 28 дней после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается примерно через 14 дней, примерно через 15 дней, примерно через 16 дней, примерно через 17 дней, примерно через 18 дней, примерно через 19 дней, ч примерно через 20 дней, примерно через 21 день, примерно через 22 дня, примерно через 23 дня, примерно через 24 дня, примерно через 25 дней, примерно через 26 дней, примерно через 27 дней, примерно через 28 дней около того, примерно через 29 дней, примерно через 30 дней, примерно через 31 день, примерно через 32 дня, примерно через 33 дня, примерно через 34 дня или примерно через 35 дней после начала введения Т-

клеточной терапии.

[0351] В некоторых вариантах осуществления, в момент времени, когда субъекту первый раз вводится Соединение 1, и/или в любое последующее время после начала введения, субъект не демонстрирует признаков или симптомов острой токсичности, таких как острый синдром высвобождения цитокинов (CRS) или острая токсичность. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 осуществляют в момент времени, когда субъект не демонстрирует признаков или симптомов острого CRS и/или не демонстрирует CRS степени 3 или выше, такого как пролонгированный CRS степени 3 или CRS степени 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 осуществляют в момент времени, когда субъект не демонстрирует признаков или симптомов острой нейротоксичности и/или не демонстрирует нейротоксичности степени 3 или выше, такой как пролонгированная нейротоксичность степени 3 или нейротоксичности степени 4 или степени 5. В некоторых аспектах, между временем начала введения Т-клеточной терапии и временем введения Соединения 1, субъект не демонстрирует острого CRS и/или не демонстрирует CRS степени 3 или выше, например, пролонгированной CRS степени 3 или CRS степени 4 или 5. В некоторых случаях, между временем начала введения Т-клеточной терапии и временем введения Соединения 1, субъект не демонстрирует острой нейротоксичности и/или не демонстрирует нейротоксичности степени 3 или выше, такой как пролонгированная нейротоксичность степени 3 или нейротоксичность степени 4 или 5.

[0352] В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве от или примерно от 0,1 мг до 5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1 в день, его вводят в количестве примерно от 0,1 мг примерно до 5 мг, примерно 0,5 мг - примерно 5 мг, примерно 1 мг - примерно 5 мг, примерно 1,5 мг - примерно 5 мг, примерно 2 мг to примерно 5 мг, примерно 2,5 мг - примерно 5 мг, примерно 3 мг - примерно 5 мг, примерно 0,1 мг - примерно 4 мг, примерно 0,1 мг - примерно 4 мг, примерно 1 мг - примерно 4 мг, примерно 1,5 мг - примерно 4 мг, примерно 2 мг - примерно 4 мг, примерно 2,5 мг - примерно 4 мг, примерно 3 мг - примерно 4 мг, примерно 4 мг, примерно 0,1 мг - примерно 3,5 мг, примерно 0,5 мг - примерно 3,5 мг, примерно 1 мг - примерно 3,5 мг, примерно 1,5 мг - примерно 3,5 мг, примерно 2 мг - примерно 3,5 мг, примерно 2,5 мг - примерно 3,5 мг, примерно 3 мг - примерно 3,5 мг, примерно 0,1 мг - примерно 3 мг, примерно 0,5 мг - примерно 3 мг, примерно 1 мг - примерно 3 мг, примерно 1,5 мг - примерно 3 мг, примерно 2 мг - примерно 3 мг, примерно 2,5 мг - примерно 3 мг, примерно 0,1 мг - примерно 2,5 мг, примерно 0,5 мг - примерно 2,5 мг, примерно 1 мг - примерно 2,5 мг, примерно 1,5 мг - примерно 2,5 мг, примерно 2 мг - примерно 2,5 мг, примерно 0,1 мг - примерно 2 мг, примерно 0,5 мг - примерно 2 мг, примерно 1 мг - примерно 2 мг, примерно 1,5 мг - примерно 2 мг, примерно 0,1 мг - примерно 1,5 мг, примерно 0,5 мг - примерно 1,5 мг, примерно 1 мг - примерно 1,5 мг, примерно 0,1 мг - примерно 1 мг или примерно 0,5 мг - примерно 1 мг.

[0353] В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве примерно или, по меньшей мере, примерно 0,5 мг или 0,5 или по

меньшей мере 0,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1 в день, его вводят в количестве примерно или, по меньшей мере, примерно 1 мг или по меньшей мере, 1 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве примерно или, по меньшей мере, примерно 1,5 мг или 1,5 мг или, по меньшей мере, 1,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве примерно или, по меньшей мере, примерно 2 мг или 2 мг или, по меньшей мере, 2 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве примерно или, по меньшей мере, примерно 2,5 мг или 2,5 мг или, по меньшей мере, при 2,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве примерно или, по меньшей мере, примерно 3 мг или 3 мг или, по меньшей мере, при 3 мг. В некоторых из таких вариантов осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 4,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 4 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 3,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 3 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 2,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 2 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 1,5 мг. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве не более примерно, чем 1 мг.

[0354] В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве 3 мг или около того. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве 2,5 мг или около того. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве 2 мг или около того. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве 1,5 мг или около того. В некоторых вариантах осуществления, при введении Соединения 1, в день, его вводят в количестве 1 мг или около того в день.

[0355] В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует максимальной концентрации ( $C_{\max}$ ) Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, в диапазоне примерно от 10 нМ примерно до 500 нМ, примерно 40 нМ - примерно 500 нМ, примерно 60 нМ примерно 500 нМ, примерно 80 нМ - примерно 500 нМ, примерно 100 нМ - примерно 500 нМ, примерно 150 нМ - примерно 500 нМ, примерно 200 нМ - примерно 500 нМ, примерно 250 нМ - примерно 500 нМ, примерно 300 нМ - примерно 500 нМ, примерно 350 нМ - примерно 500 нМ, примерно 400

нМ - примерно 500 нМ, 10 нМ - примерно 400нМ, примерно 40 нМ - примерно 400 нМ, примерно 60 нМ - примерно 400 нМ, примерно 80 нМ - примерно 400 нМ, примерно 100 нМ - примерно 400 нМ, примерно 150 нМ - примерно 400 нМ, примерно 200 нМ - примерно 400 нМ, примерно 250 нМ - примерно 400 нМ, примерно 300 нМ - примерно 400 нМ, примерно 350 нМ - примерно 400 нМ, 10 нМ - примерно 350 нМ, примерно 40 нМ - примерно 350 нМ, примерно 60 нМ - примерно 350 нМ, примерно 80 нМ - примерно 350 нМ, примерно 100 нМ - примерно 350 нМ, примерно 150 нМ - примерно 350 нМ, примерно 200 нМ - примерно 350 нМ, примерно 250 нМ - примерно 350 нМ, примерно 300 нМ - примерно 350 нМ, примерно 10 нМ - примерно 300 нМ, примерно 40 нМ - примерно 300 нМ, примерно 60 нМ - примерно 300 нМ, примерно 80 нМ - примерно 300 нМ, примерно 100 нМ - примерно 300 нМ, примерно 150 нМ - примерно 300 нМ, примерно 200 нМ - примерно 300 нМ, примерно 250 нМ - примерно 250 нМ, примерно 10 нМ - примерно 250 нМ, примерно 40 нМ - примерно 250 нМ, примерно 60 нМ - примерно 250 нМ, примерно 80 нМ - примерно 250 нМ, примерно 100 нМ - примерно 250 нМ, примерно 150 нМ - примерно 250 нМ, примерно 200 нМ - примерно 250 нМ, примерно 10 нМ - примерно 200 нМ, примерно 40 нМ - примерно 200 нМ, примерно 60 нМ - примерно 200 нМ, примерно 80 нМ - примерно 200 нМ, примерно 100 нМ - примерно 200 нМ, примерно 150 нМ - примерно 200 нМ, примерно 10 нМ - примерно 150 нМ, примерно 40 нМ - примерно 150 нМ, примерно 60 нМ - примерно 150 нМ, примерно 80 нМ - примерно 150 нМ, примерно 100 нМ - примерно 150 нМ, примерно 10 нМ - примерно 100 нМ, примерно 40 нМ - примерно 100 нМ, примерно 60 нМ - примерно 100 нМ или примерно 80 нМ - примерно 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое поддерживает  $C_{\max}$  в этом диапазоне в течение, по меньшей мере, примерно 30 минут, 1 часа, 2 часов, 4 часов, 8 часов, 16 часов или 24 часов.

[0356] В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови примерно при или, по меньшей мере, примерно при 40 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови примерно при или, по меньшей мере, примерно при 60 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, примерно при или, по меньшей мере, примерно при 80 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, примерно при или, по меньшей мере, примерно при 90 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, примерно при или, по меньшей мере, примерно при 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое поддерживает  $C_{\max}$

в течение, по меньшей мере, примерно 30 минут, 1 часа, 2 часов, 4 часов, 8 часов, 16 часов или 24 часов.

[0357] В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 400 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 350 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 300 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 200 нМ. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в количестве, которое реализует  $C_{\max}$  Соединения 1 в крови, например, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, не больше примерно, чем при 150 нМ.

[0358] В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в циклическом режиме, который включает повторяющееся дозирование соединения в течение указанного периода или продолжительности. В некоторых вариантах осуществления, Соединение 1 вводится в циклическом режиме, когда в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, соединение вводится в эффективном количестве, таком как количество, описанное выше, в каждый из не более чем 5 дней в неделю в течение периода не больше одной недели. В некоторых вариантах осуществления, количество Соединения 1 для каждого введения или в день, когда оно вводится, не более 3 мг (например, не более 3 мг, 2,5 мг, 2 мг, 1,5 мг, 1 мг, 0,5 мг). В некоторых вариантах осуществления, количество Соединения 1 для каждого введения или в день, когда оно вводится, составляет 3 мг или около того, 2,5 мг или около того, 2 мг или около того, 1,5 мг или около того, примерно 1 мг или около того, 0,5 мг или около того. В некоторых вариантах осуществления, количество Соединения 1 для каждого введения или в день, когда оно вводится, составляет примерно 1 мг - примерно 2 мг

(например, 1 мг или около того, 2 мг или около того).

[0359] В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение Соединения 1 в каждый из не более 5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение Соединения 1 в течение каждого из не более 4 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение Соединения 1 в течение каждого из не более 3 дней в неделю.

[0360] В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение Соединения 1 в течение 3-5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение Соединения 1 в течение 4-5 дней в неделю. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение Соединения 1 в течение 3-4 дней в неделю.

[0361] В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима или, по меньшей мере, одна неделя циклического режима, включает введение Соединения 1 в каждый из не более чем 5 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя в течение остальных дней недели, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима или, по меньшей мере, одна неделя циклического режима, включает введение Соединения 1 в течение 3-5 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя в течение остальных дней недели, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима или, по меньшей мере, одна неделя циклического режима, включает введение Соединения 1 в каждый из 3 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 4 дня, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима или, по меньшей мере, одна неделя циклического режима, включает введение Соединения 1 в каждый из 4 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 3 дня, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима или, по меньшей мере, одна неделя циклического режима, включает введение Соединения 1 в каждый из 5 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 2 дня, когда соединение не вводится.

[0362] В некоторых вариантах осуществления, циклический режим для введения Соединения 1 осуществляется в течение некоторого периода времени после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода нескольких недель после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода примерно или, по меньшей мере, примерно одного месяца после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода примерно или, по меньшей мере, примерно двух месяцев после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода

примерно или, по меньшей мере, примерно трех месяцев после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода примерно или, по меньшей мере, примерно четырех месяцев после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода примерно или, по меньшей мере, примерно пяти месяцев после начала введения Т-клеточной терапии.

[0363] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода, по меньшей мере, трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода 90 дней или около того, 100 дней или около того, 105 дней или около того, 110 дней или около того, 115 дней или около того, 120 дней или около того, 125 дней или около того, 130 дней или около того, или около того 135 дней или около того, 140 дней или около того, 145 дней или около того, 150 дней или около того, 155 дней или около того, 160 дней или около того, 165 дней или около того, 170 дней или около того, 175 дней или около того, 180 дней или около того, 185 дней или около того, 190 дней или около того, 195 дней или около того, 200 дней или около того или более после начала введения Т-клеточной терапии.

[0364] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода 90 дней или около того или трех месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода 120 дней или около того или четырех месяцев после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода 150 дней или около того или пяти месяцев после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение периода 180 дней или около того или шести месяцев после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии).

[0365] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 заканчивается или прекращается в конце этого периода (например, 3, 4, 5 или 6 месяцев или около того) после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии), если субъект реализует, до или в течение 6 месяцев или около того, полный ответ (CR) после лечения или рак (например, В-клеточная неоплазия) прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, этот период имеет фиксированную длительность, так что введение Соединения 1 продолжается в течение этого периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до конца периода. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет CR с минимальным остаточным заболеванием (MRD). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет CR, которое представляет собой MRD.

[0366] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается после окончания этого периода, например, продолжается примерно 3, 4, 5 или 6 месяцев

или больше после начала введения Т-клеточной терапии (например, CAR Т-клеток), если субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается больше 6 месяцев после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, для субъектов, которые демонстрируют PR или SD в конце начального периода, введение Соединения 1 продолжается, пока субъект не реализует полного ответа (CR) после лечения или пока раковое заболевание (например, В-клеточная неоплазия, такая как NHL, например, DLBCL) не прогрессирует или не возобновляется после ремиссии после лечения.

[0367] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 осуществляется в циклическом режиме, включающем введение Соединения 1 в количестве не более примерно, чем 3 мг (*например*, 1-3 мг, 1 мг, 2 мг или 3 мг) ежедневно в течение не более 5 дней (*например*, 3 дня, 4 дней или 5 дней) в неделю в течение периода больше одной недели. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение соединения в течение каждых 3 последовательных дней, 4 последовательных дней или 5 последовательных дней, за ними следует период покоя в течение остальных дней недели, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение соединения в течение 5 дней, за ними следует период покоя двух дней, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается примерно через 14 - примерно 35 дней (*например*, примерно в 21 - примерно 35 день) после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, во время введения Соединения 1, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения Т-клеточной терапии (например, CAR Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, В-клеточная неоплазия представляет собой NHL, такой как рецидивирующий/не поддающийся лечению агрессивный NHL или DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, такая как CAR-экспрессирующие Т-клетки, включает химерный рецептор антигена, специфично связывающий антиген В клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген В клеток представляет собой CD19.

[0368] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения в течение не более 5 дней (*например*, 3 дней, 4 дней или 5 дней) в неделю в течение периода, который продолжается 3 или примерно 3 месяца или больше, 4 или примерно 4 месяца или больше, 5 или примерно 5 месяцев или больше, или 6 или примерно 6 месяцев или больше после начала введения клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, период продолжается в течение 3 или примерно 3 месяцев, 4 или примерно 4 месяцев, 5 или примерно 5 месяцев или 6 или примерно 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение соединения в течение каждых 3 последовательных дней, 4 последовательных дней или 5 последовательных дней, за ними следует период покоя в

течение остальных дней недели, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение соединения в каждый из 5 последовательных дней, за ними следует период двух дней покоя, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается через 14 - примерно 35 дней (*например*, примерно 21 - примерно 35 дней, *например*, примерно через 28 дней) после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, во время введения Соединения 1, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 заканчивается или прекращается, если субъект до конца или примерно в конце этого периода реализует полный ответ (CR) после лечения или рак, *например*, В-клеточная неоплазия, прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение этого периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до конца периода. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается после окончания начального периода, если после начала введения Т-клеточной терапии, субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 повторяется пока субъект не реализует полного ответа (CR) после лечения или пока раковое заболевание, *например*, В-клеточная неоплазия, не прогрессирует или не возобновится после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, В-клеточная неоплазия представляет собой NHL, такой как рецидивирующий/не поддающийся лечению агрессивный NHL или DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия, такая как CAR-экспрессирующие Т-клетки, включает химерный рецептор антигена, специфично связывающий антиген В клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген В клеток представляет собой CD19.

[0369] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 осуществляется в циклическом режиме, включающем введение Соединения 1 в количестве не более примерно 3 мг (*например*, 1-3 мг, 1 мг, 2 мг или 3 мг) в день в каждый из не более чем 5 дней (*например*, 3 дней, 4 дней или 5 дней) в неделю в течение периода примерно трех месяцев или больше (*например*, в течение периода примерно трех месяцев, примерно четырех месяцев, примерно пяти месяцев или примерно шести месяцев) после начала введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение соединения в течение каждых 3 последовательных дней, 4 последовательных дней или 5 последовательных дней, за ними следует период покоя в течение остальных дней недели, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, каждая неделя циклического режима включает введение соединения в каждый из 5 дней, за ними следует период покоя двух дней, когда соединение не вводится. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается примерно через 14 - примерно 35 дней (*например*, примерно 21 - примерно 35 дней, *например*, примерно 28 дней) после начала

введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, во время введения Соединения 1, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, В-клеточная неоплазия представляет собой NHL, такой как рецидивирующий/не поддающийся лечению агрессивный NHL или DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 заканчивается или прекращается примерно через 6 месяцев, после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект реализует ранее 6 месяцев или около того, полный ответ (CR) после лечения или рак, например, В-клеточная неоплазия, прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, циклический режим продолжается в течение всего периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до конца периода. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается дальше после окончания периода, например, продолжается в течение более чем 6 месяцев после начала введения клеточной терапии, если примерно через шесть месяцев субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается пока субъект не реализует полный ответ (CR) после лечения или пока рак, например, В-клеточная неоплазия, не прогрессирует или не возобновится после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, такая как CAR-экспрессирующие Т-клетки, включает химерный рецептор антигена, специфично связывающий антиген В клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген В клеток представляет собой CD19.

[0370] В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 осуществляется в циклическом режиме, включающем введение Соединения 1 в количестве примерно от 1 мг примерно до 3 мг (*например*, 1 мг, 2 мг или 3 мг) в день в каждый из 5 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 2 дня, когда соединение не вводится в течение периода примерно шести месяцев или больше после начала клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 начинается позже примерно 14 - примерно 35 дней (*например*, примерно 21 - примерно 35 дней, *например*, примерно 28 дней) после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, во время введения Соединения 1, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 останавливают примерно через 6 месяцев после начала введения клеточной терапии, если примерно через 6 месяцев субъект реализует полный ответ (CR) после лечения или рак, например, В-клеточная неоплазия, прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 продолжается в течение этого периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до 6 месяцев, за 6 месяцев или около того. В некоторых вариантах осуществления, введение Соединения 1 дополнительно осуществляют в течение более 6 месяцев после начала введения Т-клеточной терапии, если за шесть месяцев или около того, субъект

демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение продолжается пока субъект не реализует полный ответ (CR) после лечения или пока В-клеточная неоплазия не прогрессирует или не возобновится после ремиссии после лечения. В некоторых вариантах осуществления, В-клеточная неоплазия представляет собой NHL, такой как рецидивирующий/не поддающийся лечению агрессивный NHL или DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, такая как CAR-экспрессирующие Т-клетки, включает химерный рецептор антигена, специфично связывающий антиген В клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген В клеток представляет собой CD19.

[0371] В некоторых случаях, циклический режим может прерываться в любой момент времени и/или один или несколько раз. В некоторых случаях, циклический режим прерывается или модифицируется, если у субъекта развиваются один или несколько побочных эффектов, доза-ограничивающая токсичность (DLT), нейтропения или фебрильная нейтропения, тромбоцитопения, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и/или нейротоксичность (NT), такие как описано в Разделе IV. В некоторых вариантах осуществления, количество Соединения 1 для каждого введения или в день в определенные дни недели изменяется после того, как у субъекта развиваются один или несколько побочных эффектов, доза-ограничивающая токсичность (DLT), нейтропения или фебрильная нейтропения, тромбоцитопения, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и/или нейротоксичность (NT).

[0372] В любом из рассмотренных выше вариантов осуществления, иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, может вводиться перорально. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, вводится в виде таблетки или капсулы.

[0373] В некоторых вариантах осуществления, дозировки, такие как ежедневные дозировки, вводятся в одной или нескольких разделенных дозах, например, в 2, 3 или 4 дозах или в одном препарате. Иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, может вводиться само по себе, в присутствии фармацевтически приемлемого носителя или в присутствии других терапевтических агентов.

[0374] Понятно, что можно использовать более высокие или более низкие дозировки иммуномодулирующего соединения, например, в зависимости от конкретного агента и способа введения. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение может вводиться само по себе или в форме фармацевтической композиции, где соединение подмешивается или смешивается с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или разбавителями. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение может вводиться либо системно, либо локально в орган или ткань, которые должны лечиться. Иллюстративные способы введения включают, но, не ограничиваясь этим, местный, инъекцию (такие как подкожная,

внутримышечная, интрадермальная, внутривенная, внутрибрюшинная, внутриопухолевая и внутривенная), пероральный, сублингвальный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный способы. В некоторых вариантах осуществления, способ введения представляет собой пероральный, парентеральный, ректальный, назальный, местный или окулярный способы, или введение посредством ингаляции. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение вводится перорально. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение вводится перорально в твердых дозированных формах, таких как капсулы, таблетки и порошки, или в жидких дозированных формах, таких как эликсиры, сиропы и суспензии.

[0375] После того, как происходит улучшение заболевания пациента, доза может регулироваться для превентивного или поддерживающего лечения. Например, доза или частота введения, или как то, так и другое, может уменьшаться в зависимости от симптомов, до уровня, при котором поддерживается желаемое терапевтическое или профилактическое воздействие. Если симптомы облегчаются до приемлемого уровня, лечение можно прекратить. Однако пациенты могут потребовать периодического лечения на долговременной основе при любом возобновлении симптомов. Пациенты могут также потребовать хронического лечения на долговременной основе.

#### С. ПРОТИВОЛИМФОМНОЕ ЛЕЧЕНИЕ

[0376] В некоторых аспектах, предлагаемые способы могут дополнительно включать введение одного или нескольких видов противолимфомной терапии, например, до введения Т-клеточной терапии или одновременно с ее началом. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение фосфамида, например, циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия может включать введение флударабина.

[0377] В некоторых аспектах, предварительное кондиционирование субъектов с помощью иммуносупрессивной (например, противолимфомной) терапии может улучшить воздействия адоптивной клеточной терапии (АСТ). Предварительное кондиционирование с помощью противолимфомных агентов, включая комбинация циклоспорина и флударабина, является эффективным при улучшении эффективности перенесенных клеток инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) при клеточной терапии, в том числе улучшает ответ и/или персистенность перенесенных клеток. *Смотри, например, Dudley et al., Science, 298, 850-54 (2002); Rosenberg et al., Clin Cancer Res, 17(13):4550-4557 (2011).* Подобным же образом, в контексте CAR+ Т-клеток, несколько исследований включают противолимфомные агенты, чаще всего, циклофосфамид, флударабин, бендамустин или их комбинации, иногда, в сопровождении низких доз облучения. *Смотри Han et al. Journal of Hematology & Oncology, 6:47 (2013); Kochenderfer et al., Blood, 119: 2709-2720 (2012); Kalos et al., Sci Transl Med, 3(95):95ra73 (2011); Clinical Trial Study Record NO.: NCT02315612; NCT01822652.*

[0378] Такое предварительное кондиционирование может осуществляться с целью

уменьшения риска возникновения одного или нескольких из различных результатов, которые могли бы уменьшить эффективность терапии. Они включают явление, известное как “сток цитокинов”, при котором Т-клетки, В клетки, НК клетки конкурируют с ТЛ за гомеостатические и активирующие цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15; за подавление ТЛ регуляторными Т-клетками, НК клетками или другими клетками иммунной системы; за влияние отрицательных регуляторов в окружающей среде опухоли. Muranski et al., *Nat Clin Pract Oncol*. December; 3(12): 668-681 (2006).

[0379] Таким образом в некоторых вариантах осуществления, предлагаемый способ дополнительно включает введение противолимфомной терапии субъекту. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение противолимфомной терапии субъекту перед введением дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия содержит химиотерапевтический агент, такой как флударабин и/или циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления, введение клеток и/или противолимфомной терапии осуществляется с помощью амбулаторной доставки.

[0380] В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение агента предварительного кондиционирования, такого как противолимфомный или химиотерапевтический агент, такой как циклофосфамид, флударабин, или их комбинации, субъекту перед введением дозы клеток. Например, субъекту может вводиться агент предварительного кондиционирования, по меньшей мере, за 2 дня, например, по меньшей мере, за 3, 4, 5, 6 или 7 дней до первой или последующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводится агент предварительного кондиционирования не более чем за 7 дней, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня до введения дозы клеток.

[0381] В некоторых вариантах осуществления, субъект предварительно кондиционируется с помощью циклофосфамида при дозе в пределах между или примерно между 20 мг/кг и 100 мг/кг, например, в пределах между или примерно между 40 мг/кг и 80 мг/кг. В некоторых аспектах, субъект предварительно кондиционируется с помощью примерно 60 мг/кг, циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, флударабин может вводиться в одной дозе или может вводиться во множестве доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводится один ежедневно в течение одного или двух дней.

[0382] В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфомный агент содержит флударабин, субъекту вводят флударабин при дозе в пределах между или примерно между 1 мг/м<sup>2</sup> и 100 мг/м<sup>2</sup>, например, в пределах между или примерно между 10 мг/м<sup>2</sup> и 75 мг/м<sup>2</sup>, 15 мг/м<sup>2</sup> и 50 мг/м<sup>2</sup>, 20 мг/м<sup>2</sup> и 30 мг/м<sup>2</sup> или 24 мг/м<sup>2</sup> и 26 мг/м<sup>2</sup>. В некоторых случаях, субъекту вводят 25 мг/м<sup>2</sup> флударабина. В некоторых вариантах осуществления, флударабин может вводиться в одной дозе или может вводиться во множестве доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней.

[0383] В некоторых вариантах осуществления, противолимфомный агент содержит

комбинацию агентов, такую как комбинация циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация агентов может содержать циклофосфамид при любой дозе или временном графике введения, например, при дозе, описанной выше, и флударабина при любой дозе или временном графике введения, например, как описано выше. Например, в некоторых аспектах, субъекту вводят 60 мг/кг ( $\sim 2$  г/м<sup>2</sup>) циклофосфамида и 3-5 доз 25 мг/м<sup>2</sup> флударабина перед дозированием клеток.

[0384] В одном из иллюстративных режимов дозирования, перед приемом первой дозы, субъекты принимают иммуномодулирующее соединение за 1 день до введения клеток и противопалищную химиотерапию для предварительного кондиционирования из циклофосфамида и флударабина (CY/FLU), которую вводят, по меньшей мере, за два дня до первой дозы CAR-экспрессирующих клеток и, как правило, не более чем за 7 дней до введения клеток. В другом иллюстративном режиме дозирования, субъекты принимают иммуномодулирующее соединение одновременно с введением клеток, например, в один и тот же день. В другом иллюстративном режиме дозирования, субъекты принимают иммуномодулирующее соединение через несколько дней после введения клеток, например, через 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней после. В некоторых случаях, например, циклофосфамид принимают через 24-27 дней после введения иммуномодулирующего соединения, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. После лечения для предварительного кондиционирования субъектам вводят дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток, как описано выше.

[0385] В некоторых вариантах осуществления, введение агента предварительного кондиционирования до вливания дозы клеток улучшает результат лечения. Например, в некоторых аспектах, предварительное кондиционирование улучшает эффективность лечения с помощью дозы или увеличивает персистенцию клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки), у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, лечение для предварительного кондиционирования увеличивает выживаемость без заболевания, такую как процент субъектов, которые выживают, и не демонстрирует минимального остаточного или молекулярно детектируемого заболевания через данный период времени после дозирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, время медианной выживаемости без заболевания увеличивается.

[0386] После введения клеток субъекту (например, человеку), биологическую активность популяции генно-инженерных клеток в некоторых аспектах измеряют с помощью любого из ряда известных способов. Параметры оценки включают специфичное связывание генно-инженерных или природных Т-клеток или других иммунных клеток с антигеном *in vivo*, например, исследуемое посредством обработки изображений или *ex vivo*, например, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления, способность генно-инженерных клеток разрушать целевые клетки можно измерять с использованием любого пригодного для использования способа, известного в данной области, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer

et al., *J. иммуноterapia*, 32(7): 689-702 (2009) и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). В определенных вариантах осуществления, биологическая активность клеток также может измеряться с помощью анализа экспрессирования и/или секретирования определенных цитокинов, таких как CD107a, IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах биологическая активность измеряется посредством оценки клинического результата, такого как уменьшение массы или нагрузки опухоли. В некоторых аспектах, оценивают токсичные результаты, персистенность и/или размножение клеток, и/или присутствие или отсутствие иммунного ответа хозяина.

[0387] В некоторых вариантах осуществления, введение агента предварительного кондиционирования до вливания дозы клеток улучшает результат лечения, например, улучшая эффективность лечения с помощью дозы или повышая персистенность клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки), у субъекта. По этой причине, в некоторых вариантах осуществления, доза агента предварительного кондиционирования, принимаемая в способе, который представляет собой комбинированную терапию с иммуномодулирующим соединением и клеточной терапией, выше дозы, принимаемой в способе без иммуномодулирующего соединения.

## II. Т-КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ КЛЕТКИ

[0388] В некоторых вариантах осуществления Т-клеточная терапия для использования согласно предлагаемым способам комбинированной терапии включает введение генно-инженерных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, сконструированные для распознавания и/или специфичного связывания молекул, ассоциированных с заболеванием или состоянием, и дающие в результате ответ, такой как иммунный ответ, против таких молекул при связывании с такими молекулами. Рецепторы могут включать химерные рецепторы, например, химерные рецепторы антигена (CAR), и другие трансгенные рецепторы антигенов, включая трансгенные рецепторы Т-клеток (TCR)

[0389] В некоторых вариантах осуществления, клетки являются генно-инженерными или получают с помощью генной инженерии, чтобы они содержали генно-инженерный рецептор, например, генно-инженерный рецептор антигена, такой как химерный рецептор антигена (CAR) или рецептор Т-клеток (TCR). Также предлагаются популяции таких клеток, композиции, содержащие такие клетки и/или обогащенные такими клетками, например, такие, в которых клетки определенного типа, такие как Т-клетки или клетки CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup>, являются обогащенными или выбранными, среди этих композиций находятся фармацевтические композиции и препараты для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. Также предлагаются терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам, например, пациентам.

[0390] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных посредством генной инженерии, и потому они экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляется посредством

сначала стимулирования клеток, например, посредством объединения их со стимулом, которые индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активирование, например, как измерено по экспрессированию цитокина или маркера активации, с последующим трансдуцированием активированных клеток и размножением в культуре до количеств достаточных для клинических применений.

#### **A. РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ**

[0391] Клетки, как правило, экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как рецепторы антигенов, включая функциональные рецепторы антигенов, отличные от TCR, например, химерные рецепторы антигена (CAR), и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные рецепторы Т-клеток (TCR). Также, среди рецепторов имеются другие химерные рецепторы.

##### ***1. Химерные рецепторы антигена (CAR)***

[0392] В некоторых вариантах осуществления, генно-инженерные клетки, такие как Т-клетки, используемые в предлагаемых вариантах осуществления, экспрессируют CAR со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый на поверхности конкретного типа клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, на клетках опухоли или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на генно-инженерных клетках.

[0393] В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор, содержит внутриклеточную сигнальную область, которая включает цитоплазматический сигнальный домен или область (также взаимозаменяемо называемую внутриклеточным сигнальным доменом или областью), такую как цитоплазматическая (внутриклеточная) область, способная индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, например, цитоплазматический сигнальный домен или область компонента рецептора Т-клетки (TCR) (например, цитоплазматический сигнальный домен или область зета цепи для цепи CD3-зета (CD3 $\zeta$ ) или его функциональный вариант или сигнальная часть) и/или которая содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0394] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор дополнительно содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфично связывается с лигандом антигена (например, антигеном). В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор представляет собой CAR, который содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфично связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, лиганд, например, антиген представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток.

[0395] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой TCR-подобный CAR и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС). Как правило, CAR содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может упоминаться как TCR-подобный CAR. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен специфичный для комплекса МНС-пептид TCR-подобного CAR связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах, через линкеры и/или трансмембранный домен (домены). В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы могут, как правило, воспроизводить или примерно воспроизводить сигнал через природный рецептор антигена, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

[0396] Иллюстративные рецепторы антигенов, включая CAR и способы генной инженерии и введения таких рецепторов в клетки, включают те, что описаны, например, в публикациях заявок на Международный патент номер WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, WO2016/0046724, WO2016/014789, WO2016/090320, WO2016/094304, WO2017/025038, WO2017/173256, публикации заявок на патент США номер US2002131960, US2013287748, US20130149337, патенты США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353, 8479118 и 9765342 и в заявке на Европейский патент номер EP2537416, и/или те, которые описаны Sadelain et al., *Cancer Discov.*, 3(4): 388-398 (2013); Davila et al., *PLoS ONE* 8(4): e61338 (2013); Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39 (2012); Wu et al., *Cancer*, 18(2): 160-75 (2012). В некоторых аспектах, рецепторы антигенов включают CAR, как описано в патенте США № 7446190, и те, которые описаны в публикации заявки на Международный патент № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из рассмотренных выше публикаций, таких как WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190, патент США № 8389282, Kochenderfer et al., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al., *J. Immunother.* 35(9): 689-701 (2012); и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 5(177) (2013). Смотри также WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190 и патент США № 8389282. Химерные рецепторы, такие как CAR, как правило, включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, как правило, переменную область тяжелой цепи (VH) и/или переменную область легкой цепи (VL) антитела, например, фрагмент scFv антитела.

[0397] В некоторых вариантах осуществления, CAR конструируется со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антигену, экспрессируемому в конкретном типе клеток, для нацеливания адоптивной терапии,

*например*, на маркер рака и/или антиген, предназначенный для индуцирования демпфирования ответа, такой как антиген, экспрессируемый нормальным или неболезненным типом клеток. Таким образом, CAR, как правило, содержит в своей внеклеточной части одну или несколько антигенсвязывающих молекул, таких как один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или несколько переменных доменов антитела и/или молекул антитела. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из переменной тяжелой ( $V_H$ ) и переменной легкой ( $V_L$ ) цепей моноклонального антитела (mAb), или однодоменное антитело (sdAb), такое как sdFv, нанотело,  $V_{HN}$  и  $V_{NAR}$ . В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

[0398] Среди антигенсвязывающих доменов, включенных в CAR, находятся фрагменты антител. “Фрагмент антитела” или “антигенсвязывающий фрагмент” относится к молекуле иной, чем интактное антитело, которое содержит часть интактного антитела, которое связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают, но, не ограничиваясь этим Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи ( $V_H$ ), одноцепочечные молекулы антитела, такие как scFvs и однодоменные антитела, содержащие только область  $V_H$ ; и мультиспецифичные антитела, сформированные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) и/или переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), такую как scFv.

[0399] В определенных вариантах осуществления, мультиспецифичные связывающие молекулы, например, мультиспецифичные химерные рецепторы, такие как мультиспецифичный CAR, могут содержать любые мультиспецифичные антитела, включая, *например*, биспецифичные антитела, мультиспецифичные одноцепочечные антитела, *например*, диатела, триатела и тетратела, тандем ди-scFvs и тандем три-scFvs.

[0400] Однодоменные антитела (sdAbs) представляют собой фрагменты антител, содержащие всю переменную область тяжелой цепи антитела или часть ее или всю переменную область легкой цепи или часть ее. В определенных вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека.

[0401] Фрагменты антител можно получать с помощью различных технологий, включая, но, не ограничиваясь этим, протеолитическое переваривание интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антитела представляют собой рекомбинантно-продуцируемые фрагменты, такие как фрагменты, содержащие системы, которые не встречаются в природе, такие как системы с двумя или более областями или цепями антител, соединенными синтетическими линкерами, *например*, пептидными линкерами, и/или которые не могут

быть получены посредством ферментативного переваривания встречающегося в природе интактного антитела. В некоторых аспектах, фрагменты антитела представляют собой scFv.

[0402] В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, такой как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или диатело или однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой однодоменное антитело, содержащее только область  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ).

[0403] В некоторых вариантах осуществления, антиген на который нацелен рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, *например*, на опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на генно-инженерных клетках.

[0404] В определенных вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает интегрин  $\alpha\beta6$  (интегрин  $\alpha\beta6$ ), В-клеточный антиген созревания (BCMA), B7-Н3, B7-Н6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), антиген рака яичка, раково-тестикулярный антиген 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, лиганд 1 хемокин мотив С-С (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, протеогликан с хондроитинсульфатами 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), усеченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), мутацию рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептор эфрина А2 (EPHA2), рецептор эстрогена, Fc-подобный рецептор 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), белок связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептор альфа фолиевой кислоты, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), рецептор 5D, связанный с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный антиген человека, ассоциированный с меланомой (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, антиген лейкоцитов человека А1 (HLA-A1), антиген лейкоцитов человека А2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептор домена вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, обогащенный повторами лейцинов элемента А семейства 8 (LRRC8A), антиген Leu, антиген, ассоциированный с

меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, мышинный цитомегаловирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), нейрональную молекулу клеточной адгезии (NCAM), онкофетальный антиген, преимущественно экспрессируемый антигеном меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простато-специфичный антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичный мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор 1 подобный рецептору тирозинкиназы (ROR1), сурвивин гликопротеин трофобластов (TPBG также известный как 5T4), гликопротеин 72 ассоциированный с опухолью (TAG72), белок 1 родственный тирозинкиназе (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), белок 2 родственный тирозинкиназе (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоль Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичный или патоген-экспрессируемый антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, вирусом гепатита С, вирусом гепатита В или другие патогены. Антигены, на которые нацелены рецепторы в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциируемые с В-клеточной неоплазией, такие как любые из ряда известных маркеров В клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

[0405] В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой или включает патоген-специфичный или патоген-экспрессируемый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой вирусный антиген (такой как вирусный антиген ВИЧ, вируса гепатита С, вируса гепатита В, и тому подобное), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены.

[0406] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR анти-BCMA, который является специфичным для BCMA, например, BCMA человека. Химерные рецепторы антигена, содержащие антитела анти-BCMA, включая антитела мыши анти-BCMA человека и антитела человека анти-BCMA человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, описаны ранее. Смотри Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060, US 9,765,342, WO 2016/090320, WO2016090327, WO2010104949A2, WO2016/0046724, WO2016/014789, WO2016/094304, WO2017/025038 и WO2017173256. В некоторых вариантах осуществления, CAR анти-BCMA включает антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий переменную область тяжелой ( $V_H$ ) и/или переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), полученную из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO2016090327. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ). В некоторых аспектах, область  $V_H$  представляет собой или содержит последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%

или 99% идентичность последовательностей с последовательностью аминокислот области  $V_H$  приведенной в любой из SEQ ID NO: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 181, 183, 185 и 188; и/или область  $V_L$  представляет собой или содержит последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с последовательностью аминокислот области  $V_L$ , приведенной в любой из SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 182, 184, 186 и 189.

[0407] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 30, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 32 и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 34, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 36, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO:37. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 38, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 40, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 42, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 77, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 79, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 81, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 83 и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 85, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 87, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 89, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 91, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 93, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 94. В

некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 95, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 97, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 99, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 101, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 103, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 105, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 107, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 30, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 109, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 111, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 181, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 182. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 183, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 184. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 185, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит  $V_H$ , приведенную в SEQ ID NO: 187, и  $V_L$ , приведенную в SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления,  $V_H$  или  $V_L$  имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с любой из рассмотренных выше последовательностей  $V_H$  или  $V_L$  и сохраняет связывание с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, область  $V_H$  является аминоконечной для области  $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления, область  $V_H$  является карбоксиконечной для области  $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления, переменные тяжелые и переменные легкие цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер приведен в SEQ ID NO: 70, 72, 73, 74 или 189.

[0408] В некоторых вариантах осуществления, CAR представляет собой CAR анти-CD19, который является специфичным к CD19, например, к CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит  $V_H$  и/или  $V_L$ , полученную

из FMC63, которая, в некоторых аспектах, может представлять собой scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv и/или домены  $V_H$  получают из FMC63. FMC63, в целом, относится к моноклональному антителу IgG1 мыши, направленному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19, происходящие от человека (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Антитело FMC63 содержит CDRH1 и H2, приведенные в SEQ ID NO: 44, 45 соответственно, и CDRH3, приведенную в SEQ ID NO: 46 или 47 и CDRL1 приведенный в SEQ ID NO: 48 и CDR L2, приведенную в SEQ ID NO: 49 или 50 и CDR L3, приведенную в SEQ ID NO: 51 или 52. Антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 53, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления, svFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDRL1 из SEQ ID NO:48, последовательность CDRL2 из SEQ ID NO:49 и последовательность CDRL3 из SEQ ID NO:51 и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDRH1 из SEQ ID NO:44, последовательность CDRH2 из SEQ ID NO:45 и последовательность CDRH3 из SEQ ID NO:46. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63, приведенную в SEQ ID NO:53, и переменную область легкой цепи FMC63, приведенную в SEQ ID NO:54. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер приведен в SEQ ID NO: 70, 72, 73, 74 или 189. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку,  $V_H$ , линкер и  $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку,  $V_L$ , линкер и  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления, svFv кодируется последовательностью нуклеотидов приведенной в SEQ ID NO:69, или последовательностью, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO:69. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:55, или последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO:55.

[0409] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит  $V_H$  и/или  $V_L$  полученный из SJ25C1, который, в некоторых аспектах, может представлять собой scFv. SJ25C1 представляет собой моноклональное антитело IgG1 мыши, направленное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19, происходящих от человека (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Антитело SJ25C1 содержит CDRH1, H2 и H3 приведенные в SEQ ID NO: 59-61, соответственно, и последовательности CDRL1, L2 и L3 приведенные в SEQ ID NO: 56-58, соответственно. Антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 62, и переменную область легкой цепи ( $V_L$ ), содержащую последовательность аминокислот из SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах

осуществления, svFv содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1 из SEQ ID NO:56, последовательность CDRL2 из SEQ ID NO:57 и последовательность CDRL3 из SEQ ID NO:58, и/или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1 из SEQ ID NO:59, последовательность CDRH2 из SEQ ID NO:60 и последовательность CDRH3 из SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи из SJ25C1, приведенную в SEQ ID NO:62, и вариабельную область легкой цепи из SJ25C1, приведенную в SEQ ID NO:63. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная тяжелая и вариабельная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер приведен в SEQ ID NO:64. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку,  $V_H$ , линкер и  $V_L$ . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку,  $V_L$ , линкер и  $V_H$ . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:65, или последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательностей с SEQ ID NO:65.

[0410] В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как scFv, который содержит один или несколько линкеров, связывающих два домена или две области антитела, такие как вариабельная область тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельная область легкой цепи ( $V_L$ ). Соответственно, антитела содержат одноцепочечные фрагменты антитела, такие как scFv и диатела, в частности, одноцепочечные фрагменты антитела человека, как правило, содержащие линкер (линкеры), соединяющие два домена или две области антитела, такие как области  $V_H$  и  $V_L$ . Линкер, как правило, представляет собой пептидный линкер, *например*, гибкий и/или растворимый пептидный линкер, *например*, обогащенный глицином и серином. Среди линкеров имеются линкеры, обогащенные глицином и серином и/или в некоторых случаях треонином. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно содержат заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамин, которые могут улучшить растворимость. В некоторых вариантах осуществления, линкеры дополнительно содержат один или несколько пролинов.

[0411] В некоторых аспектах, линкеры, обогащенные глицином и серином (и/или треонином), содержат, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такой аминокислоты (аминокислот). В некоторых вариантах осуществления, они содержат, по меньшей мере, или примерно 50%, 55%, 60%, 70% или 75%, глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит, по существу, полностью из глицина, серина и/или треонина. Линкеры, как правило, имеют длину в пределах примерно 5 - примерно 50 аминокислот, как правило, от или от примерно 10 и до или примерно до 30, *например*, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, а в некоторых примерах, длину в пределах 10-25 аминокислот. Иллюстративные линкеры включают линкеры, содержащие различные

количества повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO:19) или GGGS (3GS; SEQ ID NO:71), например, в пределах между 2, 3, 4 и 5 повторами такой последовательности. Иллюстративные линкеры включают линкеры, содержащие или состоящие из последовательности, приведенной в SEQ ID NO:72 (GGGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO:189 (ASGGGGSGGRASGGGS), SEQ ID NO:73 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) или SEQ ID NO: 74 (SRGGGGSGGGSGGGGSLEMA).

[0412] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, например, часть антитела рекомбинантного рецептора, *например*, CAR, дополнительно содержит спейсер, который может представлять собой или содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или его варианта или модифицированной версии, такую как шарнирная область, *например*, шарнирная область IgG4, шарнирная область IgG1, C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> и/или область Fc. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсерную и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или ее часть происходит от IgG человека, например, IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит в качестве спейсерной области между антиген-распознающим компонентом, *например*, scFv и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечит повышенную отзывчивость клетки после связывания антигена, по сравнению с отсутствием спейсера.

[0413] Иллюстративные спейсеры, *например*, шарнирные области, включают те, что описаны в публикации заявки на Международный патент номер WO2014031687. В некоторых примерах, спейсер имеет длину 12 аминокислот или около того, или его длина не более 12 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают те, что содержат, по меньшей мере, примерно 10-229 аминокислот, примерно 10-200 аминокислот, примерно 10-175 аминокислот, примерно 10-150 аминокислот, примерно 10-125 аминокислот, примерно 10-100 аминокислот, примерно 10-75 аминокислот, примерно 10-50 аминокислот, примерно 10-40 аминокислот, примерно 10-30 аминокислот, примерно 10-20 аминокислоты или примерно 10-15 аминокислот, и включая любое целое число между конечными точками любых перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная область содержит примерно 12 аминокислот или меньше, примерно 119 аминокислот или меньше, или примерно 229 аминокислот или меньше. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой спейсер, имеющий, по меньшей мере, конкретную длину, например, имеет длину, которая составляет, по меньшей мере, 100 аминокислот, например, длину, по меньшей мере, 110, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают шарнир IgG4 сам по себе, шарнир IgG4, связанный с доменами C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C<sub>H</sub>3. Иллюстративные спейсеры включают шарнир IgG4 сам по себе, шарнир IgG4, связанный с доменами C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C<sub>H</sub>3. Иллюстративные спейсеры включают, но, не ограничиваясь этим, те, что описаны в Hudecek *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 19:3153 (2013), Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol Res.*

3(2): 125-135, в публикации заявки на Международный патент WO2014031687, в патенте США № 8822647 или в опубликованной заявке № US2014/0271635. В некоторых вариантах осуществления, спейсер включает последовательность шарнирной области иммуноглобулина, область C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько фрагментов из шарнира C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3, полученных полностью или частично из IgG4 или IgG2. В некоторых случаях, шарнир C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3 получают из IgG4. В некоторых аспектах, один или несколько фрагментов шарнира C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3 являются химерными и содержат последовательность, полученную из IgG4 и IgG2. В некоторых примерах, спейсер содержит химерный шарнир IgG4/2, C<sub>H</sub>2 IgG2/4 и область C<sub>H</sub>3 IgG4.

[0414] В некоторых вариантах осуществления, спейсер, который может представлять собой константную область иммуноглобулина или ее часть, представляет собой IgG человека, такой как IgG4 или IgG1. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (приведенную в SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, кодируемый спейсер представляет собой или содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления, константная область или ее часть происходит от IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125.

[0415] В некоторых вариантах осуществления, спейсер может быть получен полностью или частично из IgG4 и/или IgG2 и может содержать мутации, такие как одна или несколько мутаций отдельных аминокислот, в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах, модификация аминокислот представляет собой замещение пролином (P) серина (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, модификация аминокислот представляет собой замещение глутамином (Q) аспарагина (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, например, мутация N177Q в положении 177, в области C<sub>H</sub>2, полноразмерной Fc последовательности IgG4 или N176Q в положении 176, в области CH2, полноразмерной Fc последовательности IgG4.

[0416] Другие иллюстративные спейсерные области включают шарнирные области, полученные из CD8a, CD28, CTLA4, PD-1 или FcγRIIIa. В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит усеченный внеклеточный домен или шарнирную область CD8a, CD28, CTLA4, PD-1 или FcγRIIIa. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой усеченную шарнирную область CD28. В некоторых вариантах осуществления, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной 2 - 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий аланины или аланин и аргинин, *например*, аланиновый триплет (AAA) или RAAA (SEQ ID NO: 180), присутствует и образует связь между scFv и спейсерной областью CAR. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах

осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 117-119. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 122. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 124.

[0417] В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 или 29, 114, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 124 или 125.

[0418] Домен распознавания антигена, как правило, связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые воспроизводят стимуляцию и/или активацию через комплекс рецептора антигена, такого как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигналият через другой рецептор на поверхности клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (*например*, антитело) связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом. В одном из вариантов осуществления, используется трансмембранный домен, который в природе ассоциируется с одним из доменов в рецепторе, *например*, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен выбирают или модифицируют с помощью замещения аминокислот, чтобы предотвратить связывание таких доменов с трансмембранным доменом таких же или иных поверхностных мембранных белков, для сведения к минимуму взаимодействий с другими элементами комплекса рецептора.

[0419] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получают либо из природного, либо из синтетического источника. Когда источник является природным, в некоторых аспектах домен получают из любого мембранно-связанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, полученные из (*то есть* содержат, по меньшей мере, их трансмембранную область (области)) альфа, бета или зета цепи рецептора Т-клеток, CD28, CD3 эписилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8a, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137 (4-1BB), CD154, CTLA-4 или PD-1. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит в основном гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах, триплет из фенилаланина, триптофана и валина будет находиться на каждом краю синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связывание происходит посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена (доменов). Иллюстративные последовательности трансмембранных доменов представляют

собой или содержат последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 8, 115, 121, 123, 178 или 179.

[0420] Среди внутриклеточных сигнальных доменов имеются те, которые производят или примерно воспроизводят сигнал через природный рецептор антигена, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал через костимулирующий рецептор сам по себе. В некоторых вариантах осуществления, присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной 2-10 аминокислот, например, содержащий глицины и серины, *например*, глицин-сериновый дублет, и он образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0421] Рецептор, *например*, CAR, как правило, содержит, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая медирует стимуляцию и/или активацию и цитотоксичность Т-клеток, *например*, цепь CD3 зета. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающая часть соединена с одним или несколькими клеточными сигнальными модулями. В некоторых вариантах осуществления, клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых вариантах осуществления, рецептор, *например*, CAR, дополнительно содержит часть из одной или нескольких дополнительных молекул, например, Fc-рецептор  $\gamma$ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор содержит химерную молекулу между CD3-зета (CD3- $\zeta$ ) или Fc-рецептором  $\gamma$  и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0422] В некоторых вариантах осуществления, при лигировании CAR или другого химерного рецептора, цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора стимулирует и/или активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, *например*, генно-инженерной Т-клетки, полученной для экспрессирования CAR. Например, в некоторых контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперную активность, такую как секретирование цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, усеченная часть внутриклеточного сигнального домена компонента рецептора антигена или костимулирующей молекулы используется вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности рецептора Т-клеток (TCR), а в некоторых аспектах, также и последовательности сорепцепторов, которые в природном контексте действуют совместно с такими рецепторами для иницирования передачи сигнала после зацепления с рецептором антигена, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, которая имеет такие же функциональные способности.

[0423] В контексте природного TCR, полная активация, как правило, требует не только передачи сигнала через TCR, но также и костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, для облегчения полной активации, компонент для генерирования вторичного или костимулирующего сигнала также включается в CAR. В других вариантах осуществления, CAR не содержит компонента для генерирования костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR экспрессируется в этой же клетке и обеспечивает компонент для генерирования вторичного или костимулирующего сигнала.

[0424] Стимуляция и/или активация T-клеток описывается в некоторых аспектах как медируемая двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, что инициируют антиген-зависимую первичную стимуляцию и/или активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные области, домены или последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические сигнальные области, домены или последовательности). В некоторых аспектах, CAR содержит один или оба таких сигнальных компонента.

[0425] В некоторых аспектах, CAR содержит первичные цитоплазматические сигнальные области, домены или последовательности, которые регулируют первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные области, домены или последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают те, которые получают из TCR зета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD8, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая сигнальная молекула (молекулы) в CAR содержит (содержат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит сигнальную область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такую как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы. В некоторых аспектах, тот же CAR содержит как первичную цитоплазматическую сигнальную область, так и костимулирующие сигнальные компоненты.

[0426] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько различных рекомбинантных рецепторов могут содержать одну или несколько различных внутриклеточных сигнальных областей или доменов. В некоторых вариантах осуществления, первичная цитоплазматическая сигнальная область содержится в одном CAR, в то время как костимулирующий компонент обеспечивается другим рецептором, например, другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активационные или стимулирующие CAR и

костимулирующие CAR, которые экспрессируются на одной и той же клетке (*смотри* WO2014/055668).

[0427] В некоторых аспектах, клетки содержат один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетки дополнительно содержат ингибиторные CAR (iCAR, *смотри* Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013), такие как CAR, распознающие антиген иной, чем антиген, ассоциированный с заболеванием и/или состоянием, или специфичный для него, при этом активирующий сигнал, поступающий через нацеленный на заболевание CAR, уменьшается или ингибируется посредством связывания ингибиторного CAR с его лигандом, *например*, для уменьшения нецелевых воздействий.

[0428] В определенных вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный и сигнальный домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (*например*, CD3-зета). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3 зета.

[0429] В некоторых вариантах осуществления, CAR охватывает один или несколько, например, два или более, костимулирующих доменов и первичную цитоплазматическую сигнальную область, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR содержат внутриклеточные компоненты, такие как внутриклеточная сигнальная область (области) или домен (домены) CD3-зета, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточную сигнальную область или домен костимулирующей молекулы Т-клетки, например, от CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS, в некоторых случаях, между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью или доменом. В некоторых аспектах, костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой одну или несколько молекул из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS.

[0430] В некоторых случаях, CAR упоминаются как первое, второе и/или третье поколение CAR. В некоторых аспектах, первое поколение CAR - это то, которое обеспечивает только индуцированный CD3-цепью сигнал при связывании антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения - это то, что обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, например, рецептор, содержащий внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, е поколения - это то, что содержит множество костимулирующих доменов от различных костимулирующих рецепторов.

[0431] В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах, химерный рецептор антигена содержит внеклеточную часть, содержащую антитело или его фрагмент, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах

осуществления, антитело или его фрагмент включает scFv и внутриклеточный домен включает ITAM. В некоторых аспектах, внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен зета цепи от цепи CD3-зета (CD3 $\zeta$ ). В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, соединяющий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут связываться непосредственно или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внеклеточную часть молекулы, из которой получен трансмембранный домен, такую как внеклеточная часть CD28. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен, полученный из костимулирующей молекулы Т-клетки или ее функционального варианта, например, область между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах, костимулирующая молекула Т-клетки представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0432] Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, *например*, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или его функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 зета или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, *например*, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или его функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 зета или его функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно содержит спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, такая как шарнир Ig, *например*, шарнир IgG4, такой как шарнир только из спейсера.

[0433] В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, *например*, CAR представляет собой или содержит трансмембранный домен CD28 человека (*например*, Accession No. P10747.1) или CD8a (Accession No. P01732.1) или его вариант, такой как трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 8, 115, 178 или 179, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 8, 115, 178 или 179; в некоторых вариантах осуществления, часть, содержащая трансмембранный домен рекомбинантного

рецептора, содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, или примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ней.

[0434] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный компонент (компоненты) рекомбинантного рецептора, *например*, CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, например, домен с замещением LL GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. Например, внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (*например*, Accession No. Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такую как последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 12.

[0435] В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен рекомбинантного рецептора, *например*, CAR, содержит стимулирующий сигнальный домен CD3 зета человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 $\zeta$  человека (Accession No. P20963.2) или сигнальный домен CD3 зета, как описано в патенте США № 7446190 или в патенте США № 8911993. Например, в некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность аминокислот как приведено в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

[0436] В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, например, только шарнир IgG4 или IgG1, например, спейсер только из шарнира, приведенный в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 125. В других вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит шарнир Ig, *например*, шарнир, полученный из IgG4, необязательно, связанный с доменами CH2 и/или CH3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, *например*, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, как приведено в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой Ig шарнир, *например*, шарнир IgG4, связанный только с доменом CH3, как приведено в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит обогащенную глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие

линкеры. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир CD8a, как приведено в любой из SEQ ID NO: 117-119, шарнир FcγRIIIa, такой как приведено в SEQ ID NO: 124, шарнир CTLA4, такой как приведены в SEQ ID NO: 120, или шарнир PD-1, такой как приведены в SEQ ID NO: 122.

[0437] Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFvs, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область и/или одну или несколько константных областей молекулы тяжелой цепи, такой как спейсер, содержащий шарнир Ig, трансмембранный домен, содержащий весь трансмембранный домен, полученный из CD28, или его часть, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD28, и сигнальный домен CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнир Ig, трансмембранный домен, полученный из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и сигнальный домен, полученный из CD3 зета.

[0438] Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, вводимыми субъекту, как правило, распознают или специфично связывают молекулу, которая экспрессируется ассоциировано и/или является специфичной для заболевания или состояния, или его клеток, которые лечатся. При специфичном связывании с молекулой, *например*, антигеном, рецептор, как правило, доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-трансдуцированный сигнал, в клетку, тем самым способствуя иммунному ответу, нацеленному на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки экспрессируют CAR, который специфично связывает антиген, экспрессируемый клеткой или тканью заболевания или состояния, или ассоциированный с заболеванием или состоянием. Неограничивающие иллюстративные последовательности CAR приведены в SEQ ID NO: 126-177.

[0439] В некоторых вариантах осуществления, кодируемая последовательность CAR может дополнительно содержать сигнальную последовательность или сигнальный пептид, который направляет или доставляет CAR к поверхности клетки, в которой экспрессируется CAR. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид получают из трансмембранного белка. В некоторых примерах сигнальный пептид получают из CD8a, CD33 или IgG. Иллюстративные сигнальные пептиды включают последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 21, 75 и 76, или их вариант.

[0440] В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело анти-CD19, такое как фрагмент антитела, включая scFvs, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область, и/или одну или несколько константных областей молекулы тяжелой цепи, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнир Ig, или других спейсеров, описанных в настоящем документе, трансмембранный домен, содержащий весь трансмембранный домен, полученный из CD28, или его часть, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD28 и сигнальный домен CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело анти-CD19 или его

фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнир Ig, или другие спейсеры, описанные в настоящем документе, трансмембранный домен, полученный из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и сигнальный домен, полученный из CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления, такие конструкции CAR дополнительно содержат элемент рибосомального проскока T2A и/или последовательность tEGFR, *например*, после CAR.

[0441] В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело анти-BCMA или его фрагмент, например, любое из антител анти-BCMA человека, включая sdAb и scFv, описанные в настоящем документе, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнир Ig, или другие спейсеры, описанные в настоящем документе, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело анти-BCMA или его фрагмент, например, любое из антител анти-BCMA человека, включая sdAb и scFv, описанные в настоящем документе, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнир Ig, или другие спейсеры, описанные в настоящем документе, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления, такие конструкции CAR дополнительно содержат элемент рибосомального проскока T2A и/или последовательность tEGFR, *например*, после CAR.

## **2. Химерный рецептор аутоантитела (CAAR)**

[0442] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантитела (CAAR). В некоторых вариантах осуществления, CAAR связывает, например, специфично связывает или распознает аутоантитело. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие CAAR, такие как Т-клетки, полученные с помощью генной инженерии, для экспрессирования CAAR, можно использовать для связывания и уничтожения аутоантитело-экспрессирующих клеток, но не клеток, экспрессирующих нормальные антитела. В некоторых вариантах осуществления, CAAR-экспрессирующие клетки можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессированием своих антигенов, например, аутоиммунных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления, CAAR-экспрессирующие клетки могут нацеливаться на В клетки, которые в конечном счете продуцируют аутоантитела и проявляют аутоантитела на своих клеточных поверхностях, метить эти В клетки как специфичные для целевого заболевания для терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления, CAAR-экспрессирующие клетки можно использовать для эффективного нацеливания на патогенные В клетки и их уничтожение при аутоиммунных заболеваниях посредством нацеливания на В клетки, вызывающие заболевание, с использованием антиген-специфичного химерного рецептора аутоантитела. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор представляет собой CAAR, такой как любой рецептор из описанных в публикации заявки на США № US 2017/0051035.

[0443] В некоторых вариантах осуществления, СААР содержит домен связывания аутоантитела, трансмембранный домен и один или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматические сигнальные домены или области). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или содержит первичную сигнальную область, сигнальный домен, который способен стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента рецептора Т-клеток (TCR) (например, внутриклеточный сигнальный домен или область зета цепи из цепи CD3-зета (CD3 $\zeta$ ) или его функциональный вариант или сигнальную часть) и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM).

[0444] В некоторых вариантах осуществления, домен связывания аутоантитела содержит аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа аутоантитела, на который он нацелен. Например, аутоантиген может выбираться поскольку он распознает аутоантитело на целевой клетке, такой как В клетка, ассоциированной с конкретным болезненным состоянием, например, аутоиммунным заболеванием, таким как аутоиммунное заболевание, медируемое аутоантителом. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание включает вульгарный пемфигус (PV). Иллюстративные аутоантигены включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

### 3. TCR

[0445] В некоторых вариантах осуществления предлагаются генно-инженерные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют рецептор Т-клеток (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая распознает пептидный эпитоп или эпитоп целевого полипептида Т-клетки, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок. В некоторых аспектах, TCR представляет собой или включает рекомбинантный TCR.

[0446] В некоторых вариантах осуществления “рецептор Т-клеток” или “TCR” представляет собой молекулу, которая содержит переменные цепи  $\alpha$  и  $\beta$  (также известны как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или переменные цепи  $\gamma$  и  $\delta$  (также известны как TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , соответственно) или их антигенсвязывающие части, и которая способна специфично связывать пептид, связанный с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления, TCR имеет форму  $\alpha\beta$ . Как правило, TCR, которые существуют в формах  $\alpha\beta$  и  $\gamma\delta$ , являются в целом структурно сходными, но Т-клетки, экспрессирующие их, могут иметь различные анатомические положения или функции. TCR может находиться на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR находится на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он, как правило, отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

[0447] Если не утверждается иного, термин “TCR” должен пониматься как охватывающий полноразмерные TCR, а также их антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, TCR

представляет собой интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в форме  $\alpha\beta$  или в форме  $\gamma\delta$ . В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой антигенсвязывающую часть, которая меньше полноразмерного TCR, но связывается со специфичным пептидом, связанным с молекулой МНС, например, связывается с комплексом МНС-пептид. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но еще быть способным связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс МНС-пептид, с которым связывается полноразмерный TCR. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть содержит вариабельные домены TCR, такие как вариабельная цепь  $\alpha$  и вариабельная цепь  $\beta$  TCR, достаточные для формирования сайта связывания для связывания со конкретным комплексом МНС-пептид. Как правило, вариабельные цепи TCR содержат области, определяющие комплементарность, вовлеченные в распознавание пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

[0448] В некоторых вариантах осуществления, вариабельные домены TCR содержат гипервариабельные петли или области, определяющие комплементарность (CDR), которые, как правило, вносят главный вклад в способности распознавания и связывания антигена и в специфичность. В некоторых вариантах осуществления, CDR TCR или их комбинация формирует все или, по существу, все антигенсвязывающие сайты данной молекулы TCR. Различные CDR в вариабельной области цепи TCR, как правило, разделены рамочными областями (FR), которые как правило, проявляют меньшую вариабельность среди молекул TCR, по сравнению с CDR (смотри, *например*, Jores *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia *et al.*, EMBO J. 7:3745, 1988; смотри также Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления, CDR3 представляет собой главную CDR ответственную за связывание антигена или специфичность, или является самым важным среди трех CDR вариабельной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с частью процессированного пептида комплекса пептид-МНС. В некоторых контекстах, CDR1 цепи альфа может взаимодействовать с N-конечной частью определенных антигенных пептидов. В некоторых контекстах, CDR1 цепи бета может взаимодействовать с C-конечной частью пептида. В некоторых контекстах, CDR2 вносит самый сильный вклад или представляет собой первичную CDR, ответственную за взаимодействие с частью МНС комплекса МНС-пептид или за ее распознавание. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область  $\beta$ -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая, как правило, вовлечена в связывание суперантигена, а не в распознавание антигена (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0449] В некоторых вариантах осуществления, TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (смотри, *например*, Janeway *et al.*, *Immunobiology: Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах, каждая цепь TCR может содержать один N-конечный вариабельный домен иммуноглобулина, один

константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конечном краю. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциируется с инвариантными белками комплекса CD3, вовлеченными в медиацию передачи сигналов.

[0450] В некоторых вариантах осуществления, цепь TCR содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (*например*,  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -цепи) может содержать два иммуноглобулиноподобных домена, таких как переменный домен (*например*,  $V\alpha$  или  $V\beta$ ; как правило, аминокислоты 1-116 на основе нумерации Кабат, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) и константный домен (*например*, константный домен  $\alpha$ -цепи или  $C\alpha$ , как правило, положения 117-259 цепи на основе нумерации Кабат или константный домен  $\beta$  цепи или  $C\beta$ , как правило, положения 117-295 цепи на основе нумерации Кабат) рядом с клеточной мембраной. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть TCR, сформированная двумя цепями, содержит два ближних к мембране константных домена и два отдаленных от мембраны переменных домена, каждый из этих переменных доменов содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых цистеиновый остаток образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR может содержать дополнительный цистеиновый остаток в каждой из  $\alpha$  и  $\beta$  цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0451] В некоторых вариантах осуществления, цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях, цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях, структура позволяет TCR ассоциироваться с другими молекулами подобными CD3 и с их субъединицами. Например, TCR, содержащие константные домены с трансмембранной областью, могут закреплять белок в клеточной мембране и ассоциироваться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты сигнальных субъединиц CD3 (*например*, цепи CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  и CD3 $\zeta$ ) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые вовлечены в способность комплекса TCR к передаче сигналов.

[0452] В некоторых вариантах осуществления, TCR может представлять собой гетеродимер из двух цепей  $\alpha$  и  $\beta$  (или, необязательно,  $\gamma$  и  $\delta$ ) или он может представлять собой конструкцию TCR из одной цепи. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи  $\alpha$  и  $\beta$  или цепи  $\gamma$  и  $\delta$ ), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

[0453] В некоторых вариантах осуществления, TCR может генерироваться из известной последовательности (последовательностей) TCR, такой как последовательности цепей  $V\alpha, \beta$ , для которых легко доступна, по существу, полноразмерная кодирующая

последовательность. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V цепей из клеточных источников, хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, можно получить из различных источников, например, с помощью цепной реакции полимеразы (PCR), амплификации TCR-кодирующих нуклеиновых кислот в данной клетке или клетках или выделенных из них, или синтез публично доступных последовательностей ДНК TCR.

[0454] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные рецепторы включают рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из встречающихся в природе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клон Т-клеток с высоким сродством к целевому антигену (например, антигену рака) идентифицируется, выделяется у пациента и вводится в клетки. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для целевого антигена генерируется у трансгенных мышей, полученных с помощью генной инженерии, с помощью генов иммунной системы человека (например, системы антигена лейкоцита человека или HLA). См. например, антигены опухоли (смотри, например, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 и Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808. В некоторых вариантах осуществления, для выделения TCR против целевого антигена используют фаговый дисплей (смотри, например, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 и Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354.

[0455] В некоторых вариантах осуществления, TCR получают из биологического источника, например, из клеток, например, из Т-клеток (*например*, цитотоксичных Т-клеток), гибридом Т-клеток или другого публично доступного источника. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки можно получить из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой TCR от тимической селекции. В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой неоэпитоп-рестриктированную TCR. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут представлять собой гибридому или клон культивируемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть можно генерировать синтетически, зная последовательность TCR.

[0456] В некоторых вариантах осуществления, TCR генерируется из TCR, идентифицированного или выбранного при скрининге библиотеки кандидатов TCR против целевого полипептидного антигена или его эпитопа для целевой Т-клетки. Библиотеки TCR можно генерировать посредством амплификации репертуара V $\alpha$  и V $\beta$  из Т-клеток, выделенных у субъекта, включая клетки, присутствующие в РВМС, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях, Т-клетки могут амплифицироваться из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR можно генерировать из клеток CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно амплифицировать из источника Т-клеток от нормального здорового субъекта, *то есть*, из библиотек нормальных TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут амплифицироваться из источника Т-клеток заболевшего субъекта, *то есть*, из библиотек болезненных TCR. В некоторых вариантах осуществления,

вырожденные праймеры используют для амплификации репертуара генов V $\alpha$  и V $\beta$ , например, с помощью RT-PCR, в таких образцах как Т-клетки, полученные от людей. В некоторых вариантах осуществления, библиотеки scTv можно собирать из библиотек наивных V $\alpha$  и V $\beta$ , в которых амплифицированные продукты клонируются или собираются для разделения с помощью линкера. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут быть специфичными к аллели HLA. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR могут генерироваться посредством мутагенеза или диверсификации родительской или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах, TCR подвергаются направленной эволюции, например, посредством мутагенеза, *например*,  $\alpha$  или  $\beta$  цепи. В некоторых аспектах, изменяют конкретные остатки в CDR TCR. В некоторых вариантах осуществления, выбранные TCR могут модифицироваться посредством созревания сродства. В некоторых вариантах осуществления, антиген-специфичные Т-клетки могут выбираться, например, посредством скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах, TCR, *например*, TCR, присутствующие в антиген-специфичных Т-клетках, могут выбираться, например, по активности связывания, *например*, по конкретному сродству или авидности относительно антигена.

[0457] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть является такой, которая была модифицирована или подверглась воздействию генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления, используют способы направленной эволюции для генерирования TCR с измененными свойствами, например, с более высоким сродством к конкретному комплексу MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления, направленная эволюция реализуется с помощью методов дисплея, включая, но, не ограничиваясь этим, дрожжевой дисплей (Holler *et al.*, (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler *et al.*, (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li *et al.*, (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54) или Т-клеточный дисплей (Chervin *et al.*, (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления, подходы с дисплеем включают генную инженерию или модификацию известного, родительского или референтного TCR. Например, в некоторых случаях, TCR дикого типа можно использовать как шаблон для продуцирования мутагенезированных TCR, в которых мутировали один или несколько остатков CDR, и выбрать мутанты с желаемым измененным свойством, таким как более высокое сродство к желаемому целевому антигену.

[0458] В некоторых вариантах осуществления, пептиды целевого полипептида для применения при продуцировании или генерировании TCR, представляющего интерес, известны или могут легко идентифицироваться с помощью рутинных экспериментов. В некоторых вариантах осуществления, пептиды пригодные для использования при генерировании TCR или антигенсвязывающих частей можно определить на основе присутствия HLA-рестриктированного мотива в целевом полипептиде, представляющем интерес, таком как целевой полипептид, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления, пептиды идентифицируют, используя компьютерные предсказательные

модели, с помощью рутинных действий. В некоторых вариантах осуществления, для предсказания сайтов связывания МНС класса I, такие модели включают, но, не ограничиваясь этим, ProPred1 (Singh и Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237 и SYFPEITHI (смотри Schuler *et al.*, (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления, МНС-рестриктированный эпитоп представляет собой HLA-A0201, который экспрессируется приблизительно у 39-46% от всех европеоидов и, следовательно, представляет собой соответствующий выбор антигена МНС для использования при приготовлении TCR или другой молекулы, связывающей комплекс МНС-пептид.

[0459] HLA-A0201-связывающие мотивы и сайты расщепления для протеасом и иммунно-протеасом стали известны с помощью использования компьютерных предсказательных моделей. Для предсказания сайтов связывания МНС класса I, такие модели включают, но, не ограничиваясь этим, ProPred1 (описано более подробно в Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001) и SYFPEITHI (смотри Schuler *et al.*, SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007)

[0460] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть может представлять собой рекомбинантно продуцируемый природный белок или его мутантную форму, у которой изменены одно или несколько свойств, таких как характеристика связывания. В некоторых вариантах осуществления, TCR можно получить у одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другие млекопитающие. TCR может быть связанным с клеткой или находиться в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, для целей предлагаемых способов, TCR имеет связанную с клеткой форму, экспрессируемую на поверхности клеток.

[0461] В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой одноцепочечный TCR (sc-TCR). В некоторых вариантах осуществления, dTCR или scTCR имеют структуры, как описано в WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186.

[0462] В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления, любой из TCR, включая dTCR или scTCR, может связываться с сигнальными доменами, которые дают активный TCR на поверхности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, TCR экспрессируется на поверхности клеток.

[0463] В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области  $\alpha$  цепи TCR, слита с N окончанием последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\alpha$  цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области  $\beta$  цепи TCR, слита с N окончанием последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области  $\beta$  цепи TCR, первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления, связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных TCR  $\alpha\beta$ . В некоторых вариантах осуществления, межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в нативном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько цистеинов могут инкорпорироваться во внеклеточные последовательности константной области пары полипептидов dTCR. В некоторых случаях может быть желательной, как нативная, так и ненативная дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления в мембране.

[0464] В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит  $\alpha$  цепь TCR, содержащую вариабельный домен  $\alpha$ , константный домен  $\alpha$  и первый мотив димеризации, прикрепленный к C-окончанию константного домена  $\alpha$ , и цепь  $\beta$  TCR, содержащую вариабельный домен  $\beta$ , константный домен  $\beta$  и первый мотив димеризации, прикрепленный к C-окончанию константного домена  $\beta$ , где первый и второй мотивы димеризации легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, связывая вместе  $\alpha$  цепь TCR и  $\beta$  цепь TCR.

[0465] В некоторых вариантах осуществления, TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR может генерироваться с использованием соответствующих известных способов, смотри *например*, Soo Hoo, W. F. *et al.*, *PNAS (USA)* 89, 4759 (1992); Wülfing, C. и Plückthun, A., *J. Mol. Biol.* 242, 655 (1994); Kurucz, I. *et al.*, *PNAS (USA)* 90 3830 (1993); опубликованные Международные заявки №№ WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; и Schlueter, C. J. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную ненативную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации цепей TCR (смотри, *например*, опубликованную Международную заявку PCT № WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления, scTCR представляет собой не имеющий дисульфидной связи усеченный TCR, в котором гетерологичные лейциновые молнии, слитые с их C-окончаниями, облегчают ассоциацию цепей (смотри, *например*, опубликованную Международную заявку PCT № WO99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит вариабельный домен TCR $\alpha$ , ковалентно связанный с вариабельным доменом TCR $\beta$  через пептидный линкер (смотри, *например*, опубликованную Международную заявку PCT № WO99/18129).

[0466] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности аминокислот, соответствующей вариабельной области  $\alpha$  цепи TCR, второй сегмент, состоящий из последовательности аминокислот, соответствующей последовательности вариабельной области  $\beta$  цепи TCR слитой с N-окончанием последовательности аминокислот, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена  $\beta$  цепи TCR, и линкерную последовательность, связывающую C-окончание первого сегмента с N-окончанием второго сегмента.

[0467] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области  $\alpha$  цепи слитой с N-окончанием последовательности внеклеточного константного домена  $\alpha$  цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области  $\beta$  цепи слитой с N-окончанием последовательности внеклеточной константной и трансмембранной последовательности  $\beta$  цепи, и, необязательно, линкерную последовательность связывающую C-окончание первого сегмента с N-окончанием второго сегмента.

[0468] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области  $\beta$  цепи TCR слитой с N-окончанием последовательности внеклеточного константного домена  $\beta$  цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области  $\alpha$  цепи слитой с N-окончанием последовательности внеклеточной константной, и трансмембранную последовательности  $\alpha$  цепи, и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую C-окончание первого сегмента с N-окончанием второго сегмента.

[0469] В некоторых вариантах осуществления, линкер scTCR, который связывает первый и второй сегменты TCR, может представлять собой любой линкер способный образовывать одинарную полипептидную нить, сохраняя при этом специфичность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления, линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P представляет собой пролин и AA представляет последовательность аминокислот, где аминокислоты представляют собой глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй сегменты спариваются так, что последовательности вариабельной области ориентируются для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину для перекрытия расстояния между C-окончанием первого сегмента и N-окончанием второго сегмента или наоборот, но не является слишком длинным чтобы не блокировать или не уменьшать связывание scTCR с целевым лигандом. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от или примерно от 10 до 45 аминокислот, например, 10-30 аминокислот или 26-41 аминокислотных остатков, например, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет формулу -PGGG-(SGGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин (SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 17)

[0470] В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток области иммуноглобулина константного домена  $\alpha$  цепи с остатком области иммуноглобулин константного домена  $\beta$  цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечная дисульфидная связь не присутствует в нативном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько цистеинов могут включаться во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях может быть желательной как нативная, так и ненативная дисульфидная связь.

[0471] В некоторых вариантах осуществления, dTCR или scTCR, содержащие введенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько нативных цистеинов, образующих нативные межцепочечные дисульфидные связи, замещаются другим остатком, таким как серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, введенная дисульфидная связь может формироваться посредством мутации не цистеиновых остатков на первом и втором сегментах на цистеин. Иллюстративные ненативные дисульфидные связи TCR описаны в опубликованной Международной заявке РСТ № WO2006/000830.

[0472] В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует сродство с равновесной константой связывания с целевым антигеном в пределах или примерно в пределах между  $10^{-5}$  и  $10^{-12}$  М, и со всеми индивидуальными значениями и диапазонами в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления, целевой антиген представляет собой комплекс МНС-пептид или лиганд.

[0473] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, например,  $\alpha$  и  $\beta$  цепи, можно амплифицировать с помощью PCR, клонирования или других соответствующих средств и клонировать в виде соответствующего вектора или векторов экспрессии. Вектор экспрессии может представлять собой любой пригодный для использования рекомбинантный вектор экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфицирования любого пригодного для использования хозяина. Пригодные для использования векторы включают те, которые сконструированы для репродуцирования и размножения или для экспрессирования, либо как для того, так и для другого, например, плазмиды и вирусы.

[0474] В некоторых вариантах осуществления, вектор может представлять собой вектор серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, La Jolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях можно также использовать векторы бактериофагов, такие как  $\lambda$ G10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать векторы экспрессии растений, и они включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, векторы экспрессии животных включают pEUK-CI, pMAM и

pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, используют вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

[0475] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные векторы экспрессии можно приготовить, используя стандартные технологии рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны транскрипции и трансляции, инициации и терминации, которые являются специфичными к типу хозяина (*например*, бактерии, грибка, растения или животного), которому должен вводиться вектор, соответствующим образом и с учетом того, основан ли вектор на ДНК или на РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор может содержать ненативный промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеотидов? кодирующей TCR или его антигенсвязывающую часть (или другую молекулу связывания МНС-пептид). В некоторых вариантах осуществления, промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор? находящийся в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мышинных. Другие известные промоторы также рассматриваются.

[0476] В некоторых вариантах осуществления, для генерирования вектора, кодирующего TCR,  $\alpha$  и  $\beta$  цепи амплифицируются с помощью PCR из цельной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующих TCR, представляющего интерес, и клонируются в вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления,  $\alpha$  и  $\beta$  цепи клонируются в один и том же вектор. В некоторых вариантах осуществления,  $\alpha$  и  $\beta$  цепи клонируются в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления, генерируемые  $\alpha$  и  $\beta$  цепи инкорпорируются в ретровирусный, *например*, лентивирусный вектор.

#### **4. Мультинацеливание**

[0477] В некоторых вариантах осуществления, клетки и способы включают стратегии мультинацеливания, такие как экспрессирование двух или более генно-инженерных рецепторов на клетке, каждый из них распознает один и тот же или иной антиген и, как правило, каждый из них содержит иной внутриклеточный сигнальный компонент. Такие стратегии мультинацеливания описаны, например, в публикации Международной заявки № PCT WO 2014055668 A1 (описывающей комбинации активирующих и костимулирующих CAR, *например*, нацеливание на два различных антигена, присутствующих индивидуально на нецелевых, *например*, нормальных клетках, но присутствующих вместе только на клетках заболевания или состояния, которое должно лечиться) и Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013) (описывающей клетки, экспрессирующие активирующие и ингибиторные CAR, такие как те, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым как в нормальных или непораженных клетках, так и клетках заболевания или состояния, которое должно лечиться, а ингибиторный CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, которых нет желания лечить).

[0478] Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки содержат рецептор, экспрессирующий первый генно-инженерный рецептор антигена (*например*, CAR или TCR), который может индуцировать сигнал активации для клетки, как правило, при специфичном связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, *например*, с первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, клетка дополнительно содержит второй генно-инженерный рецептор антигена (*например*, CAR или TCR), *например*, химерный костимулирующий рецептор, который может индуцировать костимулирующий сигнал для иммунной клетки, как правило, при специфичном связывании со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, первый антиген и второй антиген являются различными.

[0479] В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй генно-инженерный рецептор антигена (*например*, CAR или TCR) может индуцировать сигнал активации для клетки. В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления, активация, индуцируемая первым рецептором, включает передачу сигнала или изменение экспрессирования белка в клетке, приводящее в результате к началу иммунного ответа, такого как фосфорилирование ITAM и/или иницирование каскада передачи ITAM-медируемого сигнала, формирование иммунологического синапса и/или образование кластеров молекул вблизи связанного рецептора (*например*, CD4 или CD8, и тому подобное), активацию одного или нескольких факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1, и/или индуцирование генов экспрессии таких факторов как цитокины, факторы пролиферации и/или выживания.

[0480] В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй рецептор содержат внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (4-1 BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй рецепторы содержат внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов, которые являются различными. В одном из вариантов осуществления, первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28, а второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB или наоборот.

[0481] В некоторых вариантах осуществления, первый и/или второй рецептор содержит как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, так и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

[0482] В некоторых вариантах осуществления, первый рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, и второй рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в комбинации с сигналом активации, индуцируемым в этой же клетке - это то, что дает в результате иммунный ответ, такой как стойкий и

долговременный ответ иммунный ответ, такой как увеличение экспрессирования генов, секретирования цитокинов и других факторов и усиление эффекторных функций, медируемых Т-клетками, таких как уничтожение клеток.

[0483] В некоторых вариантах осуществления, ни лигирование первого рецептора самого по себе, ни лигирование второго рецептора самого по себе не индуцирует стойкого иммунного ответа. В некоторых аспектах, если лигируется только один рецептор, клетка становится толеризированной или нечувствительной к антигену или ингибируется, и/или не индуцируется пролиферация или секретирование факторов или осуществление эффекторных функций. Однако в некоторых таких вариантах осуществления, когда лигируется множество рецепторов, например, при встрече клеток, экспрессирующих первый и второй антигены, реализуется желаемый ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, *например*, как показано посредством секретирования одного или нескольких цитокинов, пролиферации, персистенности и/или осуществления иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение целевой клетки.

[0484] В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, дополнительно содержат ингибиторные CAR (iCAR, смотри Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013), такие как CAR, распознающие антиген, иной чем тот, который ассоциируется и/или является специфичным для заболевания или состояния при этом сигнал активации, доставляемый через нацеленный на заболевание CAR, уменьшается или ингибируется посредством связывания ингибиторного CAR с его лигандом, *например*, для уменьшения нецелевых воздействий.

[0485] В некоторых вариантах осуществления, два рецептора индуцируют, соответственно, сигнал активации и ингибирования для клетки, так что связывание одного из рецепторов со своим антигеном активирует Т-клетку или индуцирует ответ, но связывание второго ингибиторного рецептора со своим антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или демпфирует этот ответ. Примеры представляют собой комбинации активирующих CAR и ингибиторных CAR или iCAR. Можно использовать, например, такую стратегию, когда активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который экспрессируется также на нормальных клетках, а ингибиторный рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на клетках заболевания или состояния.

[0486] В некоторых аспектах, химерный рецептор представляет собой или содержит ингибиторный CAR (например, iCAR) и содержит внутриклеточные компоненты, которые демпфируют или подавляют иммунный ответ, такой как ITAM- и/или костимуляторно стимулируемый ответ в клетке. Иллюстрациями таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются те, которые находятся на молекулах иммунных контрольных точек, включая рецепторы PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах, генно-инженерная клетка содержит ингибиторный CAR, содержащий сигнальный домен такой ингибиторной

молекулы или полученный из нее, так что он служит для демпфирования ответа клетки, который индуцируется, например, активирующими и/или костимулирующими CAR.

[0487] В некоторых вариантах осуществления, стратегия мультинацеливания используется в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на непораженной клетке и/или экспрессируется на самой генно-инженерной клетке, либо транзистентно (*например*, при стимуляции в ассоциации с генной инженерией), либо перманентно. В таких случаях, когда требуется лигирование двух отдельных и индивидуальных специфичных рецепторов антигенов, можно улучшить специфичность, селективность и/или эффективность.

[0488] В некоторых вариантах осуществления, множество антигенов, *например*, первый и второй антигены, экспрессируются в клетке, ткани или при заболевании или состоянии, которое лечится, например, на раковой клетке. В некоторых аспектах, клетка, ткань, заболевание или состояние представляет собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из множества антигенов, как правило, также экспрессируются на клетке, на которую нет желания нацеливать клеточную терапию, на такую как нормальная или непораженная клетка или ткань, и/или на самих генно-инженерных клетках. В таких вариантах осуществления, когда требуется лигирование множества рецепторов для реализации ответа клеток, реализуется специфичность и/или эффективность.

#### В. КЛЕТКИ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

[0489] Среди клеток, экспрессирующих рецепторы и вводимых с помощью предлагаемых способов, имеются генно-инженерные клетки. Генная инженерия, как правило, включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или генно-инженерный компонент, в композицию, содержащую клетки, например, с помощью ретровирусного трансдуцирования, трансфицирования или трансформации.

[0490] В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, *то есть*, обычно не присутствуют в клетке или в образце, полученном из клетки, таком как образец, полученный от другого организма или клетки, который, например, обычно не находится в клетке, подвергающейся генной инженерии, и/или в организме, из которого такая клетка получена. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе, включая нуклеиновую кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

[0491] Клетки, как правило, представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и как правило, представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки получают из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, они представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или приобретенного иммунитета, *например*, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, как правило, это Т-клетки и/или НК клетки. Другие

иллюстративные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки, как правило, представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, такие как цельные популяции Т-клеток, клетки CD4<sup>+</sup>, клетки CD8<sup>+</sup> и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом дифференциации, размножением, рециркуляцией, локализацией и/или способностью к персистенции, антиген-специфичностью, типом рецептора антигена, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркером или профилем секретирования цитокинов и/или степенью дифференциации. Относительно субъекта, которого должны лечить, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Способы включают стандартные способы. В некоторых аспектах, например, для стандартных технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток у субъекта, их приготовление, процессинг, культивирование и/или генную инженерию и их повторное введение тому же субъекту, до или после криоконсервирования.

[0492] Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или Т-клеток CD4<sup>+</sup> и/или CD8 имеются наивные Т-клетки (T<sub>N</sub>), эффекторные Т-клетки (T<sub>EFF</sub>), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые клетки памяти Т (T<sub>SCM</sub>), центральные Т-клетки памяти (T<sub>CM</sub>), эффекторные Т-клетки памяти (T<sub>EM</sub>) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксичные Т-клетки, мукоза-ассоциированные инвариантные Т-клетки (MAIT), встречающиеся в природе, и адоптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

[0493] В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой природные клетки киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления, клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, *например*, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

[0494] В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, вводимых с помощью генной инженерии, и тем самым они экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, *то есть*, обычно не присутствуют в клетке или в образце, полученном из клетки, например, они получены из другого организма или клетки, например, обычно не находятся в клетке, подвергающейся генной инженерии, и/или в организме, из которого

получают такую клетку. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, это нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе, включая нуклеиновые кислоты, содержащие химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

[0495] В некоторых вариантах осуществления, приготовление генно-инженерных клеток включает одну или несколько стадий культивирования и/или приготовления. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, можно выделять из образца, такого как биологический образец, *например*, полученный у субъекта или полученный из него. В некоторых вариантах осуществления, субъект, у которого выделяются клетки, представляет собой субъект, имеющий заболевание или состояние, или нуждающийся в клеточной терапии, или которому будет вводиться клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, нуждающегося в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяются, процессируются и/или подвергаются генной инженерии.

[0496] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки, *например*, первичные клетки человека. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате осуществления одной или нескольких стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (*например*, трансдуцирование вирусным вектором), отмывка и/или инкубирование. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который обрабатывается. Биологические образцы включают, но, не ограничиваясь этим, телесные жидкости, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

[0497] В некоторых аспектах, образец, из которого получают или выделяют Т-клетки, представляет собой кровь или образец из крови, или он представляет собой продукт афереза или лейкоафереза, или получен из них. Иллюстративные образцы включают, мононуклеары периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань, ассоциированную с кишками, мукоза-ассоциированную лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкие, желудок, кишечник, толстую кишку, почки, поджелудочную железу, молочную железу, кости, простату, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган, и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, *например*, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

[0498] В некоторых вариантах осуществления, клетки получают из линии клеток, *например*, линии Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки получают от

ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата, не являющегося человеком, и от свиньи.

[0499] В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток содержит одну или несколько стадий приготовления и/или разделения клеток не на основе сродства. В некоторых примерах, клетки отмывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желательными компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяются на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, свойства приклеивания, размер, чувствительность и/или стойкость к конкретным компонентам.

[0500] В некоторых примерах, клетки из кровотока субъекта получают, *например*, посредством афереза или лейкофереза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В клетки, другие ядерные белой крови, эритроцит и/или тромбоциты, а в некоторых аспектах содержат Т-клетки иные, чем эритроциты и тромбоциты.

[0501] В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, отмывают, *например*, для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в соответствующий буфер или среду для следующих далее стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают фосфатным буферным солевым раствором (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствует кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадия отмывки осуществляют в полуавтоматической “проточной” центрифуге (например, в клеточном процессоре Cobe 2991, Baxter) согласно инструкциям производителя. В некоторых аспектах, стадия отмывки осуществляется посредством тангенциальной проточной фильтрации (TFF) согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления, клетки повторно суспендируют в различных биологически совместимых буферах после промывки, таких, например, как PBS, не содержащий  $Ca^{++}/Mg^{++}$ . В определенных вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют и клетки непосредственно повторно суспендируют в культурной среде.

[0502] В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, например, как при приготовлении белых клеток крови из периферической крови посредством лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте Percoll или Ficoll.

[0503] В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессирования или присутствия в клетке одной или нескольких специфичных молекул, таких как поверхностные маркеры, *например*, поверхностные белки, внутриклеточных маркеров или нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеры. В некоторых вариантах осуществления, разделение представляет собой разделение на основе сродства или иммунного сродства. Например, в

некоторых аспектах выделение включает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессирования или уровня экспрессирования клетками одного или нескольких маркеров, как правило, клеточных поверхностных маркеров, например, посредством инкубирования вместе с антителом или партнером по связыванию, который специфично связывается с такими маркерами, как правило, с последующими стадиями промывки и отделения клеток, имеющих связанное антитело или партнер по связыванию, от Т-клеток, не связанных с антителом или партнером по связыванию.

[0504] Такие стадии разделения могут основываться на позитивной селекции, при которой клетки, имеющие связанные реагенты, сохраняются для дальнейшего использования, и/или на негативной селекции, при которой сохраняются клетки, не связанные с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах, обе фракции сохраняются для дальнейшего использования. В некоторых аспектах может быть особенно полезной негативная селекция, где нет доступного антитела, которое специфично идентифицирует тип клеток в гетерологичной популяции, так что разделение лучше всего осуществляется на основе маркеров, экспрессируемых клетками не из желаемой популяции.

[0505] Разделение не должно давать в результате 100% обогащение или удаление конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, позитивная селекция или обогащение клетками конкретного типа, например, экспрессирующих маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не должно приводить в результате к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Подобным же образом, негативная селекция, удаление или обеднение клеток конкретного типа, например, не экспрессирующих маркер, относится к уменьшению количества или процента таких клеток, но не должно давать в результате полное удаление всех таких клеток.

[0506] В некоторых примерах, осуществляют множество заходов стадий разделения, где фракция после позитивной или негативной селекции от одной стадии подвергается воздействию другой стадии разделения, например, следующей позитивной или негативной селекции. В некоторых примерах, одна стадия разделения может вызывать обеднение клетками, экспрессирующими множество маркеров одновременно, например, посредством инкубирования клеток вместе со множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из них является специфичным для маркера целевого для негативной селекции. Подобным же образом, множество типов клеток могут одновременно подвергаться позитивной селекции посредством инкубирования клеток вместе со множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на различных типах клеток.

[0507] Например, в некоторых аспектах, конкретные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, *например*, Т-клетки CD28<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD127<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> и/или CD45RO<sup>+</sup>, выделяют с помощью технологий позитивной или негативной селекции.

[0508] Например, Т-клетки CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> можно выделять с помощью позитивной селекции, используя магнитные шарики, конъюгированные с антителами анти-CD3/анти-CD28 (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

[0509] В некоторых вариантах осуществления, выделение осуществляют посредством обогащения конкретной популяции клеток с помощью позитивной селекции или обеднения конкретной популяции клеток, с помощью негативной селекции. В некоторых вариантах осуществления, позитивная или негативная селекция осуществляется посредством инкубирования клеток вместе с одним или несколькими антителами или с другим связывающим агентом, который специфично связывается с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер<sup>+</sup>) при относительно высоком уровне (маркер<sup>high</sup>) на клетках для позитивной и негативной селекции, соответственно.

[0510] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки выделяют из образца РВМС посредством негативной селекции маркеров, экспрессируемых на клетках иных, чем Т-клетки, таких как В клетки, моноциты или другие белые клетки крови, такие как CD14. В некоторых аспектах, используют стадию селекции CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> для разделения хелперных Т-клеток CD4<sup>+</sup> и цитотоксичных Т-клеток CD8<sup>+</sup>. Такие популяции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> могут дополнительно сортироваться на субпопуляции с помощью позитивной или негативной селекции на маркеры, экспрессируемые или экспрессируемые на относительно более высоком уровне в одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

[0511] В некоторых вариантах осуществления, клетки CD8<sup>+</sup> дополнительно обогащаются или обедняются наивными клетками, центральными клетками памяти, эффекторными клетками памяти и/или центральными стволовыми клетками памяти, например, с помощью позитивной или негативной селекции на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т<sub>CM</sub>) осуществляют для увеличения эффективности, например, для улучшения долговременного выживания, размножения и/или прививаемости после введения, которая в некоторых аспектах является особенно стойкой в таких субпопуляциях. Смотри Terakura *et al.*, *Blood*, 1:72-82 (2012); Wang *et al.*, *J Immunother.* 35(9):689-701 (2012). В некоторых вариантах осуществления, объединение Т<sub>CM</sub>-обогащенных Т-клеток CD8<sup>+</sup> и Т-клеток CD4<sup>+</sup> дополнительно повышает эффективность.

[0512] В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют как в подмножестве CD62L<sup>+</sup>, так и в подмножестве CD62L<sup>-</sup> лимфоцитов CD8<sup>+</sup> периферической крови. РВМС могут обогащаться или обедняться фракциями CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> и/или CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, например, с использованием антител анти-CD8 и анти-CD62L.

[0513] В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т<sub>CM</sub>) основано на позитивном или высоком поверхностном экспрессировании CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, и/или CD 127; в некоторых

аспектах, оно основано на негативной селекции клеток, экспрессирующих или сильно экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение популяции CD8<sup>+</sup>, обогащенной клетками T<sub>CM</sub>, осуществляется посредством обеднения клетками, экспрессирующими CD4, CD14, CD45RA и позитивной селекции или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном из аспектов, обогащение центральными T-клетками памяти (T<sub>CM</sub>) начинается с фракции клеток после отрицательной селекции на основе экспрессирования CD4, которые подвергают негативной селекции на основе экспрессирования CD14 и CD45RA и позитивной селекции на основе CD62L. Такая селекция в некоторых аспектах осуществляется одновременно, а в других аспектах она осуществляется последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах, такая же стадия селекции на основе экспрессирования CD4, как используется при приготовлении популяции или субпопуляции клеток CD8<sup>+</sup>, используется также для генерирования популяции или субпопуляции клеток CD4<sup>+</sup>, так что как положительная, так и отрицательная фракция от разделения на основе CD4 сохраняются и используются на последующих стадиях способов, необязательно, после одной или нескольких дополнительных стадий позитивной или негативной селекции.

[0514] В конкретном пример, образец PBMC или образец других белых клеток крови подвергается селекции клеток CD4<sup>+</sup>, когда сохраняются как негативная, так и позитивная фракции. Затем негативную фракцию подвергают негативной селекции на основе экспрессирования CD14 и CD45RA или CD19 и позитивной селекции на основе характеристик маркеров центральных T-клеток памяти, таких как CD62L или CCR7, когда позитивная и негативная селекции осуществляется в любом порядке.

[0515] Хелперные T-клетки CD4<sup>+</sup> сортируются на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки посредством идентификации популяции клеток, которые имеют T-клеточные поверхностные антигены. Лимфоциты CD4<sup>+</sup> можно получить с помощью стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления, наивные T-лимфоциты CD4<sup>+</sup> представляют собой T-клетки CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления, центральные клетки памяти CD4<sup>+</sup> представляют собой CD62L<sup>+</sup> и CD45RO<sup>+</sup>. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки CD4<sup>+</sup> представляют собой CD62L<sup>-</sup> и CD45RO<sup>-</sup>.

[0516] В одном из примеров, для обогащения клеток CD4<sup>+</sup> посредством негативной селекции, коктейль моноклональных антител, как правило, содержит антитела для CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер по связыванию связан с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитный шарик или парамагнитный шарик, чтобы сделать возможным разделение клеток для позитивной и/или негативной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и популяции клеток разделяют или выделяют с использованием технологий иммуномагнитного (или афинномагнитного) разделения (обзор в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In vitro* и *In vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0517] В некоторых аспектах, образец или композиция клеток, ля разделения инкубируется вместе с мелкодисперсным намагничивающимся или магниточувствительным материалом, такие как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные шарики (*например*, такие как шарики Dynalbeads или MACS). Магниточувствительный материал, *например*, частица, как правило, непосредственно или опосредованно связывается с партнером по связыванию, *например*, антителом, которое специфично связывается с молекулой, *например*, с поверхностным маркером, присутствующем на клетке, клетках или популяциях клеток, которые желают разделить, *например*, для которых желают осуществить негативную или позитивную селекцию.

[0518] В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы или шарики содержат магниточувствительный материал, связанный со специфично связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Имеется множество хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в способах магнитной сепарации. Пригодные для использования магнитные частицы включают те, которые описаны в Molday, в патенте США № 4452773 и в Европейском патенте Specification EP 452342 B, которые тем самым включаются в качестве ссылок. Частицы коллоидных размеров, такие как описано в Owen, в патенте США № 4795698 и Liberti *et al.*, в патенте США № 5200084, представляют собой другие примеры.

[0519] Инкубирование, как правило, осуществляется при условиях, когда антитела или партнеры по связыванию или молекулы, такие как вторичные антитела, или другие реагенты, которые специфично связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или шарiku, специфично связываются с молекулами на поверхности клетки, если они присутствуют на клетках в образце.

[0520] В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле и клетки, имеющие магниточувствительные или намагничивающиеся частицы, прикрепленные к ним, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. Для позитивной селекции, сохраняются клетки, которые притягиваются к магниту; для негативной селекции сохраняются клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах, осуществляют комбинацию позитивной и негативной селекции в ходе одной и той же стадии селекции, когда позитивные и негативные фракции сохраняются и дополнительно обрабатываются или подвергаются дополнительным стадиям разделения.

[0521] В определенных вариантах осуществления, на магниточувствительные частицы наносят первичные антитела или другие партнеры по связыванию, вторичные антитела, лектины, ферменты или стрептавидин. В определенных вариантах осуществления, магнитные частицы прикрепляются к клеткам посредством нанесения на них первичных антител специфичных для одного или нескольких маркеров. В определенных вариантах осуществления, клетки, а не шарики, метятся первичным антителом или партнером по связыванию, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые вторичным антителом специфичным для данного типа клеток или другим

партнером по связыванию (*например*, стрептавидином). В определенных вариантах осуществления, магнитные частицы, покрытые стрептавидином, используют в комбинации с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0522] В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии должны инкубироваться, культивироваться и/или подвергаться генной инженерии; в некоторых аспектах, частицы остаются прикрепленными к клеткам в ходе введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, намагничивающиеся или магниточувствительные частицы удаляются с клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц с клеток известны и включают, *например*, использование конкурентных немеченых антител и намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничивающиеся частицы являются биодegradуемыми.

[0523] В некоторых вариантах осуществления, селекция на основе сродства осуществляется посредством магнитоактивируемого клеточного сортирования (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитоактивируемого клеточного сортирования (MACS) могут осуществлять селекцию клеток высокой чистоты, имеющих намагниченные частицы, прикрепленные к ним. В определенных вариантах осуществления, MACS работает в режиме, где нецелевые и целевые виды последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные виды элюируются. Затем, после завершения этой первой стадии элюирования, виды, которые захвачены в магнитном поле и не могут элюироваться, высвобождаются некоторым образом, так что они могут элюироваться и извлекаться. В определенных вариантах осуществления, нецелевые клетки метятся и обедняются в гетерогенной популяции клеток.

[0524] В определенных вариантах осуществления, выделение или разделение осуществляется с использованием системы, устройства или аппарата, который осуществляет одну или несколько стадий способов выделения, приготовления клеток, разделения, обработки, инкубирования, культивирования и/или процессирования. В некоторых аспектах, система используется для осуществления каждой из этих стадий в замкнутой или стерильной окружающей среде, например, для сведения к минимуму ошибок манипуляций пользователя и/или загрязнения. В одном из примеров, система представляет собой систему, как описано в публикации PCT WO2009/072003 или в US 20110003380 A1.

[0525] В некоторых вариантах осуществления, система или устройство осуществляет одну или несколько, *например*, все стадии выделения, обработки, генной инженерии и приготовления в объединенной или самодостаточной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах, система или устройство содержат компьютер и/или компьютерную программу в сообщении с системой или устройством, которая позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результаты и/или регулировать различные аспекты стадий обработки, выделения, генной инженерии и приготовления.

[0526] В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии осуществляются с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматизированного разделения клеток на уровне клинического масштаба в замкнутой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, узел магнитной сепарации, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер в некоторых аспектах контролирует все компоненты инструмента и направляет систему для осуществления повторяющихся процедур в стандартной последовательности. Узел магнитной сепарации в некоторых аспектах содержит подвижный постоянный электромагнит и держатель колонки для селекции. Перистальтический насос контролирует скорость потока через набор трубок и вместе с пережимными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывное суспендирование клеток.

[0527] Система CliniMACS в некоторых аспектах использует связанные с антителом намагничивающиеся частицы, которые поставляются в стерильном, не содержащем пирогенов растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами, клетки промывают для удаления избытка частиц. Затем мешок для приготовления клеток соединяют с набором трубок, который, в свою очередь, соединяют с мешком, содержащим буфер, и мешком для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая колонку предварительного разделения и разделительную колонку, и они предназначены только для одного использования. После инициирования программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки удерживаются в колонке, в то время как немеченые клетки удаляются с помощью ряда стадий промывки. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования вместе с способами, описанными в настоящем документе, являются немечеными и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования вместе со способами, описанными в настоящем документе, метятся и удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования вместе со способами, описанными в настоящем документе, элюируются из колонки после удаления магнитного поля и собираются в мешке для сбора клеток.

[0528] В определенных вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах снабжена установкой обработки клеток, которая дает возможность для автоматической промывки и фракционирования клеток посредством центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток, различая макроскопические слои исходного продукта клеток. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на эритроциты, белые клетки и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy может также включать встроенную камеру для культивирования клеток, которая осуществляет протоколы культивирования клеток, такие, *например*, как дифференциация и размножение

клеток, загрузку антигена и долговременное культивирование клеток. Входные узлы могут давать возможность для стерильного удаления и восполнения среды и клетки можно отслеживать с использованием встроенного микроскопа. Смотри, *например*, Klebanoff *et al.*, *J Immunother.* 35(9): 651-660 (2012), Terakura *et al.*, *Blood*, 1:72-82 (2012) и Wang *et al.*, *J Immunother.* 35(9):689-701 (2012).

[0529] В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток, описанная в настоящем документе, собирается и обогащается (или обедняется) с помощью проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные на множества клеточных поверхностных маркеров, переносятся в потоке текучей среды. В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток, описанная в настоящем документе, собирается и обогащается (или обедняется) посредством препаративного (FACS)-сортирования. В определенных вариантах осуществления, популяция клеток, описанная в настоящем документе, собирается и обогащается (или обедняется) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой детектирования на основе FACS (смотри, *например*, WO 2010/033140, Cho *et al.*, *Lab Chip* 10, 1567-1573 (2010); и Godin *et al.*, *J Biophoton.* 1(5):355-376 (2008). В обоих случаях, клетки могут метиться множеством маркеров, что делает возможным выделение хорошо определенных подмножеств Т-клеток с высокой чистотой.

[0530] В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию метятся одним или несколькими детектируемыми маркерами, для облегчения разделения с целью позитивной и/или негативной селекции. Например, разделение может основываться на связывании флуоресцентно меченых антител. В некоторых примерах, разделение клеток основывается на связывании антител или других партнеров по связыванию специфичных для одного или нескольких маркеров на поверхности клеток, которые переносятся в потоке текучей среды, например, с помощью флуоресцентно активируемого клеточного сортирования (FACS), включая препаративный (FACS) и/или чипов микроэлектромеханических систем (MEMS), *например*, в комбинации с системой детектирования проточной цитометрии. Такие способы дают возможность для позитивной и негативной селекции на основе множества маркеров одновременно.

[0531] В некоторых вариантах осуществления, способы приготовления включают стадии заморозки, *например*, криоконсервирования клеток, либо до, либо после выделения, инкубирования и/или генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления, стадия заморозки и последующего оттаивания удаляет из популяции клеток гранулоциты и, до некоторой степени, моноциты. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в растворе для заморозки, *например*, после стадии промывки, для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах можно использовать любой из различных известных растворов и параметров для заморозки. Один из примеров включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или другой пригодной для использования среды для заморозки клеток. Затем ее разбавляют средой 1:1, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%,

соответственно. Клетки, как правило, затем замораживают до  $-80^{\circ}\text{C}$ , при скорости  $1^{\circ}$  в минуту и хранят в паровой фазе танка для хранения с жидким азотом.

[0532] В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируются и/или культивируются до или в ходе генной инженерии. Стадии инкубирования могут включать приготовление культуры, культивирование, стимуляцию, активацию и/или репродукцию. Инкубирование и/или генная инженерия могут осуществляться в емкости с культурой, например, в установке, камере, лунке, колонке, пробирке, наборе трубок, клапане, флаконе, чашке для культур, мешке или в другом контейнере для получения культуры или для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируются в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования, пролиферации, размножения, активации и/или выживаемости клеток в популяции, чтобы воспроизвести экспонирование для антигена и/или для примирования клеток для генной инженерии, например, для введения рекомбинантного рецептора антигена.

[0533] Такие условия могут включать одну или несколько конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание диоксида углерода, время, агенты, *например*, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, белки слияния, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для активации клеток.

[0534] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или агенты включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах, агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в T-клетке. Такие агенты могут включать антитела, например, специфичные для TCR, например, для анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например, анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, такие агенты и/или лиганды могут связываться с твердой подложкой, такой как шарик, и/или с одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления антитела анти-CD3 и/или анти-CD28 в среду для культуры (например, при концентрации, по меньшей мере, примерно  $0,5$  нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие агенты включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах, IL-2 концентрация составляет, по меньшей мере, примерно  $10$  единиц/мл.

[0535] В некоторых аспектах, инкубирование осуществляется в соответствии с такими технологиями, как описано в патенте США № 6040177 to Riddell *et al.*, Klebanoff *et al.*, *J Immunother.* 35(9): 651-660 (2012), Terakura *et al.*, *Blood*, 1:72-82 (2012) и/или Wang *et al.*, *J Immunother.* 35(9):689-701 (2012).

[0536] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножаются посредством добавления в композицию, иницирующую культивирование клеток-фидеров, таких как не делящиеся мононуклеары периферической крови (РВМС), (*например*, так что полученная в результате популяция клеток содержит, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или более клеток-фидеров РВМС на каждый Т-лимфоцит в начальной популяции, которая должна размножаться); и инкубирования культуры (*например*, в течение времени достаточного для умножения количеств Т-клеток). В некоторых аспектах, не делящиеся клетки-фидеры могут включать гамма-облученные клетки-фидеры РВМС. В некоторых вариантах осуществления, РВМС облучают гамма-излучением в диапазоне примерно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, клетки-фидеры добавляют в среду для культуры перед добавлением популяций Т-клеток.

[0537] В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру пригодную для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере, примерно 30 градусов и, как правило, 37 градусов Цельсия или около того. Необязательно, инкубирование может дополнительно включать добавление не делящихся EBV-трансформированных лимфобластных клеток (LCL) как клеток-фидеров. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне примерно от 6000 до 10000 рад. В некоторых аспектах клетки-фидеры LCL предоставляются в любом пригодном для использования количестве, например, при отношении клеток-фидеров LCL к начальным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, примерно 10:1.

[0538] В вариантах осуществления, антиген-специфичные Т-клетки, такие как антиген-специфичные Т-клетки CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup>, получают посредством стимуляции наивных или антиген-специфичных Т-лимфоцитов антигеном. Например, линии или клоны антиген-специфичных Т-клеток можно генерировать для антигенов цитомегаловируса посредством выделения Т-клетки у инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* этим же антигеном.

### С. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

[0539] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, Т-клетки, получают с помощью генной инженерии для экспрессирования рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, генная инженерия осуществляется посредством введения молекул нуклеиновой кислоты, которая кодирует рекомбинантный рецептор. Также предлагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или молекулы нуклеиновой кислоты.

[0540] В некоторых случаях, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR), содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, полученный из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность

может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления, сигнальный пептид получают из трансмембранного белка. В некоторых примерах сигнальный пептид получают из CD8a, CD33 или IgG. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид CD33, приведенный в SEQ ID NO:21, сигнальный пептид CD8a, приведенный в SEQ ID NO:75, или сигнальный пептид, приведенный в SEQ ID NO:76, или их модифицированный вариант.

[0541] В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит, по меньшей мере, один промотор, который функционально связан для контроля экспрессирования рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах, молекула нуклеиновой кислоты содержит два, три или более промоторов, функционально связанных для контроля экспрессирования рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициирования и завершения транскрипции и трансляции, которые являются специфичными к типу хозяина (например, бактерия, грибок, растение или животное), которому должна вводиться молекула нуклеиновой кислоты, при необходимости и с учетом того основана ли молекула нуклеиновой кислоты на ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать регуляторные/контрольные элементы, такие как промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусная последовательность Kozak и акцептор или донор сплайсирования. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать ненативный промотор, функционально связанный с последовательностью нуклеотидов, кодирующей рекомбинантный рецептор и/или один или несколько дополнительных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, промотор выбран из промотора РНК pol I, pol II или pol III. В некоторых вариантах осуществления, промотор распознается полимеразой II РНК (например, CMV, ранняя область SV40 или главный поздний промотор аденовируса). В другом варианте осуществления, промотор распознается полимеразой III РНК (например, промотор U6 или H1). В некоторых вариантах осуществления, промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, находящийся в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мышинных. Другие известные промоторы также рассматриваются.

[0542] В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой или содержит конститутивный промотор. Иллюстративные конститутивные промоторы включают, например, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), опосредованный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С (UBC) человека, промотор фактора 1 $\alpha$  элонгации человека (EF1 $\alpha$ ), промотор фосфоглицераткиназы 1 мышцы (PGK) и промотор  $\beta$ -актина кур, связанный с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых вариантах осуществления, конститутивный промотор представляет собой синтетический

или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой или содержит промотор MND, синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного MoMuLV LTR с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (смотри Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой тканеспецифичный промотор. В другом варианте осуществления, промотор представляет собой вирусный промотор. В другом варианте осуществления, промотор представляет собой невирусный промотор.

[0543] В другом варианте осуществления, промотор представляет собой регулируемый промотор (например, индуцируемый промотор). В некоторых вариантах осуществления, промотор представляет собой индуцируемый промотор или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления, промотор содержит операторную последовательность Lac, операторную последовательность тетрациклина, операторную последовательность галактозы или операторную последовательность доксициклина или представляет собой их аналог или может связываться или распознаваться репрессором Lac или репрессором тетрациклина или их аналогом. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты не содержит регуляторного элемента, например, промотора.

[0544] В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, CAR или другой рецептор антигена, дополнительно включает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие маркер и/или клетки, экспрессирующие CAR, или другой рецептор антигена дополнительно включает маркер, например, суррогатный маркер, такой как маркер на поверхности клетки, который можно использовать для подтверждения трансдуцирования или генной инженерии клетки для экспрессирования рецептора, такого как усеченная версия рецептора на поверхности клетки, такого как усеченный EGFR (tEGFR). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько маркеров представляют собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер селекции.

[0545] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для детектирования клеток, которым введена молекула нуклеиновой кислоты, например, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, маркер трансдукции может показывать или подтверждать модифицирование клетки. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер представляет собой белок, который получен для совместного экспрессирования на поверхности клетки вместе с рекомбинантным рецептором, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления, такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который модифицируется так, чтобы он имел малую активность или не имел ее. В определенных вариантах осуществления, суррогатный маркер кодируется той же молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует рекомбинантный

рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей маркер, необязательно, отделенный внутренним участком посадки рибосомы (IRES), или с нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает рибосомальный проскок, такой как последовательность 2A, такую как T2A, P2A, E2A или F2A. Несобственные гены маркера могут в некоторых случаях использоваться в связи с генно-инженерной клеткой чтобы сделать возможным детектирование или селекцию клеток, а в некоторых случаях, также способствовать суициду клеток.

[0546] Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать усеченные формы полипептидов на поверхности клеток, такие как усеченные формы, которые не функциональны и не трансдуцируют или неспособны трансдуцировать сигнал или сигнал, обычно трансдуцируемый полноразмерной формой полипептида на поверхности клетки, и/или не осуществляют или не способны осуществлять интернализацию. Иллюстративные усеченные полипептиды на поверхности клетки включают усеченные формы факторов роста или других рецепторов, таких как усеченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, иллюстративная tEGFR последовательность приведена в SEQ ID NO:11 или 76) или простато-специфичный мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Erbix®) или другим терапевтическим антителом анти-EGFR или связывающей молекулой, что можно использовать для идентификации или селекции клеток, которые получают с помощью генной инженерии с помощью конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для устранения или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. Смотри патент США № 8802374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, *например*, суррогатный маркер, включает весь CD34, NGFR, CD19 или усеченное CD19, например, усеченное CD19 не от человека или рецептор эпидермального фактора роста (*например*, tEGFR) или их часть (*например*, усеченную форму). В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), например, суперскладчатый GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, бирюзовый флуоресцентный белок (CFP), зелено-голубой флуоресцентный белок (BFP), усиленный голубой флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая варианты видов, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или усиленные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген lacZ *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлоромидетин ацетилтрансфераза (CAT). Иллюстративные

испускающие свет репортерные гены включают люциферазу (luc),  $\beta$ -галактозидазу, хлоромицетинацетилтрансферазу (CAT),  $\beta$ -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0547] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, который придает стойкость экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген стойкости к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген стойкости к антибиотикам, который придает стойкость к антибиотикам клетке млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит ген стойкости к пуромицину, ген стойкости к гигромицину, ген стойкости к бластицидину, ген стойкости к неомицину, ген стойкости к генетицину или ген стойкости к зеоцину или их модифицированную форму.

[0548] В некоторых аспектах, маркер, *например*, суррогатный маркер, включает весь CD34, NGFR или рецептор эпидермального фактора роста (*например*, tEGFR) или их часть (*например*, усеченную форму). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, *например*, T2A. Например, маркер, а необязательно, и линкерная последовательность, могут представлять собой любую последовательность как описано в публикации PCT № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR) который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Иллюстративный полипептид для усеченного EGFR (*например*, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 7 или 28, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 7 или 28. Иллюстративная линкерная последовательность T2A содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 6.

[0549] В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие конструкции CAR дополнительно содержат последовательность, кодирующую элемент проскока рибосомы T2A, и/или последовательность tEGFR, *например*, после последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует элемент проскока рибосомы T2A, приведенный в SEQ ID NO: 6, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления, T-клетки, экспрессирующие рецептор антигена (*например*, CAR), могут также генерироваться для экспрессирования усеченного EGFR

(EGFRt) как неиммуногенного эпитопа селекции (*например*, посредством введения конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные рибосомальным переключателем T2A, для экспрессирования двух белков одной и той же конструкции), который затем можно использовать как маркер для детектирования таких клеток (смотри, *например*, патент США № 8802374). В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует последовательность tEGFR, приведенную в SEQ ID NO: 7 или 28, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 7 или 28.

[0550] В некоторых вариантах осуществления, один промотор может направлять экспрессирование РНК, которая содержит в одной открытой рамке считывания (ORF) два или три гена (*например*, кодирует молекулу, вовлеченную в модулирование метаболического пути, и кодирует рекомбинантный рецептор), отделенных друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (*например*, последовательности 2A) или сайт распознавания протеазы (*например*, фурин). Таким образом ORF кодирует один полипептид, который либо в ходе трансляции (в случае 2A) либо после нее процессируется в индивидуальные белки. В некоторых случаях, пептид, такой как T2A, может заставлять рибосому проскакать (способствовать рибосомальному проскоку) синтез пептидной связи на С-окончании элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим пептидом после нее (смотри, *например*, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и deFelipe *et al. Traffic* 5:616-626 (2004)). Многие элементы 2A известны в данной области. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в способах и нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем документе, представляют собой, без ограничения, последовательности 2A вируса ящура (F2A, *например*, SEQ ID NO: 27), вируса ринита лошадей А (E2A, *например*, SEQ ID NO: 26), вируса *Thosea asigna* (T2A, *например*, SEQ ID NO: 6 или 23) и тешовируса-1 свиней (P2A, *например*, SEQ ID NO: 24 или 25), как описано в публикации патента США № 20070116690.

[0551] В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой молекулу, *например*, белок на поверхности клетки, не встречающийся в природе на Т-клетках, или не находящийся в природе на поверхности Т-клеток, или его часть. В некоторых вариантах осуществления, молекула представляет собой чужую молекулу, *например*, чужой белок, *то есть*, белок, который не распознается как “свой” иммунной системой хозяина, которому будут адоптивно переноситься клетки.

[0552] В некоторых вариантах осуществления, маркер не служит для терапевтической функции и/или не оказывает воздействия иного, чем использование как маркер для генной инженерии, *например*, для селекции клеток после успешной генной инженерии. В других вариантах осуществления, маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, оказывающую иным образом желаемое воздействие, такую как лиганд для клетки, которая должна встретиться с ним *in vivo*, такой

как костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки, для усиления и/или демпфирования ответов клеток при адаптивном переносе и встрече с лигандом.

[0553] Введение молекул нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор в клетке, может осуществляться с использованием любого количества известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе, с помощью вирусных, *например*, ретровирусных или лентивирусных векторов, трансдуцирования, транспозонов и электропорообразования.

[0554] В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляется посредством сначала стимуляции клетки, например, посредством объединения ее со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживаемость и/или активация, например, как измерено по экспрессированию цитокина или маркера активации, после трансдукции активированных клеток и размножения в культуре до количеств, достаточных для клинических применений.

[0555] В некоторых вариантах осуществления, до переноса гена или в ходе него, клетки инкубируют или культивируют в присутствии иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, включая любые соединения, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2 добавляют в ходе процесса получения клеток, например, в ходе процесса генной инженерии CAR Т-клеток. В некоторых аспектах, присутствие иммуномодулирующего соединения может улучшить качество популяции получаемых клеток. В некоторых аспектах, иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, может повысить пролиферацию или размножение клеток или может изменить один или несколько путей передачи сигналов, давая в результате клетки с менее дифференцированным или менее активированным фенотипом поверхности, тем не менее, демонстрирующие достаточное размножение и/или эффекторную функцию.

[0556] В некоторых контекстах, сверхэкспрессирование стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может быть токсичным для субъекта. Таким образом, в некоторых контекстах, генно-инженерные клетки содержат сегменты генов, которые заставляют Т-клетки быть чувствительными к негативной селекции *in vivo*, например, при введении при адаптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах, клетки получают с помощью генной инженерии так, что их можно устранить *in vivo* как результат изменения состояния пациента, которому они вводятся. Негативно селективируемый фенотип может получаться в результате инсерции гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, соединению. Негативно селективируемые гены включают ген тимидинкиназы типа I вируса простого герпеса (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 2:223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной

гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT), бактериальной цитозиндеаминазы, (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

[0557] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием частиц рекомбинантных инфекционных вирусов, таких, например, как векторы, полученные из вируса 40 обезьян (SV40), аденовирусов, аденосателлитного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, такие как гамма-ретровирусные векторы (смотри, например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557.

[0558] В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет последовательность длинных концевых повторов (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинового лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мышины (MESV), вируса стволовых клеток мышинных (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV) или аденосателлитного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов получают из ретровирусов мышинных. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают ретровирусы, полученные из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы как правило, являются амфотропными, это означает, что они могут инфицировать клетки хозяев нескольких видов, включая людей. В одном из вариантов осуществления, ген, который должен экспрессироваться, заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, в патентах США №№ 5219740; 6207453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

[0559] Способы лентивирусного трансдуцирования известны. Иллюстративные способы описаны, например, в Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

[0560] В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки посредством электропорообразования (смотри, например, Chicaibam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносятся в Т-клетки посредством транспозиции (смотри, например, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессирования

генетического материала в иммунных клетках включают кальций-фосфатное трансфицирование (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, катионное липосома-медируемое трансфицирование; бомбардировку вольфрамовыми микрочастицами (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)) и стронций-фосфатную совместную преципитацию ДНК (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[0561] Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, представляют собой те, которые, описаны, например, в Международной заявке на патент, публикация №: WO2014055668 и в патенте США № 7446190.

[0562] В некоторых вариантах осуществления, клетки, например, Т-клетки, могут трансфицироваться либо в ходе размножения, либо после него, например, рецептором Т-клеток (TCR) или химерным рецептором антигена (CAR). Это трансфицирование для введения гена желаемого рецептора может осуществляться, например, с помощью любого соответствующего ретровирусного вектора. Затем популяция генетически модифицированных клеток может освобождаться от начального стимула (например, стимула CD3/CD28), а затем стимулироваться вторым типом стимула, например, с помощью вводимого *de novo* рецептора). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/МНС, канатного (поперечно сшивающего) лиганда генетически вводимого рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в рамке нового рецептора (например, распознавая константные области в рецепторе). Смотри, например, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)*.

[0563] В некоторых случаях, можно использовать вектор, который не требует, чтобы клетки, *например*, Т-клетки, активировались. В нескольких таких случаях, клетки могут выбираться и/или трансдуцироваться до активации. Таким образом, клетки могут быть получены с помощью генной инженерии до или после культивирования клеток, а в некоторых случаях, одновременно с культивированием или в течение, по меньшей мере, его части.

[0564] В некоторых аспектах, клетки дополнительно подвергают генной инженерии для усиления экспрессирования цитокинов или других факторов. Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов, для введения имеются молекулы с целью улучшения эффективности терапии, например, усиливая жизнеспособность и/или функции переносимых клеток; гены для обеспечения генетического маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки *in vivo* выживаемости или локализации; гены для улучшения безопасности, например, делая клетки чувствительными к негативной селекции *in vivo*, как описано Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); смотри также публикации PCT/US91/08442 и

PCT/US94/05601, Lupton et al., описывающие использование бифункциональных селективируемых генов слияния, полученных от слияния доминантного положительного селективируемого маркера с негативным селективируемым маркером. *Смотри*, например, Riddell et al., патент США № 6040177, columns 14-17.

### III. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ОЦЕНКИ

[0565] В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений, предлагаемых в настоящем документе, предлагаемая комбинированная терапия дает в результате один или несколько результатов лечения, таких как признак, ассоциированный с одним или несколькими из параметров, ассоциируемых с терапией или лечением, как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления, способ включает оценку экспонирования, персистенности и пролиферации Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, экспонирование или пролонгированное размножение и/или персистенность клеток и/или изменения фенотипов клеток или функциональной активности клеток, *например*, клеток, вводимых для иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, в способах, предлагаемых в настоящем документе, можно измерить, оценивая характеристики Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления, такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, *например*, Т-клеточной терапии, до или после введения комбинированной терапии, предлагаемой в настоящем документе.

[0566] В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия может дополнительно включать одну или несколько стадий скрининга для идентификации субъектов для лечения с помощью комбинированной терапии и/или для продолжения комбинированной терапии, и/или стадию оценки результатов лечения и/или отслеживания результатов лечения. В некоторых вариантах осуществления, стадия оценки результатов лечения может включать стадии оценки и/или отслеживания лечения и/или для идентификации субъектов для введения дополнительных или оставшихся стадий терапии и/или для повторной терапии. В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценки результатов лечения может использоваться для определения дозы, частоты, продолжительности, временного графика и/или порядка комбинированной терапии, предлагаемой в настоящем документе.

[0567] В некоторых вариантах осуществления, любые из стадий скрининга и/или оценка результатов лечения, описанных в настоящем документе, можно использовать до, в ходе, в ходе курса или после введения одной или нескольких стадий предлагаемой комбинированной терапии, *например*, введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток) и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида или Соединения 1. В некоторых вариантах осуществления, оценку осуществляют до, в ходе, в ходе курса или после осуществления любого из способов, предлагаемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, оценку осуществляют до осуществления способов, предлагаемых в настоящем документе. В

некоторых вариантах осуществления, оценку осуществляют после осуществления одной или нескольких стадий способов, предлагаемых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, оценку осуществляют до введения одной или нескольких стадий предлагаемой комбинированной терапии, например, для скрининга и идентификации пациентов пригодных для приема комбинированной терапии и/или чувствительных к ней. В некоторых вариантах осуществления, оценку осуществляют в ходе, в ходе курса или после введения одной или нескольких стадий предлагаемой комбинированной терапии, например, для оценки промежуточных или конечных результатов лечения, *например*, для определения эффективности лечения и/или для определения того, продолжать ли или повторять ли лечение и/или для определения того, вводить ли оставшиеся стадии комбинированной терапии.

[0568] В некоторых вариантах осуществления, результаты лечения включают улучшение иммунной функции, *например*, иммунной функции Т-клеток, вводимых для терапии на основе клеток и/или эндогенных Т-клеток в организме. В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные результаты лечения включают, но, не ограничиваясь этим, усиление пролиферации Т-клеток, усиление функциональной активности Т-клеток, изменения экспрессирования фенотипических маркеров иммунных клеток, таких как признаки, ассоциированные с генно-инженерными Т-клетками, например, CAR Т-клетками, вводимыми субъекту. В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные результаты лечения включают уменьшение тяжести заболевания, *например*, опухолевой нагрузки, улучшение клинических результатов и/или повышение эффективности терапии.

[0569] В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценки результатов лечения включает оценку выживаемости и/или функции Т-клеток, вводимых для терапии на основе клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценки результатов лечения включает оценку уровней цитокинов или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценки результатов лечения включает оценку тяжести заболевания и/или улучшения, *например*, оценку опухолевой нагрузки и/или клинических результатов. В некоторых вариантах осуществления, стадия либо скрининга и/либо оценки результатов лечения может включать любой из способов оценки и/или анализов, описанных в настоящем документе, и/или известных в данной области, и может осуществляться один или несколько раз, *например*, до, в ходе, в ходе курса или после введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Иллюстративные наборы параметров, ассоциированных с результатами лечения, которые могут оцениваться в некоторых вариантах осуществления способов, предлагаемых в настоящем документе, включают профиль популяции иммунных клеток периферической крови и/или опухолевую нагрузку.

[0570] В некоторых вариантах осуществления, способы влияют на эффективность клеточной терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, персистенция, размножение и/или присутствие экспрессирующих рекомбинантный рецептор, *например*, CAR-экспрессирующих клеток, у субъекта после введения дозы клеток в способе с

использованием иммуномодулирующего соединения больше, по сравнению с тем, что реализуется в способе без введения иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления способов иммунотерапии, предлагаемых в настоящем документе, таких как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки), оценка параметров включает оценку размножения и/или персистенции вводимых Т-клеток для иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, у субъекта, по сравнению со способом, в котором иммунотерапию вводят субъекту в отсутствие иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления, способы дают в результате вводимые Т-клетки, демонстрирующие повышенное или пролонгированное размножение и/или персистенность у субъекта, по сравнению со способом, в котором Т-клеточную терапию вводят субъекту в отсутствие иммуномодулирующего соединения.

[0571] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, уменьшает тяжесть заболевания, *например*, опухолевую нагрузку, у субъекта, по сравнению со способом, в котором доза клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводится субъекту в отсутствие иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, уменьшает количество бластных клеток костного мозга у субъекта, по сравнению со способом, в котором доза клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводится субъекту в отсутствие иммуномодулирующего соединения. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, дает в результате улучшение клинических результатов, *например*, объективной доли ответов (ORR), выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS) и общей выживаемости (OS), по сравнению со способом, в котором доза клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводится субъекту в отсутствие иммуномодулирующего соединения.

[0572] В некоторых вариантах осуществления, может осуществляться скрининг субъекта перед введением одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Например, может осуществляться скрининг субъекта на характеристики заболевания и/или тяжести заболевания, *например*, опухолевой нагрузки, перед введением комбинированной терапии, для определения пригодности, чувствительности и/или восприимчивости при введении комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценки результатов лечения может использоваться для определения дозы, частоты, продолжительности, временного графика и/или порядка комбинированной терапии, предлагаемой в настоящем документе.

[0573] В некоторых вариантах осуществления, может осуществляться скрининг субъекта после введения одной из стадий комбинированной терапии, для определения и идентификации субъектов для приема оставшихся стадий комбинированной терапии и/или для мониторинга эффективности терапии. В некоторых вариантах осуществления, число, уровень или количество введенных Т-клеток и/или пролиферация и/или активности

введенных Т-клеток оценивается перед введением и/или после введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.*

[0574] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2,* вводится, пока концентрация или количество генно-инженерных клеток в крови субъекта не составит (i) по меньшей мере, или примерно 10 генно-инженерных клеток на микролитр, (ii) по меньшей мере, 20%, 30%, 40% или 50% от общего количества мононуклеаров периферической крови (РВМС), (iii) не составит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  генно-инженерных клеток; или (iv) по меньшей мере, 5000 копий ДНК, кодирующей рекомбинантный рецептор, на микрограмм ДНК; и/или в день 90 после начала введения в (а), CAR-экспрессирующие клетки детектируются в крови или сыворотке субъекта; и/или в день 90 после начала введения в (а), кровь субъекта содержит, по меньшей мере, 20% CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, 10 CAR-экспрессирующих клеток на микролитр или, по меньшей мере,  $1 \times 10^4$  CAR-экспрессирующих клеток.

[0575] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующее соединение, *например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2,* вводится до тех пор, пока имеется клинический выигрыш от лечения, например, по меньшей мере 50% или большее уменьшение общего объема опухоли или полный ответ (CR), при котором детектируемая опухоль исчезает, выживаемость без прогрессирования или выживаемость без заболевания не станет больше 6 месяцев или больше 1 года или более.

[0576] В некоторых вариантах осуществления, определяется или оценивается изменение и/или альтернатива, *например, увеличение, подъем, уменьшение или сокращение уровней, значений или измерений параметра или результата, по сравнению с уровнями, значениями или измерениями этого же параметра или результата в другой временной точке оценки, при других условиях, в другой референтной точке и/или у другого субъекта.* Например, в некоторых вариантах осуществления, может определяться кратное изменение, *например, увеличение или уменьшение конкретных параметров, например, количества генно-инженерных Т-клеток в образце, по сравнению с таким же параметром при других условиях, например, до или после введения иммуномодулирующего соединения, например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.* В некоторых вариантах осуществления, определяются уровни, значения или измерения двух или более параметров и сравниваются относительные уровни. В некоторых вариантах осуществления, определенные уровни, значения или измерения параметров сравниваются с уровнями, значениями или измерениями от контрольного образца или образца без лечения. В некоторых вариантах осуществления, определенные уровни, значения или измерения параметров сравнивают с уровнями от образца от того же субъекта, но в другой временной точке. Значения, полученные при количественном определении индивидуального параметра, могут объединяться для целей оценки заболевания, *например, посредством осуществления арифметической или логической операции над уровнями, значениями или измерениями*

параметров с использованием мультипараметрического анализа. В некоторых вариантах осуществления, может вычисляться отношение двух или более конкретных параметров.

#### А. ЭКСПОНИРОВАНИЕ, ПЕРСИСТЕНТНОСТЬ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ Т-КЛЕТОК

[0577] В некоторых вариантах осуществления, параметр, ассоциируемый с терапией или результатом лечения, который включает параметры, которые могут оцениваться для стадии скрининга и/или оценки результатов лечения и/или мониторинга результатов лечения, представляет собой или включает оценку экспонирования, персистенности и пролиферации Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, увеличенное экспонирование или пролонгированное размножение и/или персистенность клеток, и/или изменения фенотипов клеток или функциональной активности клеток, *например*, клеток, вводимых для иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, в способах, предлагаемых в настоящем документе, можно измерить посредством оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления, такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, используемых для иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, до или после введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии, предлагаемых в настоящем документе.

[0578] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, предназначается для облегчения экспонирования субъекта для клеток, *например*, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток, например, посредством усиления их размножения и/или персистенности со временем. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия демонстрирует увеличение или пролонгирование размножения и/или персистенности у субъекта, по сравнению со способом, при котором Т-клеточная терапия вводится субъекту в отсутствие иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

[0579] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы увеличивают экспонирование субъекта для введенных клеток (*например*, увеличивают количество клеток или продолжительность во времени) и/или улучшают эффективность и терапевтические результаты иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии. В некоторых аспектах, способы являются преимущественными в том, что более высокая и/или продолжительная степень экспонирования для клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, *например*, для CAR-экспрессирующих клеток, улучшает результаты лечения по сравнению с другими способами. Такие результаты могут включать выживание и ремиссию пациента, даже у индивидуумов с тяжелыми опухолевыми нагрузками.

[0580] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, может увеличить максимальное, общее экспонирование для клеток, *например*, для Т-клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток, и/или его продолжительность, у субъекта, по сравнению с введением одних Т-клеток в отсутствие иммуномодулирующего соединения. В некоторых

аспектах, введение иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, в контексте высокой тяжести заболевания (и таким образом, более высоких количеств антигена) и/или более агрессивного или резистентного рака повышает эффективность по сравнению с введением только Т-клеток в отсутствие иммуномодулирующего соединения в этом же контексте, что может давать в результате иммуносупрессию, анэргию и/или истощение, которое может предотвратить размножение и/или персистенцию клеток.

[0581] В некоторых вариантах осуществления, детектируется присутствие и/или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например, CAR-экспрессирующих клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток*) у субъекта после введения Т-клеток и до, в ходе и/или после введения иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*. В некоторых аспектах, количественная PCR (qPCR) используется для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например, CAR-экспрессирующих клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток*) в образце крови или сыворотке или органе или ткани (*например, в области заболевания, например, образце опухоли*) у субъекта. В некоторых аспектах, персистенция количественно определяют как копии ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, *например, CAR*, на микрограмм ДНК, или как количество экспрессирующих рецептор, *например, CAR-экспрессирующих, клеток* на микролитр образца, *например, крови или сыворотки*, или на общее количество мононуклеаров периферической крови (PBMC) или белых клеток крови или Т-клеток на микролитр образца.

[0582] В некоторых вариантах осуществления, клетки детектируются у субъекта через или, по меньшей мере, через 4, 14, 15, 27 или 28 дней после введения Т-клеток, *например, CAR-экспрессирующих Т-клеток*. В некоторых аспектах, клетки детектируются через или, по меньшей мере, через 2, 4 или 6 недель после или 3, 6 или 12, 18 или 24 или 30 или 36 месяцев или 1, 2, 3, 4, 5 или более лет, после введения Т-клеток, *например, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или иммуномодулирующего соединения, например, леналидомида или Соединения 1*.

[0583] В некоторых вариантах осуществления, персистенция клеток, экспрессирующих рецептор (*например, CAR-экспрессирующих клеток*), у субъекта согласно способам, после введения Т-клеток, *например, CAR-экспрессирующих Т-клеток*, и/или иммуномодулирующего соединения, *например, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2*, больше по сравнению с тем, что было бы достигнуто с помощью альтернативных способов, таких как способы, включающие введение только иммунотерапии, *например, введение Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, в отсутствие иммуномодулирующего соединения*.

[0584] Экспонирование, *например, количества клеток, например, Т-клеток, введенных для Т-клеточной терапии*, как показатель размножения и/или персистенции, может формулироваться в терминах максимального количества клеток, для которых

экспонируется субъект, продолжительности существования детектируемых клеток или клеток выше определенного количества или процента, площади под кривой для количества клеток в зависимости от времени и/или их комбинаций и их показателей. Такие результаты можно оценивать с использованием известных способов, таких как qPCR, для детектирования количества копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, по сравнению с общим количеством нуклеиновой кислоты или ДНК в конкретном образце, *например*, крови, сыворотки, плазмы или тканей, *например*, в образце опухоли, и/или посредством анализа с помощью проточной цитометрии, детектирующей клетки, экспрессирующие рецептор, как правило, с использованием антител специфичных к рецепторам. Анализ на основе клеток можно также использовать для детектирования количества или процента функциональных клеток, таких как клетки способные связывать и/или нейтрализовать и/или вызывать ответы, *например*, цитотоксические ответы, против клетки заболевания или состояния или экспрессировать антиген, распознаваемый рецептором.

[0585] В некоторых аспектах, увеличение экспонирования субъекта для клеток содержит увеличение размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рецептор, *например*, CAR-экспрессирующие клетки, размножаются у субъекта после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. В некоторых аспектах, способы дают в результате увеличение размножения клеток по сравнению с другими способами, *например*, включающими введение Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток, в отсутствие введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

[0586] В некоторых аспектах, способ дает в результате высокую пролиферацию *in vivo* введенных клеток, *например*, как измерено с помощью проточной цитометрии. В некоторых аспектах, детектируются высокие пиковые доли клеток. *Например*, в некоторых вариантах осуществления, пиковый или максимальный уровень после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, в крови или в области заболевания субъекта или его фракции белых клеток крови, *например*, фракции РВМС или фракции Т-клеток, составляет, по меньшей мере, примерно 10%, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 80% или, по меньшей мере, примерно 90% клеток экспрессируемых рекомбинантным рецептором, *например*, CAR.

[0587] В некоторых вариантах осуществления, способ дает в результате максимальную концентрацию в крови или сыворотке или другой телесной жидкости или органе или ткани субъекта, по меньшей мере, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000 или 15000 копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор, *например*, CAR, на микрограмм

ДНК или, по меньшей мере, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 или 0,9 рецептор-экспрессирующих, *например*, CAR-экспрессирующих клеток на общее количество мононуклеаров периферической крови (РВМС), на общее количество мононуклеаров клеток, на общее количество Т-клеток или на общее количество микролитров. В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рецептор детектируются как, по меньшей мере, 10, 20, 30, 40, 50 или 60% от РВМС, в целом, в крови субъекта, и/или на таком уровне в течение, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48 или 52 недель после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, или через 1, 2, 3, 4 или 5 или более лет после такого введения.

[0588] В некоторых аспектах, способ дает в результате увеличение, по меньшей мере, в 2 раз, по меньшей мере, в 4 раза, по меньшей мере, в 10 раз или, по меньшей мере, в 20 раз для копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, *например*, CAR, на микрограмм ДНК, *например*, в сыворотке, плазме, крови или ткани, *например*, образце опухоли, у субъекта.

[0589] В некоторых вариантах осуществления, клетки, экспрессирующие рецептор, детектируются в сыворотке, плазме, крови или ткани, *например*, в образце опухоли, у субъекта, *например*, с помощью указанного способа, такого как способ детектирования на основе qPCR или проточной цитометрии, по меньшей мере, через 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, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 или более дней после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток, или после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, в течение, по меньшей мере, или примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 или более недель после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

[0590] В некоторых аспектах, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^2$ , по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^3$ , по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^4$ , по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^6$  или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^6$  или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^7$  или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^7$  или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^8$  экспрессирующих рекомбинантный рецептор, *например*, CAR-экспрессирующих клеток, и/или, по меньшей мере, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 или 1000 экспрессирующих рецептор клеток на микролитр, *например*, по меньшей мере, 10 на микролитр, детектируется или присутствует у субъекта или в его жидкости, плазме, сыворотке, ткани или компартменте, например, в его крови, *например*, периферической крови или в его области заболевания, *например*, в его опухоли. В некоторых вариантах осуществления, такое количество или концентрация клеток детектируется у субъекта в течение, по меньшей мере, примерно 20 дней, по меньшей мере, примерно 40 дней или, по меньшей мере, примерно 60 дней или, по меньшей мере, примерно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11

или 12 месяцев или, по меньшей мере, 2 или 3 лет, после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида или Соединения 1. Такие количества клеток могут детектироваться с помощью способов на основе проточной цитометрии или количественной PCR и экстраполяции на количество клеток в целом, используя известные способы. *Смотри, например*, Brentjens *et al.*, *Sci Transl Med.* 2013 5(177), Park *et al.*, *Molecular Therapy* 15(4):825-833 (2007), Savoldo *et al.*, *JCI* 121(5):1822-1826 (2011), Davila *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338, Davila *et al.*, *Oncoimmunology* 1(9):1577-1583 (2012), Lamers, *Blood* 2011 117:72-82, Jensen *et al.*, *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 September; 16(9): 1245-1256, Brentjens *et al.*, *Blood* 2011 118(18):4817-4828.

[0591] В некоторых аспектах, количество копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, *например*, количество копий вектора на 100 клеток, например, в периферической крови или костном мозге или в другом компартменте, как измерено посредством иммуногистохимии, PCR и/или проточной цитометрии, составляет, по меньшей мере, 0,01, по меньшей мере, 0,1, по меньшей мере, 1 или, по меньшей мере, 10, примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели, примерно через 4 недели, примерно через 5 недель или, по меньшей мере, примерно через 6 недель или, по меньшей мере, примерно через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или, по меньшей мере, через 2 или 3 года после введения клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. В некоторых вариантах осуществления, количество копий вектора, экспрессирующего рецептор, *например*, CAR, на микрограмм геномной ДНК составляет, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 1000, по меньшей мере, 5000 или, по меньшей мере, 10000 или, по меньшей мере, 15000 или, по меньшей мере, 20000, в момент времени примерно через 1 неделю, примерно через 2 недели, примерно через 3 недели или, по меньшей мере, примерно через 4 недели после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, или, по меньшей мере, через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или, по меньшей мере, через 2 или 3 года после такого введения.

[0592] В некоторых аспектах, рецептор, *например*, CAR, экспрессируемый клетками, детектируется с помощью количественной PCR (qPCR) или с помощью проточной цитометрии у субъекта, в его плазме, сыворотке, крови, ткани и/или в области заболевания, *например*, в области опухоли, в момент времени, который составляет, по меньшей мере, примерно 3 месяца, по меньшей мере, примерно 6 месяцев, по меньшей мере, примерно 12 месяцев, по меньшей мере, примерно 1 год, по меньшей мере, примерно 2 года, по меньшей мере, примерно 3 года или более 3 лет, после введения клеток, *например*, после начала введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

[0593] В некоторых вариантах осуществления, площадь под кривой (AUC) для концентрации рецептор-(*например*, CAR-) экспрессирующих клеток в жидкости, плазме, сыворотке, крови, ткани, органе и/или в области заболевания, *например*, в области опухоли у субъекта в зависимости от времени после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, больше по сравнению с тем, что реализуется с помощью альтернативного режима дозирования, когда субъекту вводят Т-клетки, *например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки, в отсутствие введения иммуномодулирующего соединения.

[0594] В некоторых аспектах, способ дает в результате высокую пролиферацию *in vivo* вводимых клеток, *например*, как измерено с помощью проточной цитометрии. В некоторых аспектах, детектируются высокие доли пиковых клеток. *Например*, в некоторых вариантах осуществления, при пиковом или максимальном уровне после введения Т-клеток, *например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, в крови, плазме, сыворотке, ткани или области заболевания субъекта или в его фракции белых клеток крови, *например*, фракции РВМС или фракции Т-клеток, по меньшей мере, примерно 10%, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 80% или, по меньшей мере, примерно 90% клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор, *например*, CAR.

[0595] В некоторых аспектах, повышенное или пролонгированное размножение и/или персистентность дозы клеток у субъекта, которому вводят иммуномодулирующее соединение, *например*, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, ассоциируется с выигрышем в результатах, связанных с опухолью, у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, результат, связанный с опухолью, включает уменьшение опухолевой нагрузки или уменьшение количества бластных клеток костного мозга у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, опухолевая нагрузка уменьшается на или, по меньшей мере, на или примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов после введения способа. В некоторых вариантах осуществления, тяжесть заболевания, размер опухоли, объем опухоли, масса опухоли и/или **масса или объем** опухоли уменьшается после дозирования клеток, по меньшей мере, на или примерно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с субъектом, которого лечат способом, который не включает введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

## В. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТОК

[0596] В некоторых вариантах осуществления, параметры, ассоциируемые с результатом терапии или лечения, которые включают параметры, которые можно оценивать в течение стадий скрининга и/или оценки результатов лечения и/или отслеживания результатов лечения, включают один или несколько параметров из

активности, фенотипа, пролиферации или функции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный в данной области анализ для оценки активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии. До и/или после введения клеток и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, биологическая активность популяции генно-инженерных клеток в некоторых вариантах осуществления измеряется, *например*, с помощью любого из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфичное связывание генно-инженерной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном, *in vivo*, *например*, с помощью получения изображений, или *ex vivo*, *например*, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления, способность генно-инженерных клеток разрушать целевые клетки можно измерять с использованием любого пригодного для использования способа известного в данной области, такого как анализы цитотоксичности, описанные, *например*, в Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009) и Herman *et al.*, *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004).

[0597] В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, такие как экспрессирующие рекомбинантный рецептор (*например*, CAR) Т-клетки, можно оценивать до и/или после введения клеток и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, для оценки или определения того, демонстрируют ли Т-клетки признаки истощения. В некоторых случаях, истощение можно оценивать посредством отслеживания потери функции Т-клеток, *например*, сокращения или уменьшения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, *например*, сокращения или уменьшения способности продуцировать цитокины или вызывать цитолитическую активность против целевого антигена. В некоторых случаях, истощение также можно оценивать посредством отслеживания экспрессирования поверхностных маркеров на Т-клетках (*например*, на Т-клетках CD4 и/или CD8), которые ассоциируются с фенотипом истощения. Среди маркеров истощения имеются ингибиторные рецепторы, такие как PD-1, CTLA-4, LAG-3 и TIM-3.

[0598] В некоторых вариантах осуществления, такое сокращение или уменьшение активности наблюдается со временем после введения субъекту и/или после длительного экспонирования для антигена.

[0599] В конкретных вариантах осуществления, предлагаемые способы (i) осуществляют указанное повышение антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) предотвращают, ингибируют или замедляют указанное появление фенотипа истощения и/или инвертируют указанный фенотип истощения. В некоторых вариантах осуществления, количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для осуществления указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения. В других вариантах осуществления, количество, продолжительность и/или

частота введения являются эффективными (i) для осуществления указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения,

[0600] где фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает: повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях, повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях.

[0601] В определенных вариантах осуществления, биологическая активность клеток измеряется с помощью анализа экспрессирования и/или секретирования одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a,  $IFN\gamma$ , IL-2, GM-CSF и TNF $\alpha$ , и/или посредством оценки цитолитической активности.

[0602] В некоторых вариантах осуществления, анализы на активность, фенотипы, пролиферацию и/или функцию Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, включают, но, не ограничиваясь этим, ELISPOT, ELISA, анализ клеточной пролиферации, анализ цитотоксичных лимфоцитов (CTL), связывание с эпитопом, антигеном или лигандом Т-клеток или внутриклеточное окрашивание цитокинов, анализы пролиферации, анализы секретирования лимфокинов, прямые анализы цитотоксичности и анализы серийных разведений. В некоторых вариантах осуществления, пролиферативные ответы Т-клеток можно измерять, *например*, посредством инкорпорирования  $^3H$ -тимидина, BrdU (5-бром-2'-деоксиуридина) или 2'-деокси-5-этинилуридина (EdU) в их ДНК или анализов разбавления красителей, используя такие красители, как сложный карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловый эфир (CFSE), CellTrace Violet или мембранный краситель PKH26.

[0603] В некоторых вариантах осуществления, оценка активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, включают измерение продуцирования цитокинов Т-клетками и/или измерение

продуцирования цитокинов в биологическом образце от субъекта, *например*, образцов плазмы, сыворотки, крови и/или ткани, *например*, образцов опухоли. В некоторых случаях, такие измеренные цитокины могут включать, без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерферон-гамма (IFN $\gamma$ ), интерлейкин-4 (IL-4), TNF-альфа (TNF $\alpha$ ), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-12 (IL-12), фактор стимуляции образования колоний макрофагов гранулоцитов (GM-CSF), CD107a и/или TGF-бета (TGF $\beta$ ). Анализы для измерения цитокинов хорошо известны в данной области и включают, но, не ограничиваясь этим, ELISA, внутриклеточное окрашивание цитокинов, матрицу цитометрических шариков, RT-PCR, ELISPOT, проточную цитометрию и биоанализы, при которых клетки чувствительные к соответствующему цитокину исследуют на чувствительность (*например*, пролиферацию) в присутствии исследуемого образца.

[0604] В некоторых вариантах осуществления, оценка активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, включают оценку фенотипов клеток, *например*, экспрессирования конкретных маркеров на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, *например*, Т-клетки, вводимые для Т-клеточной терапии, оценивают на экспрессирование маркеров активации Т-клеток, маркеров истощения Т-клеток и/или маркеров дифференциации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, фенотип клеток оценивают до введения. В некоторых вариантах осуществления, фенотип клеток оценивают после введения. Маркеры активации Т-клеток, маркеры истощения Т-клеток и/или маркеры дифференциации Т-клеток для оценки включают любые маркеры известные в данной области для конкретных подмножеств Т-клеток, *например*, CD25, CD38, DR-антигена лейкоцита человека (HLA-DR), CD69, CD44, CD137, KLRG1, CD62L<sup>low</sup>, CCR7<sup>low</sup>, CD71, CD2, CD54, CD58, CD244, CD160, белка 1 программируемой гибели клеток (PD-1), белка 3 гена активации лимфоцитов (LAG-3), белка 3 домена иммуноглобулина и домена муцина Т-клеток (TIM-3), цитотоксического антигена-4 Т-лимфоцитов (CTLA-4), В-лимфоцитарного и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA) и/или домена иммуноглобулина Т-клеток и ингибиторного мотива тирозинового иммунорецептора (TIGIT) (смотри, *например*, Liu *et al.*, Liu *et al.*, Cell Death and Disease (2015) 6, e1792). В некоторых вариантах осуществления, маркер истощения представляет собой любые один или несколько маркеров из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT. В некоторых вариантах осуществления, оцениваемый маркер на поверхности клетки представляет собой CD25, PD-1 и/или TIM-3. В некоторых вариантах осуществления, оцениваемый маркер на поверхности клетки представляет собой CD25.

[0605] В некоторых аспектах, детектирование уровней экспрессирования включает осуществление анализов *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, анализ *in vitro* представляет собой иммунный анализ, анализ на основе аптамеров, гистологический или цитологический анализ или анализ уровня экспрессирования mRNA. В некоторых вариантах осуществления, параметр или параметры одного или нескольких из каждого одного или нескольких факторов, эффекторов, ферментов и/или поверхностных маркеров

детектируются с помощью иммуносорбентного анализа со связанными ферментами (ELISA), иммуноблоттинга, иммунопреципитации, радиоиммунного анализа (RIA), иммунного окрашивания, анализа с помощью проточной цитометрии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR), анализа хемилюминесценции, иммунохроматографического анализа, анализа ингибирования или анализа avidности. В некоторых вариантах осуществления, детектирование цитокинов и/или поверхностных маркеров определяется с использованием связывающего реагента, который специфично связывается, по меньшей мере, с одним биомаркером. В некоторых случаях, связывающий реагент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, аптамер или зонд из нуклеиновых кислот.

[0606] В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, повышает уровень циркулирующих CAR T-клеток.

### С. ТЯЖЕСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ

[0607] В некоторых вариантах осуществления, параметры, связанные с терапией или с результатами лечения, которые включают параметры, которые можно оценивать в ходе стадий скрининга и/или оценки результатов лечения и/или отслеживания результатов лечения, включая опухолевую нагрузку или тяжесть заболевания. Введение иммунотерапии, такой как T-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующих T-клеток) и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, может уменьшить или предотвратить распространение или увеличение тяжести заболевания или состояния у субъекта. Например, когда заболевание или состояние представляет собой опухоль, способы, как правило, уменьшают размер, объем опухоли, метастазы, процент бластных клеток в костном мозге или молекулярно детектируемого ракового заболевания и/или улучшают прогноз или выживаемость или другой симптом, ассоциированный с опухолевой нагрузкой.

[0608] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы дают в результате уменьшение опухолевой нагрузки у леченых субъектов по сравнению с альтернативными способами, в которых иммунотерапия, такая как T-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие T-клетки) дается без введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. Не является необходимым, чтобы опухолевая нагрузка реально уменьшалась у всех субъектов, принимающих комбинированную терапию, но необходимо, чтобы опухолевая нагрузка уменьшалась в среднем у леченых субъектов, например, на основе клинических данных, когда большинство субъектов, леченых такой комбинированной терапией демонстрирует уменьшение опухолевой нагрузки, например, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более субъектов, леченых с помощью комбинированной терапии, демонстрируют уменьшение опухолевой нагрузки.

[0609] Тяжесть заболевания может охватывать общее количество клеток заболевания у субъекта или в органе, ткани или телесной жидкости субъекта, например, в

органе или ткани опухоли или в другом месте, *например*, что указывало бы на метастазы. Например, клетки опухоли могут детектироваться и/или количественно определяться в крови, лимфе или костном мозге в контексте определенных гематологических злокачественных новообразований. Тяжесть заболевания может включать, в некоторых вариантах осуществления, массу опухоли, количество или степень метастаз и/или процент бластных клеток, присутствующих в костном мозге.

[0610] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет миелому, лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет лимфому не-Ходжкина (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или миелому, *например*, множественную миелому (MM). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет MM или DBCBL. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет фолликулярную лимфому (FL).

[0611] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет плотную опухоль.

[0612] В случае MM, иллюстративные параметры для оценки степени тяжести заболевания включают такие параметры как количество клональных клеток в плазме (*например*, >10% при биопсии костного мозга или любое количество при биопсии других тканей; плазмоцитому), присутствие моноклонального белка (парапротеина) либо в сыворотке, либо в моче, доказательство повреждения органов мишеней предположительно связанных с расстройством клеток плазмы (*например*, гиперкальцемия (скорректированный кальций >2,75 ммоль/л); почечная недостаточность, приписываемая миеломе; анемия (гемоглобин <10 г/дл); и/или повреждения костей (литические повреждения или остеопороз с компрессионными переломами)).

[0613] В случае DLBCL, иллюстративные параметры для оценки степени тяжести заболевания включают такие параметры как клеточная морфология (*например*, центробластные, иммунобластные и анапластические клетки), экспрессирование генов, экспрессирование miRNA и экспрессирование белков (*например*, экспрессирование BCL2, BCL6, MUM1, LMO2, MYC и p21).

[0614] В случае лейкоза, степень тяжести заболевания может определяться по оценке остаточного лейкоза в крови или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если имеется 5% или больше бластных клеток в костном мозге, например, как детектируется посредством световой микроскопии. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует полную или клиническую ремиссию, если имеется меньше 5% бластных клеток в костном мозге.

[0615] В некоторых вариантах осуществления, при лейкозе, субъект может демонстрировать полную ремиссию, но присутствует малая доля морфологически не детектируемых (с помощью технологии световой микроскопии) остаточных лейкоэмических клеток. Про субъекта говорят, что он демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD), если субъект демонстрирует меньше 5% бластных клеток в костном мозге и демонстрирует молекулярно детектируемое раковое заболевание. В некоторых вариантах

осуществления, молекулярно детектируемое раковое заболевание может оцениваться с использованием любой из множества молекулярных технологий, которые делают возможным чувствительное детектирование малого количества клеток. В некоторых аспектах, такие технологии включают анализы PCR, которые могут определить уникальные перегруппировки генов рецепторов Ig/T-клеток или транскриптов слияния, продуцируемые посредством хромосомных транслокаций. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать проточную цитометрию для идентификации раковых клеток на основе лейкоз-специфичных иммунофенотипов. В некоторых вариантах осуществления, молекулярное детектирование рака может детектировать всего 1 клетку лейкоза на 100000 нормальных клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует MRD, которое молекулярно детектируется, если детектируют, по меньшей мере, 1 клетку лейкоза или больше на 100000 клетках, например, с помощью PCR или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, тяжесть заболевания субъекта является молекулярно не детектируемой или MRD, - так что, в некоторых случаях, клетки лейкоза нельзя детектировать у субъекта, используя методики PCR или проточной цитометрии.

[0616] В некоторых вариантах осуществления, способы и/или введение иммунотерапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки) и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, уменьшает тяжесть заболевания по сравнению с тяжестью заболевания непосредственно до введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии и/или иммуномодулирующего соединения.

[0617] В некоторых аспектах, введение иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии и/или иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, может предотвратить увеличение тяжести заболевания и это может быть видно по отсутствию изменения тяжести заболевания.

[0618] В некоторых вариантах осуществления, способ уменьшает тяжесть заболевания или состояния, *например*, количество клеток опухоли, размер опухоли, увеличивает продолжительность выживания пациента или бессобытийную выживаемость, до большей степени и/или в течение большего периода времени, по сравнению с уменьшением, которое можно было бы наблюдать при сравнимом способе, использующем альтернативную терапию, например, терапию, при которой субъект принимает только иммунотерапию, *например*, Т-клеточную терапию, в отсутствие введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. В некоторых вариантах осуществления, тяжесть заболевания уменьшается до большей степени и в течение большего времени после введения комбинированной терапии, введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии и иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, по сравнению с уменьшением которое происходило бы при введении каждого из агентов отдельно, *например*, при введении иммуномодулирующего соединения субъекту, не принимающему иммунотерапию, *например*, Т-клеточную терапию; или при

введении иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, субъекту, не принимающему иммуномодулирующего соединения.

[0619] В некоторых вариантах осуществления, тяжесть заболевания или состояния у субъекта детектируется, оценивается или измеряется. Тяжесть заболевания может детектироваться в некоторых аспектах посредством детектирования общего количества клеток заболевания или клеток, ассоциированных с заболеванием, *например*, клеток опухоли, у субъекта или в органе, ткани или телесной жидкости субъекта, такой как кровь или сыворотка. В некоторых вариантах осуществления, тяжесть заболевания, *например*, опухолевая нагрузка, оценивается посредством измерения массы плотной опухоли и/или количества или распространенности метастаз. В некоторых аспектах оценивается выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного времени, распространенность выживаемости, присутствие или продолжительность бессобытийной или бессимптомной выживаемости или безрецидивная выживаемость. В некоторых вариантах осуществления, оценивается любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, указывается мера тяжести заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные параметры для определения включают конкретные клинические результаты, показывающие ослабление или улучшение при заболевании или состоянии, *например*, опухоли. Такие параметры включают: продолжительность контроля заболевания, включая полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) (смотри, *например*, инструкции Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST)), долю ответов опухоли на лечение по результатам объективной оценки (ORR), выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS) и общую выживаемость (OS). Конкретные пороги для параметров могут устанавливаться для определения эффективности способа комбинированной терапии, предлагаемого в настоящем документе.

[0620] В некоторых вариантах осуществления, субъекты, леченые согласно этому способу, реализуют более стойкий ответ. В некоторых случаях, мера продолжительности ответа (DOR) содержит время от документирования ответа опухоли до прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления, параметр для оценки ответа может включать стойкий ответ, например, ответ, который сохраняется в течение некоторого периода времени от начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, стойкий ответ определяется по доле ответа приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, ответ является стойким в течение более 3 месяцев, более 6 месяцев или более 12 месяцев. В некоторых конкретных вариантах осуществления, субъекты, леченые согласно этому способу, реализуют более стойкий ответ после того, как субъект ранее имел возобновления заболевания после ремиссии в ответ на введение генно-инженерных клеток.

[0621] В некоторых аспектах, тяжесть заболевания измеряется или детектируется до введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии после введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, но до введения иммуномодулирующего соединения,

*например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, после введения иммуномодулирующего соединения, но до введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии и/или после введения как иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, так и иммуномодулирующего соединения. В контексте многократного введения на одной или нескольких стадиях комбинированной терапии, тяжесть заболевания в некоторых вариантах осуществления может измеряться до или после введения любой из стадий, доз и/или циклов введения или в моменты времени между введениями любой из стадий, доз и/или циклов введения.

[0622] В некоторых вариантах осуществления, нагрузка уменьшается на или, по меньшей мере, на или примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов с помощью предлагаемых способов, по сравнению с состоянием непосредственно перед введением иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, и иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, тяжесть заболевания, размер опухоли, объем опухоли, масса опухоли и/или масса и размер опухоли уменьшается после введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, и иммуномодулирующего соединения, по меньшей мере, на или примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более, по сравнению с состоянием непосредственно перед введением иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, и/или иммуномодулирующего соединения.

[0623] В некоторых вариантах осуществления, уменьшение тяжести заболевания с помощью этого способа включает индуцирование морфологически полной ремиссии, например, как оценивается через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца или более 3 месяцев, после введения, *например*, после начала комбинированной терапии.

[0624] В некоторых аспектах, анализ на минимальное остаточное заболевание, например, как измерено с помощью мультипараметрической проточной цитометрии, является отрицательным, или уровень минимального остаточного заболевания меньше примерно, чем 0,3%, меньше примерно, чем 0,2%, меньше примерно, чем 0,1% или меньше примерно, чем 0,05%.

[0625] В некоторых вариантах осуществления, доля бессобытийной выживаемости или общая доля выживаемости субъекта улучшается с помощью настоящих способов, по сравнению с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления, доля или вероятность бессобытийной выживаемости для субъектов, леченых с помощью этих способов, через 6 месяцев после способа комбинированной терапии, предлагаемой в настоящем документе, больше примерно 40%, больше примерно 50%, больше примерно 60%, больше примерно 70%, больше примерно 80%, больше примерно 90% или больше примерно 95%. В некоторых аспектах, общая выживаемость больше примерно 40%, больше примерно 50%, больше примерно 60%, больше примерно 70%, больше примерно 80%, больше примерно 90% или больше примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления, субъект, леченый с помощью этих способов, демонстрирует бессобытийную выживаемость, безрецидивную выживаемость или выживаемость, по меньшей мере, до 6

месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления, время до прогрессирования улучшается, например, время для прогрессирования становится больше или примерно больше 6 месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

[0626] В некоторых вариантах осуществления, после лечения с помощью этого способа, вероятность рецидива уменьшается по сравнению с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления, вероятность рецидива через 6 месяцев после осуществления способа комбинированной терапии, меньше примерно, чем 80%, меньше примерно, чем 70%, меньше примерно, чем 60%, меньше примерно, чем 50%, меньше примерно, чем 40%, меньше примерно, чем 30%, меньше примерно, чем 20% или меньше примерно, чем 10%.

#### IV. ТОКСИЧНОСТЬ И НЕБЛАГОПРИЯТНЫЕ ИСХОДЫ

[0627] В вариантах осуществления предлагаемых способов, субъект отслеживается относительно токсичности или другого неблагоприятного исхода, включая результаты, связанные с лечением, например, развитие нейтропении, синдромов высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности (NT), у субъектов, которым вводят предлагаемую комбинированную терапию, включающую клеточную терапию (например, Т-клеточную терапию) и иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы осуществляются для уменьшения риска токсичного результата или симптома, профиля фактора или свойства, способствующего токсичности, такого как симптом или результат, ассоциированный с острой нейтропенией, тяжелым синдромом высвобождения цитокинов (CRS) или острой нейротоксичностью, или указывающий на них.

[0628] В некоторых вариантах осуществления, способы не дают в результате или не увеличивают риск определенных гематологических токсичностей, таких как нейтропения или тромбоцитопения. В некоторых вариантах осуществления, не более 50% субъектов демонстрируют нейтропению степени выше 3, например, пролонгированную нейтропению степени 3 или нейтропению степени 4, и/или тромбоцитопению степени выше 3, например, тромбоцитопению степени 3 или степени 4. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% субъектов, леченых согласно настоящему способу (например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или более леченых субъектов) не демонстрируют острой нейтропении или тяжелой тромбоцитопении степени 3 или степени выше 3.

[0629] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы не дают в результате высокой доли или появления токсичности или токсичных результатов или уменьшают долю или вероятность появления токсичности или токсичных результатов, таких как острая нейротоксичность (NT) или острый синдром высвобождения цитокинов (CRS), например, по сравнению с определенными другими клеточными терапиями. В некоторых вариантах осуществления, способы не дают в результате или не увеличивают риск острой NT (sNT), острого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдрома

лизиса опухоли, повышения температуры, по меньшей мере, до или примерно до 38 градусов Цельсия в течение трех или более дней и уровня CRP в плазме, по меньшей мере, до или примерно до 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления, больше или больше примерно, чем 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или более субъектов, леченых согласно предлагаемым способам, не демонстрируют никакой степени CRS или никакой степени нейротоксичности. В некоторых вариантах осуществления, более 50% леченых субъектов (например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или более леченых субъектов) не демонстрируют синдрома высвобождения цитокинов (CRS) степени выше 2 и/или нейротоксичности степени выше 2. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% субъектов, леченых согласно настоящему способу (например, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90% или более леченых субъектов) не демонстрируют острого токсического синдрома (например, острого CRS или острой нейротоксичности), например, не демонстрируют нейротоксичности степени 3 или выше и/или не демонстрируют острого CRS или не демонстрируют этого в течение определенного периода времени после лечения, например, в пределах недели, двух недель или одного месяца после введения клеток.

#### А. СИНДРОМ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЦИТОКИНОВ (CRS) И НЕЙРОТОКСИЧНОСТЬ

[0630] В некоторых аспектах, субъект отслеживается относительно способов уменьшения риска токсичного результата, который представляет собой или ассоциируется с синдромом высвобождения цитокинов (CRS) или острым CRS (sCRS) или является его показателем. CRS, *например*, sCRS, может возникать в некоторых случаях после адоптивной Т-клеточной терапии и введения субъектам других биологических продуктов. *Смотри Davila et al.*, *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); *Brentjens et al.*, *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); *Grupp et al.*, *N. Engl. J. Med.* 368, 1509-1518 (2013); и *Kochenderfer et al.*, *Blood* 119, 2709-2720 (2012); *Xu et al.*, *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

[0631] Как правило, CRS вызывается слишком сильным системным иммунным ответом, опосредуемым, например, Т-клетками, В клетками, НК клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут высвобождать большое количество воспалительных медиаторов, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут запускать острый воспалительный ответ и/или вызывать повреждение эндотелиального органа, что может давать в результате проницаемость капилляров, сердечную недостаточность или смерть. Острый, опасный для жизни CRS может приводить к пульмонарной инфильтрации и повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию. Другие острые, опасные для жизни токсичности могут включать кардиотоксичность, респираторный дистресс-синдром, неврологическую токсичность и/или печеночную недостаточность. CRS можно лечить с использованием противовоспалительной терапии, такой как терапия анти-IL-6, *например*, антитело анти-IL-6, *например*, токилизумаб, или антибиотики или другие агенты, как описано.

[0632] Результаты, признаки и симптомы CRS известны и включают параметры, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, где конкретный режим дозирования или введение вызывает или не вызывает данный CRS-ассоциированный результат, признак или симптом, могут быть указаны его конкретные результаты, признаки и симптомы и/или количества или степени.

[0633] В контексте введения CAR-экспрессирующих клеток, CRS как правило, возникает через 6-20 дней после вливания клеток, которые экспрессируют CAR. Смотри Xu *et al.*, *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78. В некоторых случаях, CRS возникает раньше, чем через 6 дней или позже, чем через 20 дней после вливания CAR T-клеток. Частота и временной график CRS могут быть связаны с фоновыми уровнями цитокинов или с опухолевой нагрузкой во время вливания. Обычно, CRS соответствуют повышенные уровни интерферона (IFN)- $\gamma$ , фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$  и/или интерлейкина (IL)-2 в сыворотке. Другие цитокины, которые могут быстро индуцироваться при CRS, представляют собой IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и IL-10.

[0634] Иллюстративные результаты, связанные с CRS, включают повышение температуры, озноб, лихорадку, гипотонию, одышку, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), энцефалопатию, повышение ALT/AST, почечную недостаточность, сердечные расстройства, гипоксию, неврологические расстройства и смерть. Неврологические осложнения включают бредовое состояние, судорожные приступы, спутанность сознания, затруднения с подбором слов, афазию и/или заторможенность. Другие результаты, связанные с CRS, включают утомляемость, тошноту, головную боль, судорожный приступ, тахикардию, боль в мышцах, высыпание, острый синдром сосудистой проницаемости, ослабление функции печени и почечную недостаточность. В некоторых аспектах, CRS ассоциируется с повышением уровня одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногемией или гепатоспленомегалией.

[0635] В некоторых вариантах осуществления, результаты, связанные с CRS, включают один или несколько параметров из: стойкого повышения температуры, *например*, повышения до заданной температуры, *например*, до 38 градусов Цельсия или около того или, в течение двух или более, *например*, трех или более, *например*, четырех или более дней, или в течение, по меньшей мере, трех последовательных дней; повышение температуры больше 38 градусов Цельсия или около того; повышение уровня цитокинов, *например* с максимальной кратностью изменения, *например*, по меньшей мере, 75 или около того, по сравнению с уровнями до лечения, по меньшей мере, для двух цитокинов (*например*, по меньшей мере, для двух цитокинов из группы, состоящей из интерферона гамма (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5, и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )), или максимальную кратность изменения, *например*, по меньшей мере, 250 или около того, по меньшей мере, для одного из таких цитокинов; и/или, по меньшей мере, один клинический признак токсичности, такой как гипотония (*например*,

как измерено с помощью, по меньшей мере, одного внутривенного вазоактивного прессора; гипоксию (*например*, уровни кислорода в плазме ( $PO_2$ ) меньше 90% или около того) и/или одно или несколько неврологических расстройств (включая изменение психического состояния, притупление болевой чувствительности и судорожные припадки).

[0636] Иллюстративные результаты, связанные с CRS, включают повышенные или высокие уровни одного или нескольких факторов, включая цитокины и хемокины и другие факторы, ассоциированные с CRS, в сыворотке. Иллюстративные результаты дополнительно включают усиление синтеза или секретирования одного или нескольких таких факторов. Такой синтез или секретирование может осуществляться посредством Т-клетки или клетки, которая взаимодействует с Т-клеткой, такие как иннатная иммунная клетка или В клетка.

[0637] В некоторых вариантах осуществления, ассоциированные с CRS факторы в сыворотке или результаты, связанные с CRS включают воспалительные цитокины и/или хемокины, включая интерферон гамма ( $IFN-\gamma$ ), TNF-альфа, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, фактор стимулирования образования колоний макрофагов гранулоцитов (GM-CSF), макрофагальный белок воспаления (MIP)-1, фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), IL-6 и IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, фракталкин и/или IL-5. В некоторых вариантах осуществления, фактор или результат включает С-реактивный белок (CRP). В дополнение к тому, что он является ранним и легко измеряемым фактором риска CRS, CRP также представляет собой маркер размножения клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, такие как  $\geq 15$  мг/дл, имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, не имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, показатель CRS включает измерение CRP и другого фактора показательного для CRS.

[0638] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько воспалительных цитокинов или хемокинов отслеживаются до, в ходе или после лечения CAR и/или лечения Соединением 1. В некоторых аспектах, один или несколько цитокинов или хемокинов включают  $IFN-\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2R $\alpha$ , фактор стимулирования образования колоний макрофагов гранулоцитов (GM-CSF) или макрофагальный белок воспаления (MIP). В некоторых вариантах осуществления отслеживают  $IFN-\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-6.

[0639] Критерии CRS, которые, видимо, коррелируют с появлением CRS, которые предсказывают, что пациенты с большей вероятностью имеют риск развития sCRS, разработаны (*смотри Davilla et al. Science translational medicine. 2014;6(224):224ra25*). Факторы включают повышение температуры, гипоксию, гипотонию, неврологические изменения, повышенные уровни в сыворотке воспалительных цитокинов, таких как набор из семи цитокинов ( $IFN\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и GM-CSF) у которых вызываемое лечением повышение уровня может хорошо коррелировать как с опухолевой нагрузкой до лечения, так и с симптомами sCRS. Другие инструкции для диагностики и ведения CRS известны (*смотри, например, Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95*). В

некоторых вариантах осуществления, критерии отражающие степень CRS подробно изложены в Таблице 2 ниже.

<b>Таблица 2: Иллюстративные критерии степени CRS</b>	
<b>Степень</b>	<b>Описание симптомов</b>
1 Легкая	Не опасно для жизни, требует только симптоматического лечения, например, антипиретиков и противорвотных ( <i>например</i> , повышение температуры, тошнота, утомляемость, головная боль, боль в мышцах, недомогание)
2 Средней тяжести	Требует умеренного вмешательства и отвечает на него: Потребность в кислороде < 40% или Гипотония чувствительная к жидкостям или к низкой дозе одного вазопрессора или Токсичность для органов степени 2 (СТСАЕ v4.0)
3 Тяжелая	Требует агрессивного вмешательства и отвечает на него: Потребность в кислороде <40% или Гипотония, требующая высокой дозы одного вазопрессора ( <i>например</i> , норэпинефрина $\geq 20$ ой мкг/кг/мин, допамина $\geq 10$ мкг/кг/мин, фенилэфрина $\geq 200$ мкг/кг/мин или эпинефрина $\geq 10$ мкг/кг/мин) или Гипотония, требующая множества вазопрессоров ( <i>например</i> , вазопрессин+один из указанных выше агентов или комбинация вазопрессоров эквивалентное $\geq 20$ мкг/кг/мин норэпинефрина) или Токсичность для органов степени 3 или трансаминит степени 4 (СТСАЕ v4.0)
4 Опасная для жизни	Опасная для жизни: Необходима поддержка вентиляции легких или Токсичность для органа степени 4 (исключая трансаминит)
5 Фатальная	Смерть

[0640] В некоторых вариантах осуществления, субъект как считается развивает “острый CRS” (“sCRS”) в ответ на дозу или после введения клеточной терапии или дозы ее клеток, если после введения субъект демонстрирует: (1) повышенную температуру, по меньшей мере, до 38 градусов Цельсия, в течение, по меньшей мере, трех дней; (2) повышение уровня цитокинов, которое включает либо (а) максимальную кратность изменения, по меньшей мере, 75, по меньшей мере, для двух из следующей далее группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем непосредственно после введения: интерферон

гамма (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5, и/или (b) максимальную кратность изменения, по меньшей мере, 250, по меньшей мере, для одного из следующей группы из семи цитокинов по сравнению с уровнем непосредственно после введения: интерферон гамма (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5; и (c) по меньшей мере, один клинический признак токсичности, такой как гипотония (требуемая, по меньшей мере, одного внутривенного вазоактивного прессора) или гипоксия (PO $_2$  <90%) или одно или несколько неврологический расстройств (включая изменение психического состояния, притупление болевой чувствительности и/или судорожные припадки). В некоторых вариантах осуществления, острый CRS включает CRS степени 3 или выше, такой как приведено в Таблице 2.

[0641] В некоторых вариантах осуществления, результаты, связанные с острым CRS или CRS степени 3 или выше, например, степени 4 или выше, включают один или несколько симптомов: стойкое повышение температуры, *например*, повышение температуры до указанной температуры, *например*, больше 38 градусов Цельсия или около того, в течение двух или более, *например*, трех или более, *например*, четырех или более дней или в течение, по меньшей мере, трех последовательных дней; повышение температуры больше 38 градусов Цельсия или около того; повышение уровня цитокинов, например, максимальную кратность изменения, *например*, по меньшей мере, или примерно 75, по сравнению с уровнями до лечения, по меньшей мере, для двух цитокинов (*например*, по меньшей мере, двух цитокинов из группы, состоящей из интерферона гамма (IFN $\gamma$ ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5, и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ )), или максимальную кратность изменения, *например*, по меньшей мере, или примерно 250, по меньшей мере, для одного из таких цитокинов; и/или, по меньшей мере, один клинический признак токсичности, такой как гипотония (*например*, как измерено с помощью, по меньшей мере, одного внутривенного вазоактивного прессора); гипоксия (*например*, уровни кислорода в плазме (PO $_2$ ) меньше 90% или около того); и/или одно или несколько неврологических расстройств (включая изменение психического состояния, притупление болевой чувствительности и судорожные припадки). В некоторых вариантах осуществления, острый CRS включает CRS, который требует ведения или ухода в палате интенсивной терапии (ICU).

[0642] В некоторых вариантах осуществления, CRS, такой как острый CRS, охватывает комбинацию (1) стойкого повышения температуры (повышение температуры, по меньшей мере, до 38 градусов Цельсия в течение, по меньшей мере, трех дней) и (2) уровня в сыворотке CRP, по меньшей мере, 20 мг/дл или около того. В некоторых вариантах осуществления, CRS охватывает гипотонию, требующую использования двух или более вазопрессоров или респираторную недостаточность, требующую искусственной вентиляции легких. В некоторых вариантах осуществления, доза вазопрессоров увеличивается при втором или последующих введениях.

[0643] В некоторых вариантах осуществления, острый CRS или CRS степени 3 охватывает повышение уровня аланинаминотрансферазы, повышение уровня

аспартатаминотрансферазы, лихорадку, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункцию левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или дрожание.

[0644] Может быть указан способ измерения или детектирования различных результатов.

[0645] В некоторых аспектах, токсичный результат терапии, такой как клеточная терапия, представляет собой или ассоциируется с ней или указывает на нейротоксичность или острую нейротоксичность. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с клиническим риском нейротоксичности, включают спутанность сознания, бредовое состояние, экспрессивную афазию, притупление болевой чувствительности, миоклонус, летаргический сон, изменение психического состояния, судороги, судорожные приступы, судорожные припадки (необязательно, как подтверждается с помощью электроэнцефалограммы [EEG]), повышенные уровни бета амилоида (A $\beta$ ), повышенные уровни глутамина и повышенные уровни кислородных радикалов. В некоторых вариантах осуществления, нейротоксичность присваивается на основе тяжести (*например*, используя шкалу степеней 1-5 (*смотри, например*, Guido Cavaletti & Paola Marmioli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03)).

[0646] В некоторых случаях, неврологические симптомы могут представлять собой самые ранние симптомы sCRS. В некоторых вариантах осуществления, неврологические симптомы видны, начиная с 5-7 дней после вливания клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, продолжение неврологических изменений может происходить в пределах от 3 до 19 дней. В некоторых случаях, выздоровление после неврологических изменений происходит после того, как разрешаются другие симптомы sCRS. В некоторых вариантах осуществления, время или степень разрешения неврологических изменений не ускоряется при лечении анти-IL-6 и/или стероидом (стероидами).

[0647] В некоторых вариантах осуществления, субъект должен развивать “острую нейротоксичность” в ответ на введение или после введения клеточной терапии или дозы ее клеток, если после введения субъект демонстрирует симптомы, которые ограничивают уход за собой (*например*, купание, одевание и раздевание, питание, пользование туалетом, прием медицинских препаратов) из: 1) симптомов периферической двигательной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических двигательных нервов; 2) симптомов периферической сенсорной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических сенсорных нервов, дизестезии, такой как нарушение сенсорного восприятия, что приводит в результате к аномальным и неприятным ощущениям, невралгии, такой как интенсивное болезненное ощущение вдоль нерва или группы нервов и/или парестезию, такую как функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящее в результате к аномальным кожным ощущениям покалывания, онемения, давления, холода и тепла в отсутствие стимула. В некоторых вариантах осуществления, острая нейротоксичность включает нейротоксичность степени 3 или выше, например, как приведено в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления, острая

нейротоксичность, как считается, имеет пролонгированную степень 3, если симптомы нейротоксичности степени 3 продолжаются в течение 10 дней или больше.

<b>Таблица 3: Иллюстративные критерии разделения нейротоксичности по степеням</b>	
<b>Степень</b>	<b>Описание симптомов</b>
1 Бессимптомная или легкая	Легкие симптомы или бессимптомная
2 Средней тяжести	Присутствие симптомов, которые ограничивают инструментальные элементарные действия по самообслуживанию (ADL), такие как приготовление еды, покупку продуктов или одежды, использование телефона, контролирование денег
3 Тяжелая	Присутствие симптомов, которые ограничивают уход за собой вовремя ADL, такой как купание, одевание и раздевание, самостоятельное питание, пользование туалетом, прием медицинских препаратов
4 Опасная для жизни	Симптомы, которые опасны для жизни, требуют срочного вмешательства
5 Фатальная	Смерть

[0648] В некоторых вариантах осуществления, способы уменьшают симптомы, ассоциированные с CRS, или нейротоксичность по сравнению с другими способами. В некоторых аспектах, предлагаемые способы уменьшают симптомы, результаты или факторы, связанные с CRS, включая симптомы, результаты или факторы, связанные с острой CRS или CRS степени 3 или выше, по сравнению с другими способами. Например, у субъектов, леченых согласно настоящим способам, могут не детектироваться и/или уменьшаться симптомы, результаты или факторы CRS, *например*, острый CRS или CRS степени 3 или выше, например, как любые описанные, *например*, приведенные в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, леченые согласно настоящим способам, могут иметь уменьшенные симптомы нейротоксичности, такие как слабость конечностей или онемение, потеря памяти, зрения и/или интеллекта, неконтролируемое обсессивное и/или компульсивное поведение, бредовые идеи, головная боль, когнитивные и бихевиоральные проблемы, включая потерю двигательного контроля, нарушение когнитивных функций и дисфункцию вегетативной нервной системы и сексуальную дисфункцию, по сравнению с субъектами, лечеными с помощью других способов. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, леченые согласно настоящим способам, могут иметь уменьшение симптомов, ассоциированных с периферической двигательной

нейропатией, периферической сенсорной невропатией, дисестезией, невралгией или парестезией.

[0649] В некоторых вариантах осуществления, способы уменьшают результаты, ассоциированные с нейротоксичностью, включая повреждения нервной системы и/или головного мозга, такие как гибель нейронов. В некоторых аспектах, способы уменьшают уровень факторов, ассоциированных с нейротоксичностью, таких как бета амилоид (A $\beta$ ), глутамин и кислородные радикалы.

[0650] В некоторых вариантах осуществления, результат токсичности представляет собой ограничивающую дозу токсичность (DLT). В некоторых вариантах осуществления, результат токсичности представляет собой отсутствие ограничивающей дозу токсичности. В некоторых вариантах осуществления, ограничивающая дозу токсичность (DLT) определяется как любая токсичность степени 3 или выше, как описано или оценивается в любой известной или опубликованной инструкции для оценки конкретной токсичности, например, как описано выше, и включая National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0. В некоторых вариантах осуществления, ограничивающая дозу токсичность (DLT) определяется, когда любое из событий, обсуждаемых ниже, происходит после введения клеточной терапии (*например*, Т-клеточной терапии) и/или Соединения 1, события включают а) фебрильную нейтропению; б) нейтропению степени 4, продолжающуюся примерно 7 дней или больше; с) тромбоцитопению степени 3 или 4 с клинически значимым кровотечением; и d) тромбоцитопению степени 4, продолжающуюся более 24 часов.

[0651] В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые варианты осуществления, дают в результате низкую долю или риск развития токсичности, *например*, CRS или нейротоксичности или острого CRS или нейротоксичности, *например*, CRS степени 3 или выше или нейротоксичности, например, как наблюдается при введении дозы Т-клеток в соответствии с предлагаемой комбинированной терапией, и/или с предлагаемыми промышленными изделиями или композициями. В некоторых случаях это делает возможным введение клеточной терапии на амбулаторной основе. В некоторых вариантах осуществления, введение клеточной терапии, *например*, дозы Т-клеток (*например*, CAR+ Т-клеток) в соответствии с предлагаемыми способами и/или с предлагаемыми промышленными изделиями или композициями, осуществляется на амбулаторной основе или не требует помещения субъекта в больницу, например, помещения в больницу, требующего ночного пребывания.

[0652] В некоторых аспектах, субъектам, которым вводят Т-клеточную терапию, *например*, дозу Т-клеток (*например*, CAR+ Т-клеток) в соответствии с предлагаемыми способами и/или с предлагаемыми промышленными изделиями или композициями, включая субъектов, леченых на амбулаторной основе, не вводят вмешательство для лечения какой-либо токсичности до или при введении дозы клеток, или до тех пор, пока субъект не демонстрирует признака или симптома токсичности, например, нейротоксичности или CRS.

[0653] В некоторых вариантах осуществления, если субъект, который получает клеточную терапию, *например*, дозу Т-клеток (*например*, CAR+ Т-клеток), включая субъектов, леченых на амбулаторной основе, демонстрирует повышение температуры, субъекту вводят или рекомендуют принять или ввести лечение для понижения температуры. В некоторых вариантах осуществления, повышение температуры у субъекта отличается как температура тела субъекта, которая равна (или измерена как) или выше определенной пороговой температуры или уровня. В некоторых аспектах, пороговая температура ассоциируется, по меньшей мере, со слабо выраженным повышением температуры, по меньшей мере, с умеренным повышением температуры, и/или по меньшей мере, с сильно выраженным повышением температуры. В некоторых вариантах осуществления, пороговая температура представляет собой конкретную температуру или диапазон. Например, пороговая температура может быть равна или примерно равна, по меньшей мере, равна или примерно равна 38, 39, 40, 41 или 42 градусам Цельсия, и/или может находиться диапазоне от или примерно от 38 градусов Цельсия до или примерно до 39 градусов Цельсия, в диапазоне от или примерно от 39 градусов Цельсия до или примерно до 40 градусов Цельсия, в диапазоне от или примерно от 40 градусов Цельсия до или примерно до 41 градуса или в диапазоне от или примерно от 41 градуса Цельсия до или примерно до 42 градусов Цельсия.

[0654] В некоторых вариантах осуществления, лечение, разработанное для понижения температуры, включает лечение с помощью жаропонижающего средства. Жаропонижающее средство может включать любой агент, композицию или ингредиент, который понижает повышенную температуру, например, любой агент из ряда агентов, как известно, имеющих жаропонижающее воздействие, таких как NSAID (такие как ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), салицилаты, такие как аспирин, холин салицилат, магний салицилат и натрий салицилат, парацетамол, ацетаминофен, метамизол, набуметон, фенаксон, антипирин, фебрифугин. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, ацетаминофен может вводиться при дозе 12,5 мг/кг перорально или внутривенно с интервалами до четырех часов. В некоторых вариантах осуществления, оно представляет собой или содержит ибупрофен или аспирин.

[0655] В некоторых вариантах осуществления, если повышение температуры представляет собой стойкое повышение температуры, субъекту вводят альтернативное лечение для лечения токсичности. Для субъектов, леченых на амбулаторной основе, субъекту рекомендуют вернуться в больницу, если субъект имеет и/или определено, что он имеет стойкое повышение температуры. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или определено или считается, что он имеет стойкое повышение температуры, если он или она демонстрирует повышение температуры равное или превышающее соответствующую пороговую температуру, и, когда повышение температуры или температура тела субъекта не уменьшается или не уменьшается на заданную или большую величину (*например*, больше 1°C и, как правило, не флуктуирует примерно на или больше

примерно, чем на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C), после назначенного лечения, такое как лечение разработанное для понижения температуры, например, лечение с помощью антипиретика, *например*, NSAID или салицилатов, *например*, ибупрофена, ацетаминофена или аспирина. Например, считается, что субъект имеет стойкое повышение температуры, если он или она демонстрирует или определено, что он демонстрирует повышенную температуру, по меньшей мере, или примерно 38 или 39 градусов Цельсия, которая не уменьшается или не уменьшается больше, чем на или примерно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C или на или примерно на 1%, 2%, 3%, 4% или 5%, в течение периода 6 часов, в течение периода 8 часов или в течение периода 12 часов или в течение периода 24 часов, даже после лечения жаропонижающим средством, таким как ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, дозировка жаропонижающего средства представляет собой дозу обычно эффективную для такого субъекта при понижении температуры или при повышении температуры определенного типа, такого как повышение температуры, связанное с бактериальной или вирусной инфекцией, *например*, локальной или системной инфекций.

[0656] В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или, как определено или как считается, имеет стойкое повышение температуры, если он или она демонстрирует повышение температуры равное или большее, чем соответствующая пороговая температура, и при этом повышенная температура или температура тела субъекта не флуктуирует примерно на 1°C или больше и, как правило, не флуктуирует примерно на или больше 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C. Такое отсутствие флуктуаций с определенной величиной или выше, как правило, измеряется в течение данного периода времени (например, в течение 24-часового, 12-часового, 8-часового, 6-часового, 3-часового или 1-часового периода времени, которое может измеряться от первого признака повышения температуры или от первой температуры, превышающей указанный порог). Например, в некоторых вариантах осуществления, субъект, как считается или как определено, демонстрирует стойкое повышение температуры, если он или она демонстрирует повышенную температуру, по меньшей мере, или примерно 38 или 39 градусов Цельсия, при этом флуктуация температуры не больше 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C или около того, в течение периода 6 часов, в течение периода 8 часов или в течение периода 12 часов или в течение периода 24 часов.

[0657] В некоторых вариантах осуществления, повышение температуры представляет собой стойкое повышение температуры; в некоторых аспектах, субъекта лечат в то время, когда субъект, как определено, имеет стойкое повышение температуры, например, в течение одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или меньше часов, при таком определении или от первого такого определения после начала терапии, которая потенциально может вызывать токсичность, такой как клеточная терапия, такой как доза Т-клеток, *например*, CAR+ Т-клеток.

[0658] В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько вмешательств или агентов для лечения токсичности, таких как нацеленная на токсичность терапия, вводят в момент времени, когда субъект, как определено или подтверждено (например, как

впервые определено или подтверждено), демонстрирует стойкое повышение температуры, или непосредственно после этого, например, как измерено согласно любому из рассмотренных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько нацеленных на токсичность видов терапии вводят в пределах определенного периода времени при таком подтверждении или определении, например, в диапазоне 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов в ходе его.

## V. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

[0659] В некоторых аспектах, субъекта отслеживают относительно способов уменьшения риска токсического результата, который представляет собой гематологическую токсичность или ассоциируется с ней или является ее показателем, такого как тромбоцитопения и/или нейтропения. В некоторых случаях, гематологическую токсичность, включая тромбоцитопению и нейтропению, разделяют на степени согласно Common Terminology Criteria for Adverse Events (Version 4.03; US National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). В некоторых случаях, гематологическую токсичность, например, тромбоцитопению и/или нейтропению, отслеживают до, в ходе и после введения (введений) иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. В некоторых случаях, гематологическую токсичность, например, тромбоцитопению и/или нейтропению, отслеживают перед каждым введением иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. В некоторых случаях, гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения, отслеживают, по меньшей мере, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2.

[0660] В некоторых вариантах осуществления, осуществляется полный анализ крови для отслеживания уровней лейкоцитов (белых клеток крови) у субъекта, включая нейтрофилы и тромбоциты. Можно использовать множество способов для осуществления общего клинического анализа крови (CBC) и/или дифференциального анализа лейкоцитов. В некоторых вариантах осуществления, используется гематологический анализатор.

[0661] Нейтропения отличается уменьшением отсчетов нейтрофилов в крови, часто приводя к повышенной восприимчивости к бактериальной и грибковой инфекции. Общие симптомы нейтропении у пациентов включают, например, повышение температуры, язвы в полости рта и инфекции уха. Пациенты с выраженной нейтропенией часто страдают от гнойных инфекций, таких как сепсис, острый целлюлит, от абсцессов печени, фурункулеза, пневмонии, стоматита, гингивита, периректального воспаления, колита, синуситов и воспаления среднего уха.

[0662] В некоторых вариантах осуществления, абсолютное количество нейтрофилов (ANC) используется для определения уровней нейтропении. ANC можно вычислить по компонентам полного анализа крови. В некоторых вариантах осуществления, тяжесть нейтропении классифицируется на основе абсолютного количества нейтрофилов (ANC), измеренного в клетках на микролитр крови: а) легкая нейтропения (1000-1500 клетки/мл);

b) нейтропения средней тяжести (степень 3; 500-1000 клетки/мл); c) острая нейтропения (степени 4; <500 клетки/мл). В некоторых вариантах осуществления, нейтропения может разделяться на степени согласно критериям, приведенным в Таблице 4. Субъекты с острой нейтропенией часто имеют риск тяжелой инфекции.

Степень	ANC
Степень 1	$< 2,0 \times 10^9/\text{л}$ ( $<2000/\text{мм}^3$ ) и $>1,5 \times 10^9/\text{л}$ ( $>1500/\text{мм}^3$ )
Степень 2	$< 1,5 \times 10^9/\text{л}$ ( $<1500/\text{мм}^3$ ) и $>1,0 \times 10^9/\text{л}$ ( $>1000/\text{мм}^3$ )
Степень 3	$< 1,0 \times 10^9/\text{л}$ ( $<1000/\text{мм}^3$ ) и $>0,5 \times 10^9/\text{л}$ ( $>500/\text{мм}^3$ )
Степень 4	$< 0,5 \times 10^9/\text{л}$ ( $<500/\text{мм}^3$ )

[0663] В некоторых случаях, нейтропения представляет собой фебрильную нейтропению (также называемую нейтропеническим повышением температуры или нейтропеническим сепсисом). Фебрильная нейтропения возникает, когда пациент имеет температуру выше 38°C и низкие уровни нейтрофилов или нейтропению. В некоторых вариантах осуществления, фебрильная нейтропения может разделяться на степени согласно критериям, приведенным в Таблице 5.

Степень	Описание симптомов
Степень 3	ANC $<1000/\text{мм}^3$ и, однократно, температура $>38,3$ градуса C (101 градус F) или стойкая температура $\geq 38$ градусов C (100,4 градуса F) в течение нескольких часов
Степень 4	опасные для жизни последствия и показанное срочное вмешательство
Степень 5	смерть

[0664] В некоторых вариантах осуществления, субъекта отслеживают на тромбоцитопению. Тромбоцитопения отличается количеством тромбоцитов меньше 150000 клеток на микролитр (мкл). Представление тромбоцитопении, особенно среди пациентов с более тяжелыми степенями, может включать кровотечение, экхимозы, петехию, пурпуру и гиперспленизм. Тромбоцитопения может характеризоваться как тромбоцитопения степени 1 (то есть, количеством тромбоцитов 75000-150000/мкл), степени 2 (то есть, количеством тромбоцитов от 50000 до  $<75000/\text{мкл}$ ), степени 3 (количеством тромбоцитов от 25000 до  $<50000/\text{мкл}$ ) или степени 4 (то есть, количеством тромбоцитов ниже 25000/мкл).

[0665] В некоторых вариантах осуществления предлагаемых способов, если субъект, как определено, демонстрирует гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения, или конкретную ее степень, циклическая терапия с

помощью иммуномодулирующим соединением, *например*, леналидомидом, Соединением 1 или Соединением 2, может изменяться. В некоторых аспектах, циклическая терапия изменяется, если после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, субъект имеет тромбоцитопению степени 3 или выше; нейтропению степени 3; нейтропению степени 3, которая является стойкой (например, в течение, по меньшей мере, больше 3, 5 или 7 дней); нейтропению степени 4; фебрильную нейтропению степени 3 или выше. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, останавливается навсегда или приостанавливается на время пока признаки или симптомы токсичности не разрешатся, не уменьшатся или не сократятся. Продолжительное отслеживание субъекта может осуществляться для оценки одного или нескольких признаков или симптомов токсичности, например, с помощью СВС или дифференциального анализа лейкоцитов. В некоторых случаях, если токсичность разрешается или сокращается, введение леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2 можно начать снова при такой же дозе или режиме дозирования перед приостановкой циклической терапии, при более низкой или сокращенной дозе, и/или в режиме дозирования, включающем более редкое дозирование. В некоторых вариантах осуществления, в случаях возобновления циклической терапии, доза понижается или сокращается, по меньшей мере, на или, по меньшей мере, примерно на или примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% или 60%. В некоторых вариантах осуществления, если доза до приостановки клеточной терапия составляет 2 мг (например, при условии 5/7 дней), дозу уменьшают до 1 мг (при условии 5/7 дней). В некоторых аспектах, если гематологическая токсичность имеет такую тяжесть, что приостановка циклической терапии составляет больше 4 недель, циклическую терапию можно прекратить навсегда.

[0666] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов можно вводить субъекту для лечения, ослабления или уменьшения одного или нескольких симптомов, связанных с гематологической токсичностью. В некоторых случаях, миелоидные факторы роста, такие как G-CSF или GM-CSF, вводят субъекту пока гематологическая токсичность не ослабнет. Примеры такой терапии включают филграстим или пегфилграстим. В некоторых аспектах, такие агенты вводят субъектам, испытывающим острую нейтропению или фебрильную нейтропению, включая нейтропению степени 3 или выше любой продолжительности.

### С. НЕГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

[0667] В некоторых аспектах, токсический результат представляет собой или ассоциируется с одной или несколькими не гематологическими токсичностями, или указывает на них, после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2. Примеры не гематологической токсичности включают, но, не ограничиваясь этим, транзиторное усугубление клинических проявлений опухоли, инфекции, синдром лизиса опухоли, отклонение от нормы лабораторных показателей сердечной деятельности, тромбоэмболическое осложнение

(осложнения) (такие как тромбоз глубоких вен и эмболия легочной артерии), и/или пневмония.

[0668] В некоторых аспектах, не гематологическая токсичность представляет собой транзиторное усугубление клинических проявлений опухоли (TFR) (иногда также упоминается как псевдопрогрессирование). TFR представляет собой внезапное увеличение размера областей заболевания, включая лимфатические узлы, селезенку и/или печень, часто сопровождающееся слабо выраженным повышением температуры, слабостью и отеком, диффузным высыпанием, и в некоторых случаях, повышением количества лимфоцитов в периферической крови. В некоторых вариантах осуществления, TFR делится на степени согласно Common Terminology Criteria for Adverse Events (Version 3.0; US National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). В некоторых вариантах осуществления, TFR делится на степени следующим образом: степень 1, легкая боль, не мешающая функционированию; степень 2, боль средней тяжести, боль или анальгетики, отрицательно влияющие на функции, но не влияющие отрицательно на элементарные действия по самообслуживанию (ADL); степень 3, острая боль, боль или анальгетики отрицательно влияют на функции и отрицательно влияют на функции ADL; степень 4, потеря трудоспособности; степень 5, смерть. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько агентов, например, кортикостероиды, NSAID и/или наркотический анальгетик, можно вводить субъекту для лечения, ослабления или уменьшения одного или нескольких симптомов, связанных с TFR.

[0669] В некоторых аспектах, не гематологическая токсичность представляет собой синдром лизиса опухоли (TLS). В некоторых вариантах осуществления, TLS может разделяться на степени согласно критериям, указанным системой разделения на степени Cairo-Bishop (Cairo and Bishop (2004) *Br J Haematol*, 127:3-11). В некоторых вариантах осуществления, субъектам можно давать внутривенное гидратирование для уменьшения гиперурикемии.

[0670] В некоторых вариантах осуществления, субъекты могут отслеживаться на кардиотоксичность, например, посредством отслеживания ECGS, LVEF и отслеживания уровней тропонина-Т и BNP. В некоторых вариантах осуществления, кардиотоксичность может потенциально потребовать прекращения или приостановки приема Соединения 1, это может происходить, когда наблюдаются повышенные уровни тропонина-Т и/или BNP при одном или нескольких симптомов со стороны сердца.

[0671] В некоторых вариантах осуществления предполагаемых способов, если субъект, как определено, демонстрирует не гематологическую токсичность, такую как TFR или другую не гематологическую токсичность или конкретную ее степень, циклическая терапия с иммуномодулирующим соединением, например, Соединением 1, может изменяться. В некоторых аспектах, циклическая терапия изменяется, если после введения иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, субъект имеет не гематологическую токсичность степени 3 или выше, например, TFR степени 3 или выше. В некоторых вариантах осуществления, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или

Соединения 2, останавливается навсегда или приостанавливается на время пока признаки или симптомы токсичности не разрешатся, не уменьшатся или не сократятся. Продолжительное отслеживание субъекта может осуществляться для оценки одного или нескольких признаков или симптомов токсичности. В некоторых случаях, если токсичность разрешается или сокращается, введение иммуномодулирующего соединения, *например*, леналидомида, Соединения 1 или Соединения 2, можно начать снова при такой же дозе или режиме дозирования, как перед приостановкой циклической терапии, при более низкой или сокращенной дозе, и/или в режиме дозирования, включающем более редкое дозирование. В некоторых вариантах осуществления, в случаях возобновления циклической терапии, доза понижается или сокращается, по меньшей мере, на или, по меньшей мере, примерно на или примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% или 60%. В некоторых вариантах осуществления, для Соединения 1, если доза до приостановки клеточной терапия составляет 2 мг (например, при условии 5/7 дней), дозу уменьшают до 1 мг (при условии 5/7 дней). В некоторых вариантах осуществления, если токсичность степени 3 возобновляется даже после уменьшения дозы, дозу можно дополнительно уменьшить. В некоторых вариантах осуществления, если токсичность степени 4 возобновляется даже после уменьшения дозы, циклическую терапию можно прекратить навсегда. В некоторых аспектах, если гематологическая токсичность имеет такую тяжесть, что приостановка циклической терапии составляет больше 4 недель, циклическую терапию можно прекратить навсегда.

#### V. ПРОМЫШЛЕННЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

[0672] Также предлагаются промышленные изделия, содержащие иммуномодулирующее лекарственное средство (иммуномодулирующее соединение), такое как леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2, и компоненты для иммунотерапии, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или для Т-клеточной терапии, например, генно-инженерные клетки и/или их композиции. Промышленные изделия могут содержать контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку на контейнере или ассоциированный с ним. Пригодные для использования контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенных растворов, и тому подобное. Контейнеры могут формироваться из разнообразных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер в некоторых вариантах осуществления удерживает композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния. В некоторых вариантах осуществления, контейнер имеет стерильный узел доступа. Иллюстративные контейнеры включают пакеты для внутривенного раствора, флаконы, включая флаконы с пробками, прокалываемыми иглой для инъекций, или бутылки или флаконы для перорально вводимых агентов. Этикетка или листовка-вкладыш в упаковку может указывать, что композиция используется для лечения заболевания или состояние.

[0673] Промышленное изделие может содержать (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит антитело или генно-

инженерные клетки, используемые для иммунотерапии, например, Т-клеточной терапии; и (b) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит второй агент, такой как иммуномодулирующее соединение, например, леналидомид, Соединение 1 или Соединение 2. Промышленное изделие может дополнительно содержать листовку-вкладыш в упаковку, показывающий, что композицию можно использовать для лечения конкретного состояния. Альтернативно или в дополнение к этому, промышленное изделие может дополнительно содержать другой или этот же контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. Он может дополнительно содержать другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и/или шприцы.

## VI. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0674] Если не определено иного, все термины данной области обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемая в настоящем документе, как предполагается, имеют такое же значение как обычно понимается специалистами в области, к которой относится заявляемый предмет изобретения. В некоторых случаях, термины с обычно понимаемыми значениями определяются в настоящем документе для ясности и/или для простоты упоминания и включение таких определений в настоящий документ не должно обязательно рассматриваться как представляющее значительное отличие от того, что обычно понимается в данной области.

[0675] Как используется в настоящем документе, “субъект” представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное и, как правило, представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, субъект, например, пациент, которому вводятся иммуномодулирующие полипептиды, генно-инженерные клетки или композиции, представляет собой млекопитающее, как правило, примата, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления, примат представляет собой обезьяну или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужского пола или женского пола и может иметь любой соответствующий возраст, включая ребенка, подростка, юношу или девушку, взрослого и гериатрического субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой млекопитающее отличное от примата, такое как грызун.

[0676] Как используется в настоящем документе, “лечение” (и его грамматические варианты такие как “лечить” или “леченый”) относится к полному или частичному ослаблению, или сокращению заболевания или состояния, или расстройства или симптома, отрицательного воздействия или результата, или фенотипа, ассоциированного с ними. Желаемые воздействия лечения включают, но, не ограничиваясь этим, предотвращение появления или возобновления заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последовательностей заболевания, предотвращение метастаз, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, ослабление или временное облегчение болезненного состояния и ремиссии или улучшения прогноза. Эти термины не предполагают полного излечения заболевания или полного устранения любого симптома или воздействия (воздействий) всех симптомов или результатов.

[0677] Как используется в настоящем документе, “замедление развития заболевания” означает задержку, затруднение, замедление, затормаживание, стабилизацию, подавление и/или прекращение развития заболевания (такого как рак). Это замедление может иметь различную продолжительность в зависимости от истории заболевания и/или от индивидуума, которого лечат. Как очевидно, достаточное или значительное замедление может в результате охватывать предотвращение, когда у индивидуума не развивается заболевание. Например, можно замедлить запущенный рак, например, развитие метастаз.

[0678] “Предотвращение”, как используется в настоящем документе, включает обеспечение профилактики относительно возникновения или возобновления заболевания у субъекта, который может быть предположенным к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностируется. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые клетки и композиции используют для замедления развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

[0679] Как используется в настоящем документе, “подавление” функции или активности представляет собой сокращение функции или активности, по сравнению с такими же в остальных условиях за исключением состояния или параметра, представляющего интерес, или альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, которые подавляют рост опухоли, уменьшают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

[0680] “Эффективное количество” агента, например, фармацевтического препарата, клеток или композиции, в контексте введения, относится к количеству эффективному при дозах/количествах и в течение периодов времени необходимого для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

[0681] “Терапевтически эффективное количество” агента, например, фармацевтического препарата или генно-инженерных клеток, относится к количеству, эффективному при дозах и в течение периодов времени необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, такого как лечение заболевания, состояния или расстройства, и/или фармакокинетического или фармакодинамического воздействия лечения. Терапевтически эффективное количество может изменяться в соответствии с такими факторами, как болезненное состояние, возраст, пол и масса субъекта, и в зависимости от вводимых иммуномодулирующих полипептидов или генно-инженерных клеток. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают введение иммуномодулирующих полипептидов, генно-инженерных клеток или композиций при эффективных количествах, например, в терапевтически эффективных количествах.

[0682] “Профилактически эффективное количество” относится к количеству эффективному при дозах и в течение периодов времени необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но, не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют для субъектов до ранней стадии заболевания или на ней, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

[0683] Термин “фармацевтический препарат” относится к препарату, который имеет такую форму, чтобы сделать возможной биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в нем, чтобы она была эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому препарат вводился бы.

[0684] “Фармацевтически приемлемый носитель” относится к ингредиенту в фармацевтическом препарате иному, чем активный ингредиент, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничиваясь этим, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант.

[0685] Как используется в настоящем документе, упоминание того, что нуклеотиды или положения аминокислот “соответствуют” нуклеотидам или положениям аминокислот в описанной последовательности, такой как приведено в Списке последовательностей, относится к нуклеотидам или положениям аминокислот, идентифицируемым при выравнивании с описанной последовательностью для доведения до максимума идентичности, используя стандартный алгоритм выравнивания, такой как алгоритм GAP. Посредством выравнивания последовательностей можно идентифицировать соответствующие остатки, например, используя как ориентиры консервативные и идентичные остатки аминокислот. Как правило, для идентификации соответствующих положений, последовательности аминокислот выравнивают так, чтобы получился наивысший порядок соответствия (смотри, например: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

[0686] Термин “вектор”, как используется в настоящем документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки хозяина, в которую он вводится. Определенные векторы могут направлять экспрессирование нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как “векторы экспрессии”. Среди векторов имеются вирусные векторы, такие как ретровирусные, например, гаммаретровирусные и лентивирусные векторы.

[0687] Термины “клетка хозяин”, “линия клеток хозяев” и “культура клеток хозяев” используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые вводят экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомство таких клеток. Клетки хозяева включают “трансформанты” и “трансформированные клетки,” которые включают первичную трансформированную клетку и потомство, полученное от нее, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых

кислот в родительской клетке, но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое имеет такую же функцию или биологическую активность, как получено посредством скрининга или селекции исходно трансформированной клетки, включается в настоящий документ.

[0688] Как используется в настоящем документе, утверждение, что клетка или популяция клеток является “позитивной” относительно конкретного маркера, относится к детектируемому присутствию на клетке или в ней конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При упоминании поверхностного маркера, термин относится к присутствию поверхностного экспрессирования как детектируется с помощью проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфично связывается с маркером, и детектирования указанного антитела, где окрашивание может детектироваться с помощью проточной цитометрии при уровне существенно выше окрашивания, детектируемого при осуществлении такой же процедуры с совпадающим по изотипу контролем, при идентичных в остальном условиях и/или при уровне, по существу, сходным с уровнем для клеток, как известно, позитивных относительно этого маркера, и/или при уровне существенно более высоком, чем для клеток, как известно, негативных относительно этих маркеров.

[0689] Как используется в настоящем документе, утверждение, что клетка или популяция клеток является “негативной” относительно конкретного маркера, относится к отсутствию существенного детектируемого присутствия на клетке или в ней конкретного маркера, как правило, поверхностного маркера. При упоминании поверхностного маркера, термин относится к отсутствию поверхностного экспрессирования, как детектируется с помощью проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфично связывается с маркером, и детектирования указанного антитела, где окрашивание не детектируется с помощью проточной цитометрии при уровне, существенно превышающем окрашивание, детектируемое при осуществлении такой же процедуры с совпадающим по изотипу контролем при идентичных в остальном условиях, и/или при уровне существенно ниже, чем для клеток, как известно, позитивных относительно этого маркера и/или при уровне по существу сходном с уровнем для клетки, как известно негативной, для этого маркера.

[0690] Замещение аминокислоты может включать замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Замещение может представлять собой консервативное замещение аминокислот или неконсервативное замещение аминокислот. Замещения аминокислот могут вводиться в связывающую молекулу, например, антитело, представляющее интерес, и в продукты, просматриваемые на желаемую активность, *например*, на сохранение/улучшение связывания антигенов, пониженную иммуногенность или улучшение ADCC или CDC.

[0691] Аминокислоты, в целом, могут группироваться согласно следующим общим свойствам боковых цепей:

[0692] (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0693] (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0694] (3) кислотные: Asp, Glu;

[0695] (4) основные: His, Lys, Arg;

[0696] (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепей: Gly, Pro;

[0697] (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0698] В некоторых вариантах осуществления, консервативные замещения могут включать замену элемента одного из этих классов вместо другого элемента этого класса. В некоторых вариантах осуществления, неконсервативные замещения аминокислот могут включать замену элемента одного из этих классов вместо другого класса.

[0699] Как используется в настоящем документе, “процент (%) идентичности последовательности аминокислот и “процент идентичности”, когда используется относительно последовательности аминокислот (референтной последовательности полипептидов), определяется как процент остатков аминокислот в последовательности кандидате (например, в антителе субъекта или его фрагменте), которые идентичны остаткам аминокислот в референтной последовательности полипептида, после выравнивая последовательностей и введения разрывов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и не рассматривая никакие консервативные замещения как часть идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения процента идентичности последовательности аминокислот может реализоваться различными путями, например, с использованием публично доступного компьютерного программного обеспечение, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Можно определить соответствующие параметры для выравнивания последовательности, включая любые алгоритмы необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0700] Как используется в настоящем документе, формы единственного включают упоминание множественного числа, если контекст четко не диктует иного. Например, “один” означает “по меньшей мере, один” или “один или несколько”. Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем документе, включают “включающий” и/или “состоящий по существу из” аспектов и вариантов.

[0701] В настоящем описании, различные аспекты заявляемого предмета изобретения представлены в формате диапазонов. Необходимо понять, что описание в формате диапазонов осуществляется только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как негибкие ограничения на рамки заявляемого предмета изобретения. Соответственно, описание диапазона должно рассматриваться как содержащее конкретно описанные всевозможные поддиапазоны, а также индивидуальные численные значения в этих диапазонах. Например, когда приводится некоторый диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределами этого диапазона и любое другое сформулированное или промежуточное значение в этом описанном диапазоне охватывается заявляемым предметом изобретения. Верхние и нижние пределы

этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны и также охватываются заявляемым предметом изобретения, они относятся к любому конкретно исключенному пределу в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба этих предела, диапазоны, за исключением одного или обоих этих включенных пределов, также включаются в заявляемый предмет изобретения. Это применимо независимо от ширины диапазона.

[0702] Термин “примерно” как используется в настоящем документе, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующий величины известному в данной технической области. Упоминание “примерного” значения или параметра в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или на параметр сам по себе. Например, описание, относящееся к “примерно X”, включает описание “X”.

[0703] Как используется в настоящем документе, композиция относится к любой из смесей двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водную, неводную, или любую их комбинацию.

## VII. ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0704] Среди предлагаемых вариантов осуществления имеются:

1. Способ сохранения активности Т-клеток, способ включает экспонирование Т-клеток из множества, имеющего фенотип истощения, для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3).

2. Способ по варианту осуществления 1, где одна или несколько Т-клеток содержат Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, который специфично связывается с целевым антигеном.

3. Способ для повышения активности Т-клеток или сильнодействия и предотвращения или ингибирования, уменьшения или замедления начала истощения Т-клеток, способ включает экспонирование Т-клеток из множества клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где, по меньшей мере, часть экспонирования осуществляется при условиях, которые индуцируют или могут индуцировать фенотип истощения у Т-клеток из этого множества в отсутствие соединения.

4. Способ по варианту осуществления 3, где условия включают стимулирующие условия для Т-клеток, необязательно включающие экспонирование, по меньшей мере, для одного стимулирующего агента для Т-клеток, который может стимулировать сигнал у Т-клеток из этого множества, указанный сигнал необязательно включает первичный и/или костимулирующий сигнал.

5. Способ по варианту осуществления 4, где условия включают постоянное, повторяющееся, пролонгированное или продолжительное экспонирование, по меньшей мере, для одного стимулирующего агента для Т-клеток.

6. Способ по варианту осуществления 4 или варианту осуществления 5, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит поликлональный агент, антиген, специфично распознающийся рецептором, экспрессируемым на Т-клетках из этого множества, или агент, который связывается рецептором антигена, экспрессируемым Т-клетками из этого множества.

7. Способ по варианту осуществления 4-6, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или содержит РМА и иономицин или представляет собой или содержит агонист рецептора Т-клеток или комплекс агониста рецептора Т-клеток.

8. Способ по варианту осуществления 7, где агент специфично связывается с элементом комплекса TCR, где агент необязательно специфично связывается с CD3, необязательно, CD3 зета.

9. Способ по варианту осуществления 8, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит антитело анти-CD3.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 4-9, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток специфично связывает костимулирующую молекулу Т-клетки, где костимулирующая молекула Т-клетки необязательно представляет собой CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, CD40L или ICOS или, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток дополнительно содержит агент, который специфично связывает костимулирующую молекулу Т-клетки, где костимулирующая молекула Т-клетки необязательно представляет собой CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, CD40L или ICOS.

11. Способ по варианту осуществления 10, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит антитело анти-CD28.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 4-11, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит или дополнительно содержит комплекс МНС-пептид, распознаваемый рецептором антигена, экспрессируемым одной или несколькими Т-клетками из этого множества, или антиген, распознаваемый рецептором антигена, экспрессируемым одной или несколькими Т-клетками из этого множества.

13. Способ по любому из вариантов осуществления 3-12, где одна или несколько Т-клеток из множества экспрессирует рекомбинантный рецептор антигена, который связывает целевой антиген.

14. Способ по варианту осуществления 13, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток связывается с рекомбинантным рецептором антигена.

15. Способ по варианту осуществления 14, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или содержит целевой антиген или его часть, распознающуюся или связываемую рекомбинантным рецептором антигена, и/или, где условия включают экспонирование для целевого антигена.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 13-15, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой рекомбинантный рецептор Т-клеток (TCR).

17. Способ по любому из вариантов осуществления 13-16, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, где одна или несколько Т-клеток представляют собой первичные Т-клетки человека, необязательно, от субъекта.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, где экспонирование осуществляется *ex vivo*.

20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, где экспонирование осуществляется *in vivo* и:

указанное экспонирование включает введение соединения субъекту, где Т-клетки необязательно происходят от субъекта, где введение соединения осуществляется указанному субъекту; и/или

указанное экспонирование включает введение указанного множества Т-клеток субъекту, где Т-клетки необязательно происходят от субъекта, где введение соединения осуществляется указанному субъекту.

21. Способ по варианту осуществления 20, где

указанное экспонирование включает указанное введение указанного соединения и где перед экспонированием указанному субъекту вводят композицию, содержащую множество Т-клеток субъекта, для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием; или

указанное экспонирование включает введение указанных Т-клеток указанному субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием, где перед экспонированием указанному субъекту вводится указанное соединение; или

указанное экспонирование включает введение указанных Т-клеток указанному субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием, и включает введение указанного соединения указанному субъекту.

22. Способ лечения, способ включает введение субъекту иммуномодулирующего соединения, где указанное иммуномодулирующее соединение выбрано из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1);

ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где (а) указанному субъекту перед введением соединения вводится Т-клеточная терапия, включающая дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывает целевой антиген, или (b) перед введением указанного соединения или во время него, указанный субъект или образец крови от этого субъекта содержит или, как подтверждено, содержит одну или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена,

где во время введения соединения:

(i) одна или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта имеют фенотип истощения;

(ii) одна или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта, как определено, имеет фенотип истощения;

(iii) фенотип истощения одной или нескольких Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или маркер, или индикаторный параметр, детектируется или измеряется у субъекта или в биологическом образце от субъекта;

(iv) по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40% или, по меньшей мере, или примерно 50% от всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в биологическом образце от субъекта имеют фенотип истощения; и/или

(v) примерно или больше 10%, примерно или больше 20%, примерно или больше 30%, примерно или больше 40% или примерно или больше 50% Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в биологическом образце от субъекта имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеющих фенотип истощения, в сравнимом биологическом образце в предыдущей временной точке.

23. Способ лечения, способ включает:

(а) выбор субъекта в качестве кандидата для введения иммуномодулирующего соединения, указанный выбранный субъект имеет истощенные Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; и

(b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, где иммуномодулирующее соединение выбрано из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблон (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3).

24. Способ по варианту осуществления 23, где ткань, опухоль, биологическая жидкость или биологический образец указанного выбранного субъекта или от него:

(i) содержит одну или несколько Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, и которые имеют фенотип истощения;

(ii) содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где, по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40%, по меньшей мере, или примерно 50%, по меньшей мере, или примерно 60%, по меньшей мере, или примерно 70% или, по меньшей мере, или примерно 80% Т-клеток в указанной ткани, жидкости, опухоли или образце, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеют фенотип истощения; и/или

(iii) содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где примерно на 10% или около того, больше, где примерно на 20% или около того, больше, примерно на 30% или около того, больше, примерно на 40% или около того, больше или примерно на 50% или около того, больше, или более чем в 2 раза больше, или более чем в 3 раза больше или более чем в 5 раз больше или более чем в 10 раз больше Т-клеток в ткани, опухоли, жидкости или образце выбранного субъекта или от который экспрессирует рекомбинантный рецептор антигена, имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом или количеством Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта или в сравнимой жидкости, ткани, опухоли или образце от него в более ранней временной точке имеет указанный фенотип истощения.

25. Способ по варианту осуществления 23, где указанный выбор указанного субъекта включает определение того или основан на определении того, что ткань, опухоль, биологическая жидкость или биологический образец указанного выбранного субъекта или от него:

(i) содержит одну или несколько Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, и которые имеют фенотип истощения;

(ii) содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где, по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40%, по меньшей мере, или примерно 50%, по меньшей мере, или примерно 60%, по меньшей мере, или примерно 70% или, по меньшей мере, или примерно 80% Т-клеток в указанной ткани, жидкости, опухоли или образце, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеют фенотип истощения; и/или

(iii) содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где примерно на 10% или около того, больше, где примерно на 20% или около того, больше, примерно на 30% или около того, больше, примерно на 40% или около того, больше или примерно на 50% или около того, больше, или более чем в 2 раза больше или более чем в 3 раза больше или более

чем в 5 раз больше или более чем в 10 раз больше Т-клеток в ткани, опухоли, жидкости или образце у выбранного субъекта или от него экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом или количеством Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта или в сравнимой жидкости, ткани, опухоли или образце от него в более ранней временной точке имеет указанный фенотип истощения.

26. Способ по варианту осуществления 24 или варианту осуществления 25, где, перед указанным введением соединения, указанному субъекту вводится множество Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и где, необязательно, указанная более ранняя временная точка находится после точки введения Т-клеток и перед указанным выбором.

27. Способ по варианту осуществления 24 или варианту осуществления 25 или варианту осуществления 26, где предыдущая временная точка представляет собой момент времени:

после введения Т-клеток, экспрессирующих указанный рекомбинантный рецептор, указанному выбранному субъекту и находится на пике или на максимальном уровне, или перед ним, для Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, детектируемых в крови субъекта;

в диапазоне 1 дня, 2 дня, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 день, 12 дня, 13 дней, 14 дней или более до указанного определения или выбора.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 23-27, где:

во время введения Т-клеточной терапии субъект имеет заболевание или состояние;

во время введения Т-клеточной терапии и во время введения соединения субъект имеет заболевание или состояние;

во время введения Т-клеточной терапии субъект имеет заболевание или состояние и во время введения соединения заболевание или состояние возобновляется, или прогрессирует или считается не реагирующим на указанное соединение у субъекта после введения Т-клеточной терапии.

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-28, где фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает:

повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток, или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или

понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях.

30. Способ по варианту осуществления 29, где повышение уровня, степени или процента больше, чем в 1,2 раза или около того, больше, чем в 1,5 раза или около того, больше, чем в 2,0 раза или около того, больше, чем в 3 раза или около того, больше, чем в 4 раза или около того, больше, чем в 5 раз или около того, больше, чем в 6 раз или около того, больше, чем в 7 раз или около того, больше, чем в 8 раз или около того, больше, чем в 9 раз или около того, больше, чем в 10 раз или около того или более.

31. Способ по варианту осуществления 29, где происходит уменьшение уровня, степени или процента больше, чем в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 29-31, где референтная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, как известно, имеющих фенотип без истощения, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно, от одного и того же субъекта или из такого же вида, что и субъект, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 29-32, где референтная популяция Т-клеток (а) представляет собой популяцию, соответствующую одному субъекту, содержащую Т-клетки из основного объема, выделенные из крови субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, необязательно, где Т-клетки из основного объема не экспрессируют рекомбинантный рецептор, и/или (b) получается от субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, до введения дозы Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 29-32, где референтная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, перед их введением субъекту, необязательно, где композиция представляет собой криоконсервированный образец.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 29-34, где один или несколько из одного или нескольких маркеров истощения представляет собой ингибиторный рецептор.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 29-35, где один или несколько из одного или нескольких маркеров истощения выбирают из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VISTA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

37. Способ по любому из вариантов осуществления 29-36, где активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продуцирования одного воспалительного цитокина или их комбинации, необязательно,

где один цитокин или их комбинацию выбирают из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 29-37, где экспонирование для указанного антигена или агента специфичного к рецептору антигена включает инкубирование вместе с агентом или агентом специфичным к рецептору антигена, необязательно, с агентом, который связывает рекомбинантный рецептор, где указанный антиген необязательно представляет собой целевой антиген.

39. Способ по варианту осуществления 38, где антиген или агент специфичный к рецептору антигена содержит целевые клетки, экспрессирующие антиген, необязательно, клетки указанного заболевания, расстройства или состояния.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 2 и 13-36, где целевой антиген ассоциируется, является специфичным к ним и/или экспрессируется на клетке или ткани, **заболевании**, расстройстве или состоянии.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 2 и 13-40, где целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 2 и 13-41, где целевой антиген выбирают из интегрина  $\alpha\upsilon\beta 6$  (интегрин  $\alpha\upsilon\beta 6$ ), В-клеточного антигена созревания (BCMA), BAFF-R, B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичка, раково-тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинового мотива C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, CS-1, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc-подобного рецептору 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), белка связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептора альфа фолиевой кислоты, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного антигена человека, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, антигена лейкоцитов человека A1 (HLA-A1), антигена лейкоцитов человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора домена вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, обогащенного повторами лейцинов элемента А семейства 8 (LRRC8A), антигена Leу, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мышинных (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов элемента D группы 2 природных киллеров

(NKG2D), мелана А (MART-1), нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простато-специфичного антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичного мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора 1 подобного рецептору тирозинкиназы (ROR1), сурвивина TACI, гликопротеина трофобластов (TPBG, также известного как 5T4), гликопротеина 72, ассоциированного с опухолью (TAG72), белка 1 родственного тирозинкиназе (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), белка 2 родственного тирозинкиназе (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоли Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичного или патоген-экспрессируемого антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул экспрессируемых ВИЧ, вирусом гепатита С, вирусом гепатита В или другими патогенами.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 1-42, где заболевание или состояние представляет собой В-клеточную неоплазию или неоплазию, связанную с В клетками.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где целевой антиген представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-44, где целевой антиген представляет собой CD19.

46. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где заболевание или состояние представляет собой множественную миелому.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43 и 46, где целевой антиген представляет собой BCMA, элемент D группы 5 класса С рецепторов, связанных с G белком (GPC5D), CD38 (циклическую ADP рибозагидролазу), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, подмножество 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI или FcRH5.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, 46 и 47, где целевой антиген представляет собой BCMA.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 22-48, где биологический образец представляет собой образец крови.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 22-49, где биологический образец представляет собой образец опухоли, необязательно, образец от биопсии опухоли.

51. Способ лечения, способ включает (а) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и (b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют

и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), тем самым, после указанного введения указанной терапии и указанного соединения, индикаторный фактор размножения или активности Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и индикаторный фактор продолжительности ответа увеличиваются по сравнению с референтным способом, где:

референтный способ включает введение в (а), сам по себе или введение в (а) без введение иммуномодулирующего соединения;

индикаторный фактор размножения или активности содержит (i) меру максимального количества Т-клеток, наблюдаемого в крови или раковом заболевании субъекта после указанного введения, (ii) количество дней, прошедших между указанным введением и достижением указанного максимального количества Т-клеток в крови или раковом заболевании субъекта, или (iii) площадь под кривой (AUC) количества CAR-экспрессирующих клеток в зависимости от времени, (iv) степень ответа у субъекта.

52. Способ по варианту осуществления 51, где мера продолжительности ответа представляет собой время выживаемости без прогрессирования заболевания, выживания или продолжительности наилучшего ответа.

53. Способ по варианту осуществления 51 или вариант осуществления 52, где референтный способ включает введение IL-2.

54. Способ лечения, способ включает:

(а) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при количестве, продолжительности и/или с частотой введения эффективной для:

(1) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена наивных или неистощенных Т-клеток, у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(2) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-

клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(3) инвертирования фенотипа истощения у истощенных Т-клеток, необязательно, включающих Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанному субъекту.

55. Способ по варианту осуществления 54, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и/или для инвертирования указанного фенотипа истощения.

56. Способ по варианту осуществления 55, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения.

57. Способ по варианту осуществления 54, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения.

58. Способ лечения, способ включает:

(a) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с церебллоном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при количестве, продолжительности и/или с частотой введения эффективной для:

(1) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена наивных или неистощенных Т-клеток, у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(2) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-

клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(3) инвертирования фенотипа истощения у истощенных Т-клеток, необязательно, включающих Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного субъекта.

59. Способ по варианту осуществления 58, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и/или для инвертирования указанного фенотипа истощения.

60. Способ по варианту осуществления 59, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения.

61. Способ по варианту осуществления 58, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения.

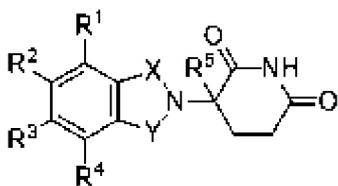
62. Способ по любому из вариантов осуществления 20-61, где иммуномодулирующее соединение вводится в эффективном количестве от или примерно от 1 мг до 50 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 1 мг до 25 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 1 мг до 10 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 1 мг до 5 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 5 мг до 50 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 5 мг до 25 мг в день, когда оно вводится, от или примерно от 5 мг до 10 мг в день, когда оно вводится.

63. Способ по любому варианту осуществления 20-62, где введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения (i) ежедневно в течение периода нескольких недель, (ii) ежедневно в течение не более чем 6 дней в неделю в течение периода нескольких недель, (ii) ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель; или ежедневно в течение не более чем 4 дней в неделю в течение периода нескольких недель.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 20-63, где введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель.

65. Способ по любому из вариантов осуществления 1-64, где соединение обедняет или деградирует Ikaros (IKZF1).

66. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, где соединение представляет собой соединение следующей структуры:



где

один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляют собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>-;

(1) каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкокси или 1 to 4 атомов углерода или

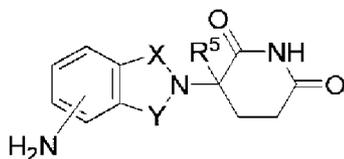
(2) один из R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> представляет собой -NHR<sup>a</sup>, а оставшиеся R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляют собой водород, где R<sup>a</sup> представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода;

R<sup>5</sup> представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода, бензил или галоген;

при условии, что R<sup>5</sup> является иным, чем водород, если X и Y представляют собой -C(O)- и (i) каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляет собой фтор; или (ii) один из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляет собой амино;

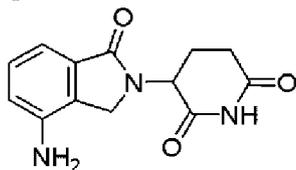
или их фармацевтически приемлемую соль.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 1-66, где соединение представляет собой соединение следующей структуры:



где один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляет собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>- и R<sup>5</sup> представляет собой водород или низший алкил или их фармацевтически приемлемую соль.

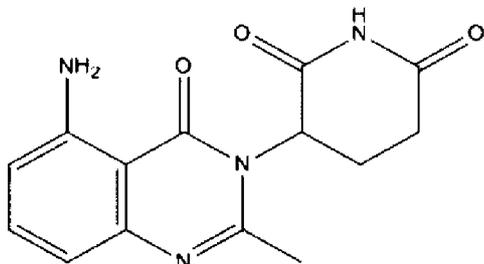
68. Способ по любому из вариантов осуществления 1-67, где соединение, которое представляет собой или содержит 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 1-68, где соединение представляет собой 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион.

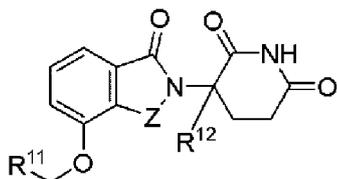
70. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, где соединение представляет собой соединение, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65 и 70, где соединение представляет собой 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, где соединение представляет собой соединение следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер, где:

Z представляет собой C=O или CH<sub>2</sub>;

R<sup>11</sup> представляет собой Z<sup>1</sup>-R<sup>13</sup>;

R<sup>12</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил;

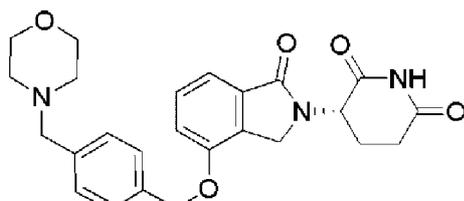
Z<sup>1</sup> представляет собой 6-10 - членный арил, гетероарил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или связь;

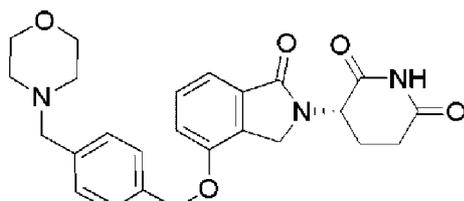
R<sup>13</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-арил, где арил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами; самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероцикл, где гетероцикл необязательно является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по

себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероарил, где гетероарил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано, гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; и

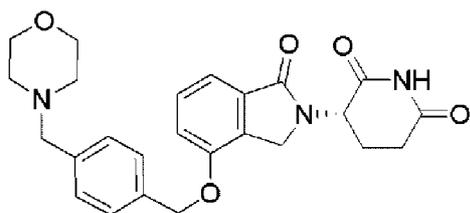
n равно 0, 1, 2 или 3.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65 и 72, где соединение

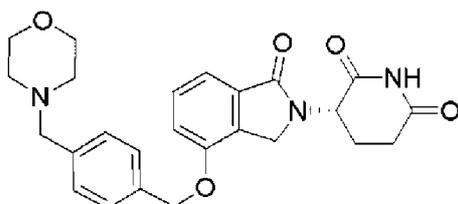


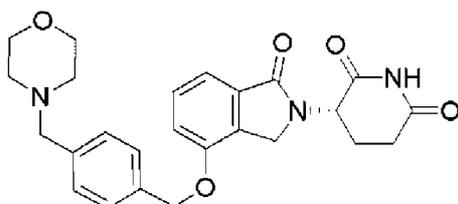
представляет собой , или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, 72 и 73, где соединение представляет собой Форму А кристаллической формы гидрохлоридной соли



75. Способ по варианту осуществления 74, где картина XRPD Формы А



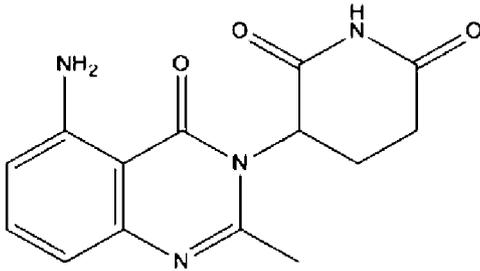
гидрохлоридной соли  характеризуется пиками, расположенными при 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или во всех следующих или в следующих примерных положениях: 9,69, 12,82, 15,09, 15,94, 16,76, 17,65,

19,44, 19,80, 2230, 22,47, 22,95, 23,02, 24,29, 24,48, 24,70, 26,27, 26,77, 27,60, 29,43, 29,72 и 32,91 градуса 2 $\Theta$ .

76. Способ лечения, способ включает:

(а) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему рак, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(b) введение субъекту соединения, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



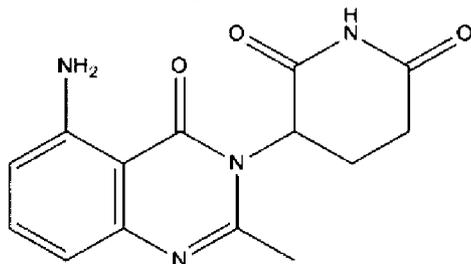
или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф, где введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель,

77. Способ по любому из вариантов осуществления 20-76, где введение соединения начинается после начала введения Т-клеточной терапии.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 51-76, где введение соединения начинается одновременно с Т-клеточной терапией и/или начинается в пределах одного дня до или после начала введения Т-клеточной терапии.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 51-78, где введение соединения начинается за или примерно за один день или в пределах одного или примерно одного дня до или после начала введения Т-клеточной терапии.

80. Способ лечения, способ включает введение субъекту, имеющему рак, соединения, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф, указанному субъекту

вводят до введения соединения Т-клеточную терапию, содержащую дозу генно-инженерных Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, где введение соединения осуществляется в циклическом режиме, включающем введение эффективного количества соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю в течение периода нескольких недель.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 51-80, где раковое заболевание представляет собой В-клеточную неоплазию, неоплазию, связанную с В клетками, не гематологический рак или плотную опухоль.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 51-81, где целевой антиген представляет собой опухолевый антиген, где целевой антиген необязательно ассоциируется, является специфичным к ним и/или экспрессируется на клетке или ткани рака,

83. Способ по любому из вариантов осуществления 51-82, где целевой антиген выбран из В-клеточного антигена созревания (BCMA), интегрина  $\alpha\nu\beta 6$  (интегрин  $\alpha\nu\beta 6$ ), BAFF-R, B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичка, раково-тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинового мотива C-C (CCL-1), CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD30, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD138, CD171, CS-1, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc-подобного рецептора 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), белка связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептора альфа фолиевой кислоты, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного антигена человека, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, антигена лейкоцитов человека A1 (HLA-A1), антигена лейкоцитов человека A2 (HLA-A2), Ig-каппа, Ig-лямбда, рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha 2$ ), рецептора домена вставки киназы (kdr), молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, обогащенного повторами лейцинов элемента A семейства 8 (LRRC8A), антигена Ley, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мышинных (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелана A (MART-1), нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы

(PRAME), рецептора прогестерона, простато-специфичного антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичного мембранного антигена (PSMA), ROR1, сурвивина TACI, гликопротеина трофобластов (TPBG, также известного как 5T4), гликопротеина 72, ассоциированного с опухолью (TAG72), белка 1 родственного тирозинкиназе (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), белка 2 родственного тирозинкиназе (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоли Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичного или патоген-экспрессируемого антигена.

84. Способ по варианту осуществления 43, варианту осуществления 82 или варианту осуществления 83, где В-клеточная неоплазия представляет собой лимфому.

85. Способ по варианту осуществления 84, где лимфома представляет собой лимфому не-Ходжкина (NHL).

86. Способ по варианту осуществления 85, где NHL включает агрессивную NHL, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), DLBCL-NO, необязательно трансформированную медленно растущую В-клеточную лимфому; EBV-положительную DLBCL-NO; обогащенную Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточную лимфому; медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL); фолликулярную лимфому (FL), необязательно, фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В); и/или В-клеточную лимфому высокой степени с перегруппировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (двойное/тройное совпадение).

87. Способ по любому из вариантов осуществления 1-86, где субъект идентифицируется или был идентифицирован как имеющий статус Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG) меньший или равный 1.

88. Способ по любому 51-87, где целевой антиген представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

89. Способ по любому из вариантов осуществления 43-88, где целевой антиген представляет собой CD19.

90. Способ по любому из вариантов осуществления 51-87, где целевой антиген не представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

91. Способ по любому из вариантов осуществления 51-81, где рак представляет собой множественную миелому.

92. Способ по любому из вариантов осуществления 51-91, где целевой антиген представляет собой BCMA, элемент D группы 5 класса С рецепторов, связанных с G белком (GPCR5D), CD38 (циклическую ADP рибозагидролазу), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, подмножество 1 CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI или FcRH5.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 51-92, где целевой антиген представляет собой BCMA.

94. Способ по любому из вариантов осуществления 63-93, где период продолжается в течение трех месяцев или более после начала введения Т-клеточной терапии.

95. Способ по любому из вариантов осуществления 63-94, где эффективное количество составляет не более чем 4 мг в день или около того.

96. Способ по любому из вариантов осуществления 63-95, где эффективное количество находится в пределах между 1,0 мг или около того и 4 мг или около того в день.

97. Способ по любому из вариантов осуществления 63-94, где эффективное количество не больше или не больше примерно 3 мг в день.

98. Способ по любому из вариантов осуществления 63-94 и 97, где эффективное количество составляет между при или примерно 1,0 мг и при или примерно 3 мг.

99. Способ по любому из вариантов осуществления 63-94, где эффективное количество составляет не более чем 2,5 мг в день или около того.

100. Способ по любому из вариантов осуществления 63-99, где, в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, введение соединения включает введение соединения в каждый из не более 5 последовательных дней недели, за ними следует период покоя в течение остальных дней недели, когда соединение не вводится.

101. Способ по варианту осуществления 100, где не более 5 последовательных дней представляют собой 3 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 4 дня, когда соединение не вводится.

102. Способ по варианту осуществления 100, где не более 5 последовательных дней представляют собой 4 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 3 дня, когда соединение не вводится.

103. Способ по варианту осуществления 100, где не более 5 последовательных дней представляют собой 5 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 2 дня, когда соединение не вводится.

104. Способ по любому из вариантов осуществления 63-103, где период продолжается в течение или примерно в течение четырех месяцев или больше после начала введения Т-клеточной терапии.

105. Способ по любому из вариантов осуществления 63-104, где период продолжается в течение или примерно в течение пяти месяцев или больше после начала введения Т-клеточной терапии.

106. Способ по любому из вариантов осуществления 63-105, где период продолжается в течение или примерно в течение шести месяцев или больше после начала введения Т-клеточной терапии.

107. Способ по любому из вариантов осуществления 63-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 3 мг или около того.

108. Способ по любому из вариантов осуществления 63-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 2,5 мг или около того.

109. Способ по любому из вариантов осуществления 63-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 2 мг или около того.

110. Способ по любому из вариантов осуществления 63-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 1,5 мг или около того.

111. Способ по любому из вариантов осуществления 63-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 1 мг или около того в день.

112. Способ по любому из вариантов осуществления 63-111, где циклический режим прекращается в конце периода, если в конце этого периода субъект демонстрирует полный ответ (CR) после лечения.

113. Способ по любому из вариантов осуществления 63-112, где циклический режим прекращается в конце периода, если в конце этого периода рак прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения.

114. Способ по любому из вариантов осуществления 63-113, где период продолжается в течение от или примерно от трех месяцев до или примерно до шести месяцев.

115. Способ по любому из вариантов осуществления 63-114, где период продолжается в течение от или примерно от трех месяцев после начала введения Т-клеточной терапии.

116. Способ по любому из вариантов осуществления 63-114, где период продолжается в течение 3 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект реализует до прохождения 3 месяцев или около того полный ответ (CR) после лечения или рак прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения.

117. Способ по варианту осуществления 116, где период продолжается в течение 3 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект за 3 месяца реализует полный ответ (CR).

118. Способ по любому из вариантов осуществления 63-114, где период продолжается в течение шести месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

119. Способ по любому из вариантов осуществления 63-118, где период продолжается в течение 6 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект до прохождения 6 месяцев или около того реализует полный ответ (CR) после лечения или рак прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения.

120. Способ по варианту осуществления 119, где период продолжается в течение 6 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект за 6 месяцев реализует полный ответ (CR).

121. Способ по любому из вариантов осуществления 63-120, где циклический режим продолжается в течение этого периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до конца периода.

122. Способ по любому из вариантов осуществления 63-121, где субъект реализует полный ответ (CR) в течение периода введения и до конца периода введения.

123. Способ по любому из вариантов осуществления 63-111, 114, 115, 119, 121 и 122, дополнительно включающий продолжение циклического режима после окончания периода, если в конце этого периода субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD).

124. Способ по любому из вариантов осуществления 63-123, где циклический режим продолжается в течение более шести месяцев, если в течение шести месяцев или около того субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения.

125. Способ по варианту осуществления 123 или вариант осуществления 124, где циклический режим продолжается пока субъект не реализует полный ответ (CR) после лечения или пока рак не прогрессирует или не возобновляется после ремиссии после лечения.

126. Способ по любому из вариантов осуществления 63-125, где введение соединения начинается, когда в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии или после этого.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 20-126, где введение соединения начинается примерно через 14 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии.

128. Способ по любому из вариантов осуществления 20-127, где введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии.

129. Способ по любому из вариантов осуществления 20-128, где введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 28 дней после начала введения Т-клеточной терапии.

130. Способ по любому из вариантов осуществления 20-129, где введение соединения начинается через 21 день или около того, через 22 дня или около того, через 23 дня или около того, через 24 дня или около того, через 25 дней или около того, через 26 дней или около того, через 27 дней или около того, через 28 дней или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

131. Способ по любому из вариантов осуществления 20-130, где введение соединения начинается через 28 дней или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

132. Способ по любому из вариантов осуществления 20-131, где при начале введения соединения, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения Т-клеточной терапии.

133. Способ по варианту осуществления 132, где:

острая токсичность представляет собой острый синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно, степени 3 или выше, CRC пролонгированной степени 3 или выше или степени 4 или 5; и/или

острая токсичность представляет собой острую нейротоксичность, необязательно, степени 3 или выше, пролонгированной степени 3 или выше или нейротоксичность степени 4 или 5.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 20-133, где введение соединения временно прекращается и/или циклический режим модифицируется, если субъект демонстрирует токсичность после введения соединения, необязательно, гематологическую токсичность.

135. Способ по варианту осуществления 134, где токсичность выбрана из острой нейтропении, необязательно, фебрильной нейтропении, нейтропении пролонгированной степени 3 или выше.

136. Способ по варианту осуществления 134 или 135, где введение соединения возобновляют, когда субъект больше не демонстрирует токсичности.

137. Способ по варианту осуществления 136, где циклический режим модифицируется после возобновления введения соединения.

138. Способ по любому из вариантов осуществления 134-137, где модифицированный циклический режим включает введение уменьшенного количества соединения и/или уменьшение частоты введения соединения.

139. Способ по любому из вариантов осуществления 134-138, где модифицированный циклический режим включает введение уменьшенного количества соединения.

140. Способ по варианту осуществления 139, где доза соединения уменьшается и уменьшенное количество соединения находится в пределах между 1 мг или около того и 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю.

141. Способ по варианту осуществления 140, где уменьшенное количество составляет 1 мг или около того или 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю.

142. Способ по варианту осуществления 136, где циклический режим не модифицируется после возобновления введения соединения.

143. Способ по варианту осуществления 142, где циклический режим включает введение не более 2 мг или около того соединения ежедневно в течение не более 5 дней в неделю.

144. Способ по варианту осуществления 143, где циклический режим включает введение 1 мг или около того соединения ежедневно в течение не более 5 дней недель.

145. Способ по любому из вариантов осуществления 1-144, где соединение представляет собой или содержит сольват 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона.

146. Способ по любому из вариантов осуществления 1-144, где соединение представляет собой или содержит гидрат 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона.

147. Способ по любому из вариантов осуществления 1-144, где соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона.

148. Способ по любому из вариантов осуществления 1-144, где соединение представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион.

149. Способ по любому из вариантов осуществления 20-148, где соединение вводится перорально.

150. Способ по любому из вариантов осуществления 51-149, где введение соединения:

инвертирует фенотип истощения в Т-клетках, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта

предотвращает, ингибирует или замедляет появление фенотипа истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта

или понижает уровень или степень фенотипа истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта или

уменьшает процент, от общего количества Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта, клеток, имеющих фенотип истощения.

151. Способ по любому из вариантов осуществления 22-149, где начало введения соединения осуществляется после введения Т-клеточной терапии и после введения соединения или его начала, субъект демонстрирует восстановление или сохранение антиген- или опухоли-специфичной активности или функции Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта, необязательно, где указанное восстановление, сохранение и/или начало введения указанного соединения, осуществляется в момент времени после того, как Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, у субъекта или в крови субъекта продемонстрируют фенотип истощения.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 22-149, где введение соединения включает введение в количестве, при частоте и/или продолжительности эффективных для:

(а) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена наивных или неистощенных Т-клеток, у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(b) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(c) инвертирования фенотипа истощения у истощенных Т-клеток, необязательно, включающих Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанному субъекту.

153. Способ по варианту осуществления 152, где введение соединения включает введение в количестве, при частоте и/или продолжительности эффективных (i) для воздействия указанного повышения активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления указанного фенотипа истощения и/или инвертирования указанного фенотипа истощения.

154. Способ по вариантам осуществления 152 или 153, где Т-клетки у субъекта содержат Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, и/или указанный антиген представляет собой целевой антиген.

155. Способ по любому из вариантов осуществления 150-154, где фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает:

повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или

понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях.

156. Способ по варианту осуществления 155, где происходит повышение уровня, степени или процента больше, чем в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

157. Способ по варианту осуществления 155, где происходит уменьшение уровня, степени или процента больше, чем в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

158. Способ по любому из вариантов осуществления 155-157, где референтная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, как известно, имеющих

фенотип без истощения, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно, от одного и того же субъекта или из такого же вида, что и субъект, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения.

159. Способ по любому из вариантов осуществления 155-158,

где референтная популяция Т-клеток (а) представляет собой популяцию, соответствующую одному субъекту, содержащую Т-клетки из основного объема, выделенные из крови субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, необязательно, где Т-клетки из основного объема не экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или (b) получается от субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, до введения дозы Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

160. Способ по любому из вариантов осуществления 155-158,

где референтная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, перед их введением субъекту, необязательно, где композиция представляет собой криоконсервированный образец.

161. Способ по любому из вариантов осуществления 155-160, где один или несколько маркеров истощения представляют собой ингибиторный рецептор.

162. Способ по любому из вариантов осуществления 155-161, где один или несколько маркеров истощения выбираются из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

163. Способ по любому из вариантов осуществления 155-162, где активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продуцирования одного воспалительного цитокина или их комбинации, необязательно, где один цитокин или их комбинацию выбирают из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

164. Способ по любому из вариантов осуществления 155-163,

где экспонирование для указанного антигена или агента специфичного к рецептору антигена включает инкубирование вместе с агентом или агентом специфичным к рецептору антигена, необязательно, с агентом, который связывает рекомбинантный рецептор, где указанный антиген необязательно представляет собой целевой антиген.

165. Способ по варианту осуществления 164, где антиген или агент специфичный к рецептору антигена содержит целевые клетки, экспрессирующие антиген, необязательно, клетки указанного заболевания, расстройства или состояния.

166. Способ по любому из вариантов осуществления 2 и 13-165, где целевой антиген представляет собой антиген человека.

167. Способ по любому из вариантов осуществления 1-166, где субъект представляет собой человека.

168. Способ по любому из вариантов осуществления 1-167, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный рецептор антигена, который специфично связывает целевой антиген.

169. Способ по варианту осуществления 17 или вариант осуществления 168, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфично связывается с целевым антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

170. Способ по варианту осуществления 169, где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен цепи CD3-зета (CD3 $\zeta$ ), необязательно, цепи CD3-зета человека.

171. Способ по варианту осуществления 169 или варианту осуществления 170, где химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

172. Способ по варианту осуществления 171, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен CD28 или 4-1BB, необязательно, CD28 человека или 4-1BB человека.

173. Способ по варианту осуществления 171 или вариант осуществления 172, где костимулирующий домен представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB человека.

174. Способ по любому из вариантов осуществления 17 и 168-173, где:

CAR содержит scFv специфичный к целевому антигену; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит 4-1BB, необязательно, 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен CD3 зета, необязательно, сигнальный домен CD3 зета человека; и где, необязательно, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv;

CAR содержит, по порядку, scFv специфичный к целевому антигену; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB, необязательно, сигнальный домен 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой сигнальный домен CD3 зета, необязательно, сигнальный домен CD3 зета человека; или

CAR содержит, по порядку, scFv специфичный к целевому антигену; спейсер; трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой сигнальный домен 4-1BB и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой или

содержит сигнальный домен CD3 зета.

175. Способ по любому из вариантов осуществления 21-174, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, в каждом случае, включительно.

176. Способ по любому из вариантов осуществления 21-175, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток.

177. Способ по любому из вариантов осуществления 21-176, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит  $5 \times 10^7$  или около того CAR-экспрессирующих клеток, в целом.

178. Способ по любому из вариантов осуществления 21-177, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит  $1 \times 10^8$  или около того CAR-экспрессирующих клеток.

179. Способ по любому из вариантов осуществления 21-178, где доза клеток вводится парентерально, необязательно, внутривенно.

180. Способ по любому из вариантов осуществления 21-179, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

181. Способ по любому из вариантов осуществления 21-180, где Т-клетки являются аутологичными для субъекта.

182. Способ по любому из вариантов осуществления 21-180, где Т-клетки являются аллогенными для субъекта.

183. Способ по любому из вариантов осуществления 21-182, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит Т-клетки CD4+, экспрессирующие CAR, и Т-клетки CD8+, экспрессирующие CAR, и введение дозы включает введение множества отдельных композиций, указанное множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую один вид из Т-клеток CD4+ и Т-клеток CD8+, и вторую композицию, содержащую другой вид клеток из Т-клеток CD4+ или Т-клеток CD8+.

184. Способ по любому из вариантов осуществления 21-183, где, перед введением, субъект предварительно кондиционируется с помощью противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфамида.

185. Способ по любому из вариантов осуществления 21-184, дополнительно включающий введение субъекту противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфамида, непосредственно перед введением.

186. Способ по варианту осуществления 184 или варианту осуществления 185, где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида, примерно  $200-400 \text{ мг/м}^2$ , необязательно  $300 \text{ мг/м}^2$  или около того, включительно, и/или флударабина, примерно  $20-40 \text{ мг/м}^2$ , необязательно  $30 \text{ мг/м}^2$ , ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней или, где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида, примерно  $500 \text{ мг/м}^2$ .

187. Способ по любому из вариантов осуществления 184-186, где:

противолимфомная терапия включает введение  $300 \text{ мг/м}^2$  циклофосфамида или около того и  $30 \text{ мг/м}^2$  флударабина, ежедневно в течение 3 дней; и/или

противолимфомная терапия включает введение  $500 \text{ мг/м}^2$  циклофосфамида или около того и  $30 \text{ мг/м}^2$  флударабина или около того ежедневно в течение 3 дней.

188. Способ по любому из вариантов осуществления 20-187, где:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, леченых согласно настоящему способу, реализуют полный ответ (CR), который является стойким, или он является стойким, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих CR, в течение 6 месяцев или больше или в течение 9 месяцев или больше; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих CR в течение 6 месяцев, сохраняют ответ, сохраняют CR, и/или проживают или проживают без прогрессирования, 3 месяца или больше и/или в течение 6 месяцев или больше и/или в течение девяти месяцев или больше; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 70% субъектов, леченых согласно настоящему способу, реализуют объективный ответ (OR), где OR необязательно является стойким или он является стойким, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих, в течение 6 месяцев или больше или в течение 9 месяцев или больше; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих (OR) в течение 6 месяцев, сохраняют ответ или проживают 3 месяца или больше и/или 6 месяцев или больше.

189. Набор, содержащий:

(а) Т-клеточную терапию, содержащую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(б) иммуномодулирующее соединение, выбранное из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют

и/или связываются с цереблонеом (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3); и

(с) инструкции для введения соединения и/или Т-клеточной терапии согласно способам по любому из вариантов осуществления 1-187.

### VIII. ПРИМЕРЫ

[0705] Следующие далее примеры включаются только для целей иллюстрации и не предназначены для ограничения рамок изобретения

**Пример 1** Цитолитическая активность и продуцирование цитокинов CAR-T-клетками анти-BCMA после инкубирования вместе с BCMA-экспрессирующими линиями целевых клеток в присутствии или в отсутствие леналидомида

[0706] Т-клетки выделяют на основе обогащения с помощью иммунного сродства из образцов лейкофереза от здоровых доноров. Выделенные клетки трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим один из различных иллюстративных CAR анти-BCMA. Каждый CAR анти-BCMA содержит scFv анти-BCMA человека, спейсерную область, трансмембранный домен CD28, полученную из 4-1BB внутриклеточную сигнальную последовательность и полученный из CD3-зета внутриклеточный сигнальный домен. Затем конструкция вирусного вектора кодирует усеченный EGFR (EGFRt), который служит как суррогатный маркер для экспрессирования CAR; EGFRt-кодирующая область отделена от последовательности CAR последовательностью проскока T2A. После трансдуцирования, клетки размножают и полученные в результате композиции замораживают посредством криоконсервирования.

[0707] Замороженные с помощью крионики CAR Т-клетки анти-BCMA оттаивают и оценивают на различные ответы после совместного культивирования с BCMA-экспрессирующими целевыми клетками в присутствии или в отсутствие леналидомида. Анализы *in vitro* для оценки уничтожения целевых клеток и продуцирования цитокинов осуществляют с использованием двух различных линий BCMA-экспрессирующих целевых клеток множественной миеломы RPMI-8226 или OPM-2. Фиг. 1А показывает поверхностное экспрессирование BCMA, как оценивается с помощью проточной цитометрии после окрашивания антителом анти-BCMA иллюстративных линий клеток множественной миеломы, включая RPMI-8226 и OPM-2. Точечная линия показывает фон для BCMA-негативной линии клеток, окрашенных антителом анти-BCMA. MFI - это медианная интенсивность флуоресценции. Экспрессирование BCMA является относительно низким для обеих линий клеток (смотри Lee *et al.* (2016) *Br J Haematol.* 174:911-922). Как показано, RPMI-8226 является более чувствительными к леналидомиду по сравнению с OPM-2 (6,43 и 37,4 мкМ, соответственно) (Wellcome Sanger Institute. Wellcome Sanger Institute. Genomics of drug sensitivity in cancer. [www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1020](http://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1020). Accessed February 7, 2018).

A. RPMI-8226

### **1. Цитолитическая активность**

[0708] Клетки линии ВСМА-экспрессирующих целевых клеток (RPMI-8226) инкубируют вместе с иллюстративными CAR T-клетками анти-ВСМА, экспрессирующими CAR с scFv анти-ВСМА человека, при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 0,3:1 в присутствии 1 мкМ или 10 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (несущая среда). Совместные культуры с T-клетками, не экспрессирующими CAR (имитация), или культуры только с целевыми клетками (не-CAR T) используют как контроли, каждую, в присутствии или в отсутствие (несущая среда) 10 мкМ или 1 мкМ леналидомида. Клетки для каждого условия высевают в трех повторах.

[0709] Целевые клетки RPMI-8226 метят NucLight Red (NLR) чтобы сделать возможным их отслеживание с помощью микроскопии. Цитолитическая активность оценивается по измерению потерь жизнеспособных целевых клеток за период шесть дней, как определено по сигналу красной флуоресценции (с использованием IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Нормированные количества целевых клеток получают посредством деления количеств целевых клеток на количество клеток в начале каждого культивирования. Процент гибели целевых клеток оценивается посредством измерения площади под кривой (AUC) для нормированного количества целевых клеток в зависимости от времени и нормирования значений обратной AUC (1/AUC) посредством определения значения 0% (только целевые клетки) и значения 100% (CAR+ T-клетки, культивируемые совместно с целевыми клетками, в контроле с несущей средой).

[0710] Как показано, совместная культура в присутствии 1 мкМ (Фиг.1C) или 10 мкМ (Фиг.1B, 1C) леналидомида дает в результате повышение степени уничтожения целевых клеток с помощью CAR+ T-клеток анти-ВСМА в день 6 совместного культивирования, по сравнению с инкубированием целевых клеток вместе с CAR+ T-клетками анти-ВСМА в отсутствие леналидомида (считают за 100% на Фиг.1B). Как показано на Фиг.1C, наблюдаемое воздействие леналидомида на цитолитическую активность является доза-чувствительным и замедленным, оно не возникает до прохождения приблизительно 50 часов в культуре. Результаты согласуются с ролью леналидомида в усилении непрерывной функции и/или выживаемости (например, предотвращая истощение или гибель клеток) CAR T-клеток после начальной активации. Сходные результаты наблюдают для клеток, полученных с помощью генной инженерии, для экспрессирования некоторого количества других CAR анти-ВСМА, каждый из которых, имеет различные домены связывания scFv.

### **2. Продуцирование/накопление цитокинов**

[0711] Уровни различных цитокинов оценивают в супернатантах культур после инкубирования CAR T-клеток анти-ВСМА вместе с клетками линии ВСМА-экспрессирующих целевых клеток RPMI-8226 при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 0,3:1 в присутствии или в отсутствие 10 мкМ леналидомида. Культуру T-клеток, не экспрессирующих CAR анти-ВСМА (имитацию), используют как контроль. Количества IL-2 (Фиг.2A), IFN $\gamma$  (Фиг.2B) и TNF- $\alpha$  (Фиг.2C) в супернатантах культур

оценивают через 48 часов после начала культивирования. Как показано на Фигурах 2А-2С, присутствие леналидомида ассоциируется с увеличением CAR-зависимого продуцирования цитокинов и/или их накопления после совместного культивирования CAR Т-клеток анти-BCMA, целевых клеток с антиген-специфичными целевыми клетками. Эти результаты согласуются с ролью леналидомида в усилении CAR-медируемых эффекторных функций. Сходные результаты наблюдают для клеток, экспрессирующих другие разнообразные CAR анти-BCMA, каждый из которых содержит различные домены связывания scFv.

В. OPM-2

### **3. Цитолитическая активность**

[0712] Целевые клетки множественной миеломы OPM-2 инкубируют вместе с Т-клетками человека (выделенными у четырех разных независимых доноров), экспрессирующими иллюстративные CAR анти-BCMA), при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 1:1 в присутствии 0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида в течение периода 7 дней. Клетки OPM-2 метят NucLight Red (NLR), чтобы сделать возможным отслеживание целевых клеток с помощью микроскопии, по существу, как описано выше. Цитолитическая активность оценивается по измерению потерь жизнеспособных целевых клеток в конце инкубирования. Степень цитолитической активности, наблюдаемую для культур, инкубируемых в отсутствие леналидомида, считают за фон, 100%. Результаты показаны на Фиг.3А. Добавление леналидомида, как наблюдается, повышает цитолитическую активность CAR+ Т-клеток анти-BCMA против целевых клеток OPM-2 доза-зависимым образом. Сходные результаты наблюдают для других CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-BCMA, включая клетки, экспрессирующие различные CAR анти-BCMA, каждый из которых имеет различные домены связывания scFv, и/или полученных с помощью генной инженерии, используя клетки от различных доноров.

### **4. Цитокины**

[0713] CAR Т-клетки анти-BCMA, полученные от четырех независимых доноров, инкубируют вместе с линией BCMA-экспрессирующих целевых клеток OPM-2 при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 1:1 в присутствии 0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (считают за фон, 100%). После 24 часов культивирования, оценивается присутствие IFN $\gamma$  (Фиг.3В), IL-2 (Фиг.3С) и TNF- $\alpha$  (Фиг.3D) в супернатантах культур. Как показано на Фигурах 3В-3D, леналидомид, как наблюдается, усиливает продуцирование и/или накопление цитокинов с помощью антиген-стимулированных CAR+ Т-клеток анти-BCMA доза-зависимым образом.

### **С. СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ ОТ МНОЖЕСТВА ДОНОРОВ CAR+ Т-КЛЕТОК АНТИ-BCMA**

[0714] В другом исследовании, CAR Т-клетки анти-BCMA от репрезентативного здорового донора и пациента с множественной миеломой (пациент, не поддающийся лечению помалидомидом) инкубируют вместе с флуоресцентно мечеными целевыми

клетками OPM-2 при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 0,3:1 в присутствии различных концентраций леналидомида (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида) или в отсутствие леналидомида в течение 6-7 дней. Цитолитическую активность измеряют по потерям красных флуоресцентных клеток. Для оценки продуцирования цитокинов, CAR T-клетки анти-BCMA, полученные от здорового донора и от пациента с множественной миеломой, культивируют совместно с флуоресцентно мечеными целевыми клетками OPM-2 при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 1:1 в присутствии различных концентраций леналидомида (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ леналидомида) или в отсутствие леналидомида. Через 24 часа, отбирают образцы сред для оценки в присутствия  $IFN\gamma$  и IL-2. Результаты показаны на Фиг.3Е, они представляют собой среднее по двум экспериментам; цитолитическая активность и продуцирование цитокинов антиген-специфичных CAR-T анти-BCMA, согласно наблюдениям, увеличиваются под действием леналидомида концентрационно-зависимым образом.

[0715] Исследование выше распространяют на CAR<sup>+</sup> T-клетки анти-BCMA, генерируемые из клеток от двух дополнительных здоровых доноров. Активность CAR<sup>+</sup> T-клеток анти-BCMA от трех здоровых доноров и одного не поддающегося лечению пациента с IMiD (пациент донор не поддается лечению помалидомидом) сравнивают с линиями клеток множественной миеломы, экспрессирующими BCMA, как OPM-2, так и RPMI-8226. Цитолитическую активность и продуцирование цитокинов ( $IFN\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ ) анализируют, по существу, как описано выше. Вычисляют абсолютные изменения уровней цитокинов по отношению к контролю с несущей средой. Эксперименты осуществляют по 2-3 раза для каждого донора.

[0716] Увеличение цитолитической активности CAR T анти-BCMA против целевых клеток OPM-2, титруемых вместе с увеличивающимися концентрациями леналидомида, наблюдают для всех доноров ( $P=6,2\times 10^{-5}$ ) (Фиг.3F). Как показано на Фиг.3F, воздействие лечения леналидомидом на цитолитическую активность CAR T видимо является зависимым от донора в совместной культуре с RPMI-8226, при этом пациент донор показывает значительное увеличение цитолитической активности ( $P=1,9\times 10^{-8}$ ). В дополнение к этому, все доноры CAR T имеют значительно повышенное продуцирование  $IFN\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  зависимым от концентрации леналидомида образом при совместном культивировании с клетками OPM-2 ( $P<0,002$ , Фиг.3G). Продуцирование цитокинов CAR-экспрессирующими T-клетками в совместной культуре с RPMI-8226 также значительно увеличивается для всех доноров и цитокинов при лечении леналидомидом ( $P<0,003$ , Фиг.3H).

**Пример 2** Воздействие леналидомида на размножение и антиген-специфичную функцию CAR-T-клеток при последовательной повторной стимуляции

А. Размножение CAR-T-клеток

[0717] Способность CAR T-клеток к размножению и демонстрации антиген-специфичной функции *ex vivo* после повторяющихся заходов стимуляции антигеном,

может коррелировать с функцией *in vivo* и/или способностью клеток к выживанию *in vivo* (например, после введения и начальной активации в ответ на встречу с антигеном) (Zhao et al. (2015) *Cancer Cell*, 28:415-28). CAR<sup>+</sup> Т-клетки анти-BCMA, генерируемые, как описано выше, высевают в трех повторах при  $1 \times 10^5$  клеток/лунка на 96-луночные планшеты. Облученные целевые клетки, экспрессирующие BCMA (клетки MM1.S), добавляют при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 1:2 в присутствии или в отсутствие различных концентраций (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ или 10 мкМ) леналидомида.

[0718] Каждые 3-4 дня (начало каждого нового захода), CAR Т-клетки считают. Затем клетки собирают и повторно высевают при начальной плотности посева вместе со свежими средами и вновь добавленным леналидомидом при такой же концентрации, где это применимо и свежееоттаявшими, свежееоблученными целевыми клетками. Осуществляют 8 заходов стимуляции в течении 31-дневного периода культивирования. Для некоторых заходов, при повторном посевании, клетки оценивают на фенотипические маркеры с помощью проточной цитометрии.

[0719] Иллюстративные результаты показаны на Фиг.4А. Как показано, увеличение размножения CAR Т-клеток анти-BCMA наблюдается в день 14 для всех концентраций леналидомида, по сравнению с лунками без леналидомида. Анализ осуществляют для различных композиций CAR<sup>+</sup> Т-клеток анти-BCMA, каждая из них генерируется посредством введения CAR в Т-клетки, полученные от одного из шести разных доноров. Анализ осуществляют на клетках от шести разных независимых доноров, полученных с помощью генной инженерии для экспрессирования CAR. Для каждого донора, наблюдают повышение или отсутствие изменения в размножении CAR-Т при концентрации леналидомида 0,1 мкМ. Фиг.4В показывает результаты сходного анализа, в котором клетки, полученные с помощью генной инженерии для экспрессирования двух различных CAR анти-BCMA человека, подвергаются воздействию множества заходов стимуляции целевыми клетками в присутствии или в отсутствие леналидомида. Как показано, присутствие леналидомида в культурах, как наблюдается, повышает размножение в обеих популяциях клеток, в период между днем 21 и днем 28. Результаты согласуются с тем выводом, что леналидомид может ускорять непрерывное размножение и/или выживание CAR<sup>+</sup> Т-клеток после многократных встреч с когнатным антигеном.

### **В. Количество, продуцирование цитокинов и активация CAR-Т-клеток**

[0720] CAR<sup>+</sup> Т-клетки анти-BCMA от 3 доноров, генерируемые, как описано выше, высевают в трех повторах на 96-луночные планшеты с облученными целевыми BCMA-экспрессирующими клетками (клетки MM1.S) при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 1:2, в присутствии 0,1 мкМ леналидомида или контроля с несущей средой. Условия культивирования устанавливаются повторно каждые 3-4 дня. Повторное высевание продолжают в течение 28 дней или до тех пор, пока количество клеток не составит <50000 клеток. Эксперименты осуществляют в трех повторах для 3 доноров. Уровни цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ ) оценивают через 24 часа после повторного посева в дни 5, 8 и 15. Активацию CAR Т-клеток измеряют на клетках, собранных в дни

4, 7 и 14, с помощью проточной цитометрии на CD25.

[0721] Фиг.5А показывает количества клеток (спроектированные удвоения популяции) CAR<sup>+</sup> Т-клеток анти-BCMA для каждой временной точки повторной стимуляции. “х” показывает недостаточность клеток для повторного высевания при анализе. Результаты показывают, что после повторной стимуляции целевыми клетками, все 3 донора CAR Т, леченые леналидомидом, имеют повышенные спроектированные количества клеток в течение 28 дней по сравнению с контролями ( $P < 0,003$ ). Фиг.5В показывает медианную интенсивность флуоресценции (MFI) CD25 (гейтированную на живых CAR<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>) и Фиг.5С показывает продуцирование цитокинов, нормированное на количество посеянных клеток. Увеличение количества клеток ассоциируется со значительным увеличением экспрессирования CD25 CAR Т-клетками ( $P < 3,4 \times 10^{-4}$ ; Фиг.5В) и продуцирования IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в средах ( $P < 0,5$ ; Фиг.5С). Результаты показывают, что количество, продуцирование цитокинов и активация CAR-Т-клеток анти-BCMA повышаются под действием леналидомида после повторных стимуляций *in vitro*.

#### **Пример 3 Воздействия леналидомида на пролиферацию и активацию CAR-Т BCMA в 3D модели миеломы**

[0722] Для оценки функции клеток в контексте трехмерной (3-D) окружающей микросреды BCMA-экспрессирующей ткани человека, реконструированный костный мозг (rBone™) (zPREDICTA, San Jose, CA) погружают в BCMA-экспрессирующие RPMI-8226. 20000 Т-клеток, экспрессирующих другой иллюстративный CAR анти-BCMA человека (или имитационные Т-клетки, не экспрессирующие CAR), инкубируют в 3-D модели в присутствии или в отсутствие 1,0 мкМ леналидомида.

[0723] Через 2 или 7 дней, клетки выделяют и оценивают с помощью проточной цитометрии на поверхностное экспрессирование CD3, CD25, CD4 и CD8. Как показано на Фиг.6А, присутствие леналидомида, как наблюдается, дает в результате увеличение общего количества клеток CD3<sup>+</sup> в культурах с CAR<sup>+</sup> Т-клетками анти-BCMA в день 7. Увеличение экспрессирования CD25<sup>+</sup> в популяциях Т-клеток CD4<sup>+</sup> (Фиг.6В) и CD8<sup>+</sup> (Фиг.6С) также наблюдается в присутствии леналидомида. Результаты согласуются с тем выводом, что леналидомид может усиливать размножение, выживание и/или функцию CAR<sup>+</sup> Т-клеток анти-BCMA в окружающей микросреде антиген-экспрессирующей опухоли.

#### **Пример 4 Воздействие леналидомида на функцию CAR Т-клеток *in vivo***

[0724] Противоопухолевые воздействия CAR Т-клеток анти-BCMA, отдельно и в комбинации с леналидомидом, оценивают на двух различных моделях BCMA-экспрессирующих опухолей мышей - на модели мышей с привитой множественной миеломой RPMI 8226 человека (модель подкожного импланта) и на модели мышей с привитой множественной миеломой OPM-2 человека (ортотопическая модель костного мозга).

##### **А. Модель RPMI-8226**

[0725] Мышам вводят подкожную инъекцию (s.c.) из  $5 \times 10^6$  клеток RPMI-8226 и опухоли дают возможность для роста до объема приблизительно 150 мм<sup>3</sup>. В день 0,

композицию, содержащую субоптимальную (низкую) дозу CAR+ Т-клеток анти-BCMA (генерируемую посредством трансдуцирования клеток, полученных из образцов от доноров субъектов людей, в основном, как описано выше) вводят мышам внутривенно (при этом сходная композиция Т-клеток, не экспрессирующих CAR (имитация), используется как контроль). Конкретно, композиция содержит приблизительно  $5 \times 10^5$  CAR+ (или имитационных) Т-клеток CD4+ и  $5 \times 10^5$  CAR+ (или имитационных) Т-клеток CD8+. Т-клетки адоптивно переносят мышам, отдельно или в комбинации с леналидомидом, вводимым ежедневно, при 25 мг/кг, внутривенно (i.p.), начиная с d=0 (при введении Т-клеток), это продолжается до дня 21. В другой контрольной группе, мышам вводят только леналидомид, без введения Т-клеток. Объем опухоли и выживаемость животных отслеживают в течение всего исследования. Ретроорбитальный забор крови (RO) осуществляют еженедельно для оценки уровней BCMA и IFN-гамма в плазме и для фармакокинетической (PK) оценки CAR+ Т-клеток.

[0726] Измерения объема опухоли для индивидуальных животных показаны на Фиг.7А, введение леналидомидом и низкой дозы CAR+ Т-клеток анти-BCMA в комбинации, как наблюдается, приводит в результате к замедлению роста опухоли по сравнению с мышами, лечеными только леналидомидом или CAR+ Т-клетками анти-BCMA. Наблюдаемое воздействие наиболее очевидно в более поздних временных точках, включая точки после последнего ежедневного введения леналидомидом (то есть, после дня 21). Результаты согласуются со способностью леналидомидом к увеличению способности Т-клеток к долговременному выживанию и/или функционированию.

[0727] Как показано на Фиг.7В, мыши, которым дают леналидомидом и CAR+ Т-клетки анти-BCMA, демонстрируют увеличение выживаемости по сравнению с другими лечебными группами. Средняя выживаемость (MS) мышам, которым вводят CAR+ Т-клетки анти-BCMA и леналидомидом, составляет 85 дней (в два раза больше, по сравнению с другими лечебными группами, которые демонстрируют среднюю выживаемость 38-43,5 дней).

[0728] В дополнение к этому, количество CAR+ Т-клеток CD4+ и CD8+ и не-CAR Т-клеток в периферической крови каждого животного определяют в дни 7, 14, 21 и 34. Количества CAR Т-клеток CD4+ и не-CAR Т-клеток показаны на Фигурах 8А и 8Е (в дни 7 и 14), соответственно и на Фигурах 8В и 8F (в дни 21 и 34), соответственно. Количества CAR Т-клеток CD8+ и не-CAR Т-клеток показаны на Фигурах 8С и 8G (дни 7 и 14), соответственно и на Фигурах 8D и 8H (дни 21 и 34), соответственно. Как показано, увеличение количества CAR+ Т-клеток CD4+ и CD8+ (но не не-CAR+ Т-клеток) в крови наблюдают в день 36 у мышам, принимающих комбинацию CAR+ Т-клеток анти-BCMA и леналидомидом, по сравнению с другими лечебными группами.

## В. МОДЕЛЬ OPM-2

### *i. Исследование 1*

[0729] Воздействие леналидомидом в комбинации с CAR Т анти-BCMA также оценивают на ортоптической модели опухоли мышам с использованием клеток OPM-2.

Мыши (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL-2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG; Jackson Labs)) получают внутривенную инъекцию (i.v.) с  $2 \times 10^6$  клеток OPM2 (множественной миеломы) трансфицированных люциферазой светлячков (OPM2-ffluc). Прививка опухоли становится возможной в течение 13 дней перед стадированием (за 14 дней до введения CAR-T-клеток) и верификацией с использованием биолюминесцентных изображений. Мышам вводят одну или несколько композиций в различных лечебных группах, как приводится в Таблице E1 и следует из нее.

[0730] Некоторые группы принимают 10 мг/кг леналидомида в фосфатном буферном солевом растворе посредством внутрибрюшинной инъекции, начиная либо (A) в день -1 (за день до введения CAR+ Т-клеток) (леналидомид (A)); либо (B) в день 14 (день 14 после начала введения CAR+ Т-клеток) (леналидомид (B)), в каждом случае, ежедневно, в ходе всего исследования. В группах, принимающих CAR+ Т-клетки, CAR анти-BCMA (генерируемые посредством трансдуцирования клеток, полученных из образцов субъектов доноров людей, по существу, как описано выше) вводят в день 0 (день 14 после инъекции клеток опухоли), при дозе либо  $5 \times 10^5$  (низкая), либо  $1 \times 10^6$  (высокая) CAR-экспрессирующих Т-клеток. Таблица E1 приводит сводку режимов дозирования.

Таблица E1: План исследования		
№ Группы	Описание группы	Количество введенных CAR Т-клеток (или имитационно-трансдуцированных Т-клеток)
1	Только опухоль	0
2	Имитация (высокая)	$(1 \times 10^6)$
3	Леналидомид (A)	Нет
4	Леналидомид (B)	Нет
5	Имитация+леналидомид (A)	$(1 \times 10^6)$
6	Имитация+леналидомид (B)	$(1 \times 10^6)$
7	CAR+ Т-клетки анти-BCMA (высокая)	$1 \times 10^6$
8	CAR+ Т-клетки анти-BCMA (низкая)	$5 \times 10^5$
9	CAR+ Т-клетки анти-BCMA (высокая) + леналидомид (A)	$1 \times 10^6$
10	CAR+ Т-клетки анти-BCMA (низкая) + леналидомид (A)	$5 \times 10^5$
11	CAR+ Т-клетки анти-BCMA (высокая) + леналидомид (B)	$1 \times 10^6$
12	CAR+ Т-клетки анти-BCMA (низкая) + леналидомид (B)	$5 \times 10^5$

[0731] Опухолевую нагрузку у животных среди различных групп отслеживают с помощью биолюминесцентных изображений до дня 39 после дозирования CAR+ Т-клеток. Для получения биолюминесцентных изображений, мыши принимают внутрибрюшинно (i.p.) инъекции субстрата люциферина (CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA), повторно суспендированного в PBS (15 мкг/г массы тела). Общий поток (фотоны/сек) определяют в каждой временной точке.

[0732] Фиг.9А и Фиг.9В изображают результаты для опухолевой нагрузки до дня 46, у мышей, леченых леналидомидом, ежедневно, начиная в день -1 (леналидомид А) в присутствии или в отсутствие высокой ( $1 \times 10^6$ ; Фиг.9А) или низкой ( $5 \times 10^5$ ; Фиг.9В) дозы

CAR+ Т-клеток. Фиг.9С показывает графики опухолевой нагрузки индивидуальных животных до дня 53. Фиг.9D показывает графики и результаты получения изображений опухоли (день 46 после введения клеток CAR+) для индивидуальных животных, принимавших более высокую дозу CAR+, с леналидомидом, в день -1 (леналидомид А). Фиг.9Е показывает графики и результаты получения изображений опухоли (день 46 после введения клеток CAR+) для индивидуальных животных, принимавших более высокую дозу CAR+, без леналидомидом, в день -1 (леналидомид А). Звездочки показывают гибель или умерщвление индивидуального животного во временной точке, показанной на графике. Как показано, добавление леналидомидом, как наблюдается, дает в результате замедление роста опухоли и уменьшение опухолевой нагрузки у мышей, которым вводят CAR+ Т-клетки при обеих дозах CAR+ Т-клеток.

[0733] Фиг.9F и Фиг.9G изображают результаты для опухолевой нагрузки во временной точке при исследовании мышей, которым вводят леналидомид, начиная в день 14 после введения CAR+Т (леналидомидом В) (вертикальные линии на Фигурах 9F и 9G) в присутствии или в отсутствие высокой ( $1 \times 10^6$ , Фиг.9F) или низкой ( $5 \times 10^5$ , Фиг.9G) дозы CAR+ Т-клеток. Фиг.9H показывает графики опухолевой нагрузки для индивидуальных животных до дня 53. Фиг.9I показывает графики и результаты получения изображений опухоли (день 46 после введения клеток CAR+) для индивидуальных животных, принимавших более высокую дозу CAR+, с леналидомидом, в день -1 (леналидомид А). Фиг.9J показывает графики и результаты получения изображений опухоли (день 46 после введения клеток CAR+) для индивидуальных животных, принимавших более высокую дозу CAR+, без леналидомидом, в день -1 (леналидомид А). Как показано, в то время, как леналидомид сам по себе, как наблюдается, не уменьшает рост опухоли или опухолевую нагрузку, добавление леналидомидом, как наблюдается, дает в результате тренд в направлении замедления роста опухоли и уменьшения опухолевой нагрузки у мышей, которым вводят обе дозы CAR Т-клеток, с четкими различиями, наблюдаемыми начиная в день 30-40 после инъекции CAR-Т-клеток для более высокой ( $1 \times 10^6$ ) дозы CAR+ Т-клеток. При этой дозе, комбинация с леналидомидом, как наблюдается замедляет рост опухоли, дают ли его в день -1 или вводят посредством замедленного дозирования.

[0734] Результаты выживаемости в некоторой временной точке исследования показаны на Фигурах 10А и 10В (для групп, принимающих леналидомид в режимах (день -1) и В (день 14 после CAR (замедленное), соответственно), и на Фигурах 10С и 10D (для групп, принимающих высокие и низкие дозы CAR, соответственно). Как показано, добавление леналидомидом улучшает воздействие на выживаемость, наблюдаемое у мышей, леченых CAR+ Т-клетками анти-BCMA (как при высоких, так и при низких оцениваемых дозах), когда он вводится либо в день -1 (А), либо посредством замедленного дозирования (d.14) (В).

[0735] Таблица Е2 приводит медианную выживаемость (MS) (как оценивается в день 56 после введения клеток CAR+ Т-клеток) и количество мышей в группе, выживающих до дня 56 после введения CAR+ Т-клеток, для каждой группы животных, оцениваемой в этом

исследовании.

Таблица E2: Выживаемость			
Группа	Доза клеток	Медианная выживаемость (оцениваемая в день 6)	Количество выживших животных в день 56 после CART
Имитация, высокая	1,00E+06	24	0/8
Леналидомид (A)	нет	28	0/8
Леналидомид (B)	нет	25	0/8
Имитация+леналидомид (A)	1,00E+06	28	0/8
Имитация+леналидомид (B)	1,00E+06	25	0/8
CAR+ Т-клетки (высокая)	1,00E+06	56	2/8
CAR+ Т-клетки (низкая)	5,00E+05	35	0/8
CAR+ Т-клетки (высокая) + леналидомид (A)	1,00E+06	нет	6/8
CAR+ Т-клетки (низкая) + леналидомид (A)	5,00E+05	52	1/8
CAR+ Т-клетки (высокая) + леналидомид (B)	1,00E+06	нет	6/8
CAR+ Т-клетки (низкая) + леналидомид (B)	5,00E+05	36	2/8

(ii.) Исследование 2

[0736] В дополнительном исследовании, мыши NOD/Scid/gc<sup>-/-</sup> (NSG) получают инъекцию (i.v.) клеток OPM-2-люцифераза, как описано в Исследовании 1, выше, и получают возможность для прививки в течение 14 дней до получения клеток CAR-T (или имитации); вливание (i.v.). В нескольких группах, ежедневное внутрибрюшинное введение 10 мг/кг леналидомида или контроля с несущей средой начинается либо в день -1 (за день до введения CAR-T) (одновременно с леналидомидом (леналидомид (C)), либо несущей средой (несущая среда (C)) или в день 14 после введения клеток CAR-T (или имитации) (замедленное введение леналидомида (D)).

[0737] Через 14 дней после инъекции клеток опухоли (день 0), вводят внутривенно субтерапевтическую дозу CAR+ Т-клеток (1×10<sup>6</sup> CAR Т-клеток (генерируемых от двух разных доноров)) или имитационных контрольных клеток. Результаты показаны на Фиг.10E, 10F, 10G и 10H. Данные представлены как среднее значение ±SEM. Для выживаемости *in vivo*, используют тест Гехана-Бреслоу-Уилкоксона для сравнения групп.

[0738] Фиг.10E изображает результаты оценки опухолевой нагрузки до дня 60, как анализируют посредством биолуминесценции, измеренной с помощью проточной цитометрии. Добавление леналидомида, как наблюдается, дает в результате замедление роста опухоли и уменьшение опухолевой нагрузки у мышей, которым вводят CAR+ Т-клетки, генерируемые из клеток обоих доноров. Как показано на Фиг.10F, добавление леналидомида, как наблюдается, улучшает воздействие на выживаемость мышей, леченых CAR+ Т-клетками анти-BCMA, особенно после одновременного введения леналидомида. Линейные модели фиксированных эффектов или модели смешанных эффектов используют

для оценки значимости влияния лечения леналидомидом на цитолитическую активность, лечением, с донором и временем лечения как фиксированными эффектами и леченым животным как случайным эффектом, сгруппированными в пределах времени, когда повторные измерения получают от одного и того же животного. Значения  $P$  получают посредством тестов, сравнивая полную модель с эффектом, представляющим интерес, с моделью без эффекта, представляющего интерес. Одновременное добавление леналидомида приводит к значимому уменьшению опухолевой нагрузки для донора 1 ( $P=0,02$ ) и увеличению выживаемости для донора 1 ( $P=0,057$ ) и донора 2 ( $P=0,04$ ), по сравнению с животными, лечеными несущей средой, которым делают инъекцию только CAR T анти-BCMA. Животные на одновременном режиме дозирования леналидомида также показывают увеличение количества CAR T в периферической крови через 7 дней ( $P=7,3 \times 10^{-6}$ ), но не в более поздних временных точках. Леналидомид вызывает малое, но значимое воздействие имитационных CAR T на опухолевую нагрузку только для донора 1 ( $P=0,003$ ). В этом исследовании, добавление замедленного дозирования леналидомида не улучшает исчезновения опухоли и выживания для обоих доноров CAR T. Результаты показывают, что выживание и исчезновение опухоли под действием субтерапевтической дозы CAR-T анти-BCMA усиливается с помощью леналидомида в модели опухоли OPM-2 *in vivo*.

[0739] Кровь от леченых мышей собирают для CAR-T фармакокинетического анализа и клетки окрашиваются антителами для исключения мышь-специфичных клеток (H2-kd, TER119 и  $\mu$ CD45) и анализируются с помощью проточной цитометрии. Клетки гейтируют на CAR+ CD45+ CD3+ и определяют количество клеток на микролитр крови. Для фармакокинетических измерений, каждую временную точку анализируют посредством одностороннего ANOVA и post-hoc теста Тьюки. Фигуры 10G и 10H показывают анализ с помощью проточной цитометрии имитационных контрольных клеток и CAR T-клеток в крови мышей в дни 8, 14, 22 и 28 после инъекции CAR T-клеток от двух доноров. Результаты показывают, что увеличение количеств CAR-T-клеток наблюдают в периферической крови в ранних временных точках, в особенности после одновременного введения леналидомида (\*\*  $P < 0,01$ ).

**Пример 5** Воздействия леналидомида на пролиферацию CAR анти-CD19 при субоптимальной стимуляции

[0740] CAR-экспрессирующие T-клетки анти-CD19 генерируют с помощью генной инженерии T-клеток CD4+ и CD8 (которые выделяют посредством обогащения на основе иммунного сродства у здоровых субъектов доноров людей) с помощью вирусного вектора, кодирующего CAR анти-CD19. CAR содержит scFv анти-CD19, спейсер, полученный из Ig, трансмембранный домен, полученный из CD28 человека, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из 4-1BB человека, и сигнальный домен, полученный из CD3 зета человека. Конструкция нуклеиновых кислот, кодирующая CAR, также содержит усеченную последовательность EGFR (tEGFR) для использования как маркера трансдукции, отделенную от последовательности CAR саморасщепляющейся последовательностью T2A.

[0741] CAR T-клетки анти-CD19 подвергаются субоптимальной стимуляции посредством инкубирования вместе с анти-CD3 (без второго реагента, такого как анти-CD28, разработанного для обеспечения костимулирующего сигнала), в присутствии 5 мкМ леналидомида или контроля с несущей средой. CAR-экспрессирующие T-клетки анти-CD19 перед инкубированием метятся красителем CELLTRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham MA); пролиферацию оценивают посредством оценки разбавления красителя с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг.11, в контексте субоптимальных стимулирующих условий в течение периода 72 часов, леналидомид, как наблюдается, усиливает пролиферацию CAR+ T-клеток.

**Пример 6** Наблюдаемое соотношение между результатами лечения и уровнями CAR+ T-клеток в периферической крови у когорты субъектов людей, которым вводят CAR-экспрессирующие клетки анти-CD19

[0742] Результаты лечения и количества CAR+ T-клеток в крови, оценивают у двадцати восемь взрослых субъектов с возобновляющейся или не поддающейся лечению (R/R) лимфомой не-Ходжкина (NHL), которым вводят аутологичные T-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), нацеленный на CD19, содержащий антитело scFv анти-CD19 и внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB (вводят при отношении CAR+ T-клеток CD4+ и CD8+ приблизительно 1:1).

[0743] Перед введением CAR-экспрессирующих T-клеток, субъектов лечат 30 мг/м<sup>2</sup> флударабина ежедневно в течение 3 дней и 300 мг/м<sup>2</sup> циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней. При d=0, субъектов лечат 5×10<sup>7</sup> (DL-1) или 1×10<sup>8</sup> (DL-2) CAR-экспрессирующих T-клеток посредством внутривенного вливания.

[0744] Доли ответов, наблюдаемых в конкретной временной точке в следующем далее исследовании, показаны в Таблице E3 для 20 субъектов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL), леченых одной дозой DL-1. Как показано, наблюдают общую долю ответов (ORR) 80% (16/20), и 60% (12/20) субъектов, как наблюдается, реализуют полную ремиссию (CR). 20% (4/20) субъектов демонстрируют частичный ответ (PR) и 20% (4/20) демонстрируют прогрессирование заболевания (PD). Среди субъектов, не поддающихся лечению с помощью химиотерапии (демонстрирующих стабильное или прогрессирующее заболевание после последнего режима, включающего химиотерапию или рецидив меньше, чем 12 месяцев после аутологичного SCT), перед введением CAR+ T-клеток, общая доля ответов составляет 83% (10 ORR, 7 CR, 3 PR, 2 PD, n=12). Среди субъектов, не поддающихся лечению (демонстрирующих ремиссию меньше полной после последнего лечения, но не считающихся не поддающимися лечению с помощью химиотерапии), общая доля ответов составляет 77% (13 ORR, 9 CR, 4 PR, 4PD, n=17).

Таблица E3. Полный ответ			
Когорта DLBCL, однократный временной график DL1			
	Все (n=20)	Не поддающиеся лечению* (n=17)	Не поддающиеся лечению с помощью химиотерапии† (n=12)

ORR, n (%) [95% CI]	16 (80) [56, 94]	13 (77) [50, 93]	10 (83) [52, 98]
CR, n (%) [95% CI]	12 (60) [36, 81]	9 (53) [28, 77]	7 (58) [28, 85]
PR	4 (20)	4 (24)	3 (25)
PD	4 (20)	4 (24)	2 (17)

\*<CR для последней терапии

†SD или PD для последнего режима, включающего химиотерапию, или рецидив через <12 месяцев после аутологичного SCT

[0745] Из трех субъектов с DLBCL, которых во время оценки лечили двумя дозами DL-1, двое демонстрируют частичный ответ (PR) и 1 демонстрирует прогрессирование заболевания (PD). Среди 2 субъектов, леченых во время оценки одно дозой DL-2, оба субъекта, как наблюдается реализуют CR. Среди когорты с MCL в целом из двух подвергающихся лечению во время оценки одной дозой DL-1 наблюдают 1 PR и 1 PD. Два субъекта с двойной дозой, три субъекта с тройной дозой и четыре субъекта с двойным экспрессированием DLBCL, как наблюдается, реализуют ответов (7 CR, 2 PR).

[0746] Количество CAR<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови определяют в определенных временных точках после лечения с использованием трансгенно-специфичного реагента. Количество CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD3<sup>+</sup> в периферической крови, измеренное в определенных временных точках после вливания, показано для субъектов, сгруппированных по наилучшему общему ответу на Фиг.12А. У респондеров (CR/PR) наблюдают более высокие пиковые количества CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD3<sup>+</sup>, чем у субъектов с прогрессирующим заболеванием (PD). Фигуры 12B-D показывают уровни CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD3<sup>+</sup>, CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD8<sup>+</sup> (клетки/мкл крови; среднее значение ±SEM) у субъектов, которые реализуют ответы на лечение, сгруппированных по продолжительности ответа (непрерывный ответ (CR/PR) или PD в течение 3 месяцев). C<sub>max</sub> (CAR<sup>+</sup> клетки/мкл крови) и площадь под кривой (AUC) для респондеров (CR/PR) и для PD показаны в Таблице Е4. Результаты согласуются с тем выводом, что продолжительные ответы коррелируют с более высокими уровнями CAR<sup>+</sup> Т-клеток CD3<sup>+</sup> в крови, со временем и при пиковом размножении.

Таблица Е4. C <sub>max</sub> и AUC <sub>0-28</sub> выше у пациентов с CR/PR по сравнению с PD						
	CD3		CD4		CD8	
	CR/PR (n=16)	PD (n=4)	CR/PR (n=16)	PD (n=4)	CR/PR (n=16)	PD (n=4)
C <sub>max</sub> (CAR <sup>+</sup> клетки/мкл крови)						
Среднее (SD)	612 (1919)	2 (1)	220 (754)	1 (0,6)	426 (1314)	0,5 (0,5)
Медианное (Min, Max)	33 (1,7726)	1 (1, 3)	8 (1, 3040)	1 (0, 2)	4 (0, 5238)	0,3 (0,1)
Q1, Q3	7,123	0,7, 2	2, 46	0,6, 2	0,8, 104	0,1, 0,9
AUC <sub>0-28</sub>						

Среднее (SD)	5883 (18821)	16 (13)	2369 (8388)	10 (7)	3873 (11963)	6 (6)
Медианное (Min, Max)	196 (11,75773)	14 (4, 31)	47 (7, 33740)	9 (3, 17)	23 (1,47834)	4 (1,14)
Q1, Q3	52, 781	5, 26	16, 261	4, 16	4, 761	1, 10

[0747] Для одного субъекта с не поддающейся лечению с помощью химиотерапии трансформированной DLBCL (субтип с зародышевым центром, с перегруппировкой *BCL2* и множеством копий *MYC* и *BCL6*), которому вводят CAR+ Т-клетки при DL-1, количества CAR+ Т-клеток CD3+, CAR+ CD4+, CAR+CD8+ в периферической крови, измеренные в определенных временных точках, показаны на Фиг.13А. Субъекта предварительно лечили и он не поддавался лечению с помощью пяти предыдущих линий терапии, включая регулируемый по дозе этопозид, доксорубин и циклофосфамид с винкристином и преднизолоном плюс ритуксимаб (DA-EPOCH-R), и трансплантации с промежуточной интенсивностью аллогенных стволовых клеток от 8/8 HLA-согласованного неродственного донора. После трансплантации аллогенных стволовых клеток и до приема CAR+ Т-клеток, субъект показывает 100% донорский химеризм во всех линиях крови, прием иммуносупрессивной терапии прекращается и у него нет реакции трансплантата против хозяина (GVHD). Перед введением CAR+ Т-клеток, субъект имеет повреждение периаурикулярной массы и повреждение височной доли полушарий головного мозга, наблюдаемое посредством позитронно-эмиссионной томографии и компьютерной томографии (PET-CT) (Фиг.13В) и подтверждаемое с помощью магнитно-резонансной томографии (MRI) (Фиг.13D).

[0748] После приема лечения CAR-Т-клетками анти-CD19, субъект реализует CR через 28 дней после вливания, как показано с помощью PET-CT (Фиг.13С) и MRI головного мозга (Фиг.13Е), без наблюдаемых признаков нейротоксичности или CRS. Через три месяца после вливания CAR Т-клеток, у этого субъекта отмечается рецидив периаурикулярной массы (Фиг.13F) и осуществляют инцизионную биопсию. Как показано на Фиг.13А, после биопсии, видимая опухоль отступает без дополнительной терапии. Фармакокинетический анализ показывает заметное повторное размножение CAR+ Т-клеток в периферической крови (до уровня выше наблюдаемого при начальном размножении, пиковые уровни наблюдаются примерно через 113 дней после вливания), что совпадает с регрессией опухоли. Затем субъект начал реализовывать второй CR, как подтверждается повторным стадированием PET-CT через месяц после биопсии (Фиг.13G), и остается при CR через 6 месяцев после вливания CAR-Т-клеток. Дальнейшая оценка субъекта показала, что ответ CNS является стойким и субъект остается при CR 12 месяцев.

[0749] Эти результаты согласуются с тем выводом, что повторное размножение и активация CAR+ Т-клеток могут начинаться *in vivo* после уменьшения количества или потери функциональных или активных CAR+ Т-клеток и/или возобновляться после противоопухолевого ответа на CAR Т-клеточную терапию. Кроме того, после повторного

размножения *in vivo* намного позже начального вливания CAR+ Т-клеток, CAR+ Т-клетки могут повторно осуществлять противоопухолевую активность. Это результат поддерживает то предположение, что повторное размножение и активация CAR+ Т-клеток могут запускаться *in vivo* и что способы повторной активации CAR+ Т-клеток, могут дополнительно улучшить их эффективность.

**Пример 7 Воздействия леналидомида на активность CAR Т-клеток анти-CD19 после серийного повторной стимуляции**

[0750] CAR+ Т-клетки анти-CD19, генерируемые, по существу, как описано в Примере 5, оттаивают и инкубируют вместе с CD19-экспрессирующими клетками (клетки K562, трансдуцированные для экспрессирования CD19) при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 2,5:1 в присутствии или в отсутствие 1 нМ, 5 нМ, 60 нМ, 550 нМ или 5000 нМ леналидомида или в отсутствие леналидомида (контроль). Целевые клетки K562-CD19 метят NucLight Red (NLR), как описано в Примере 1, чтобы сделать возможным отслеживание целевых клеток с помощью микроскопии. Цитолитическую активность оценивают посредством измерения потерь жизнеспособных целевых клеток за период примерно 120 часов, как определяют посредством сигнала красной флуоресценции (используя IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Клетки от каждого условия высевают в трех повторах. Как показано на Фиг.14, результаты согласуются с тем выводом, что присутствие леналидомида уменьшает медируемую цитолитическую активность CAR в этом анализе. В подобных анализах, результаты изменяются в зависимости от отношения E:T и для различных композиций CAR+ Т-клеток анти-CD19 (например, генерируемых в различные моменты времени и/или состоящих из клеток от разных доноров).

[0751] В другом исследовании, CAR+ Т-клетки анти-CD19 инкубируют вместе с эффекторными клетками K562-CD19 при отношении E:T в присутствии 2,5:1 100 нМ или 1600 нМ леналидомида, 2 нМ или 166 нМ альтернативного соединения, нацеленного на киназу, контроля с несущей средой или в отсутствие добавленного соединения (контроль CAR-T). После 120 часов культивирования, клетки выделяют и оценивают с помощью проточной цитометрии на поверхностное экспрессирование CD25 или PD-1 в подмножествах Т-клеток CD4+ или CD8+. Как показано на Фиг.15А, инкубирование CAR+ Т-клеток анти-CD19 вместе с эффекторными клетками K562-CD19 в присутствии самой высокой концентрации леналидомида (например, 1600 нМ) дает в результате повышение уровней экспрессирования CD25 в Т-клетках как CD4+ так и в CD8+, по сравнению с другими условиями. Не наблюдается различий в поверхностном экспрессировании PD-1 в Т-клетках CD4+ или CD8+ в присутствии леналидомида, даже при самой высокой концентрации 1600 нМ (Фиг.15В).

[0752] В другом исследовании, количество IL-10 оценивают в супернатантах культур после инкубирования в течение 24 часов CAR+ Т-клеток анти-CD19 вместе с эффекторными клетками K562-CD19 при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 3:1 или 9:1, в присутствии или в отсутствие различных концентраций леналидомида. Как

показано на Фиг.16, леналидомид доза-зависимо увеличивает секретирование и/или накопление IL-10 в супернатантах культур Т-клеток.

#### **Пример 8 Воздействия леналидомида на размножение CAR Т-клеток анти-CD19 после серийной повторной стимуляции**

[0753] Способность CAR+ Т-клеток анти-CD19 размножаться *ex vivo* после повторных стимуляций оценивают с использованием способов, по существу, как описано в Примере 2. CAR+ Т-клетки анти-CD19, генерируемые от двух доноров (pt1 и pt2), по существу, как описано в Примере 5, культивируют вместе с облученными клетками K562, трансдуцированными для экспрессирования CD19 (клетки K562-CD19) при отношении эффекторных клеток к целевым 2,5:1 в присутствии или в отсутствие 1 мкМ леналидомида или 50 нМ или 500 нМ альтернативного соединения, нацеленного на киназу. Для каждого донора клетки собирают каждые 3-5 дней для каждой экспериментальной условий в лунках и считают и повторно стимулируют новыми целевыми клетками, используя такие же условия культивирования после повторного установления количества клеток при начальной плотности высевания для каждого захода. Осуществляют в целом 4 захода стимуляции в ходе 12-дневного периода культивирования. Для каждого захода стимуляции, определяют общее количество клеток и результаты изображены как кратное изменение количества клеток после стимуляции (Фиг.17А) или количество удвоений по сравнению с начальным количеством (Фиг.17В). Как показано на Фиг.17А и 17В, наблюдается отсутствие изменений или только малое воздействие на размножение клеток CAR+ Т-клеток анти-CD19 в этом анализе повторной стимуляции, когда клетки культивируются в присутствии леналидомида, по сравнению с отсутствием леналидомида.

[0754] При каждом установлении условий после предварительной обработки, цитолитическую активность оценивают посредством повторного инкубирования стимулируемых клеток вместе с клетками K562-CD19 (мечеными NucLight Red (NLR)) при некотором отношении эффекторных клеток к целевым (Е:Т) при 1 мкМ леналидомида или 50 нМ или 500 нМ альтернативного соединения. Цитолитическую активность оценивают посредством измерения потерь жизнеспособных целевых клеток за период 40-60 часов, как определено посредством сигнала красной флуоресценции (с использованием IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Клетки для каждой условий высевают в трех повторах. Репрезентативная гибель клеток, наблюдаемая при 2-ой и 4-ой повторной стимуляции для обоих доноров, показана на Фигурах 18А (нормируется на Nuc-меченые клетки K562-CD19 при  $t=0$ ) или на Фиг.18В (% уничтожения клеток по сравнению с контролем только с несущей средой (принимается за 100%)). Как показано на Фиг.18А и 18В, инкубирование вместе с леналидомидом, как наблюдается, дает в результате уменьшение цитолитической активности CAR+ Т-клеток анти-CD19 в этом анализе, при исследуемых условиях стимуляции.

#### **Пример 9 Генерирование шариков, конъюгированных с ВСМА**

[0755] Антиген созревания В-клеток (ВСМА) конъюгируют с шариками посредством ковалентного связывания полипептида слияния ВСМА-Fc, содержащего

растворимый ВСМА человека, слитой на своем С-окончании с Fc областью IgG, с поверхностью коммерчески доступных тозил-активированных магнитных шариков (ThermoFisher, Waltham MA). Шарик представляет собой суперпарамагнитные, непористые, монодисперсные, тозил-активированные шарик, которые ковалентно связывают первичные амино и сульфгидрильные группы. Конъюгирование осуществляется с использованием шариков, имеющих диаметр приблизительно 2,8 мкм (обозначается M-280) или 4,5 мкм (обозначается M-450).

[0756] ВСМА-Fc (SEQ ID NO: 22) содержащийся во внеклеточном домене ВСМА человека (GenBank No. NP\_001183,2) и Fc IgG1 человека, соединяются с помощью линкера следующим образом:

MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA  
(внеклеточный домен ВСМА; SEQ ID NO: 18)

GGGGS (линкер; SEQ ID NO: 19)

PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(Fc IgG1 человека; SEQ ID NO: 20).

[0757] Клон, кодирующий конструктор слияния ВСМА-Fc человека с N-конечной лидерной последовательностью CD33 (SEQ ID NO: 21), вставляют в вектор экспрессии и экспрессируют в клетках НЕК 293. Полученный в результате белок слияния ВСМА-Fc, как определено, имеет чистоту больше 95%, как оценено посредством гель-проникающей хроматографии. Для исследования связывания, белок слияния ВСМА-Fc инкубируют вместе с Т-клетками, экспрессирующими CAR анти-ВСМА и Т-клетками, экспрессирующими CAR, которые не связываются с ВСМА. Результаты проточной цитометрии показывают, что белок слияния ВСМА-Fc специфично связывается с CAR-экспрессирующими Т-клетками анти-ВСМА.

[0758] Различные концентрации белка слияния ВСМА-Fc в диапазоне от 5 мкг до 200 мкг добавляют приблизительно к 1 мл тозил-активированных шариков (например, содержащему примерно  $4 \times 10^9$  тозил-активированных шариков, имеющих диаметр 2,8 мкм, или примерно  $4 \times 10^8$  тозил-активированных шариков, имеющих диаметр 4,5 мкм). Ковалентное связывание осуществляют посредством инкубирования в течение ночи при 37°C в фосфатном буферном солевом растворе (PBS), содержащем 0,1% сывороточного альбумина человека (HSA). Шарик промывают и повторно суспендируют в 1 мл PBS с 0,1% HSA. После конъюгирования, концентрацию шариков определяют с использованием Cellometer. В примерах ниже, ВСМА-конъюгированные шарик, используемые в различных исследованиях, упоминаются с упоминанием либо количества антигена ВСМА-Fc, добавляемого на мл, либо концентрации антигена (мкг/мл) в ходе конъюгирования, например, 5 мкг или 5 мкг/мл; 50 мкг или 50 мкг/мл; 200 мкг или 200 мкг/мл, и так далее.

**Пример 10** Оценка маркеров Т-клеток на CAR+ Т-клетках анти-ВСМА

стимулированных ВСМА-конъюгированными шариками, в присутствии или в отсутствие леналидомида

[0759] ВСМА-конъюгированные шарики (диаметр 4,5 мкм), конъюгированные с различными количествами антигена ВСМА, как описано в Примере 9, инкубируют вместе с CAR+ Т-клетками анти-ВСМА в присутствии или в отсутствие леналидомида и оценивают экспрессирование маркеров Т-клеток.

[0760] Приблизительно  $1,5 \times 10^6$  CAR+ Т-клеток добавляют в лунки 12-луночного планшета и инкубируют вместе с шариками из 200 мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков при отношении CAR+ Т-клеток к ВСМА-конъюгированным шарикам 1:0,3, 1:1 или 1:3 (приблизительно  $0,5 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$  и  $4,5 \times 10^6$  шариков на лунку, соответственно). В качестве контроля, 5 мкг/мл антитела анти-CD3 наносят на лунки как покрытие (субоптимальная концентрация для стимуляции) или клетки высевают в отсутствие какого-либо агента (контроль без стимуляции). При каждом условии, инкубируют в присутствии или в отсутствие 5 мкм леналидомида. Клетки инкубируют в течение четыре дней, а затем анализируют с помощью проточной цитометрии на поверхностное экспрессирование CD4, CD8, Tim3, PD-1, CD25 и CD69.

[0761] Как показано на Фиг.19А, присутствие 5 мкм леналидомида увеличивает пролиферативную способность Т-клеток (наблюдаемую по уменьшению интенсивности красителя CTV) после инкубирования в течение трех дней вместе с шариками, конъюгированными с помощью 200 мкг антигена ВСМА при отношении Т-клеток к шарикам 1:1, по сравнению с инкубированием вместе с шариками в отсутствие леналидомида (контроль с несущей средой). Как показано на Фигурах 19В и 19С, присутствие леналидомида в ходе инкубирования дополнительно увеличивает степень поверхностного экспрессирования CD25 в Т-клетках CD4+ и CD8+, индуцируемого после инкубирования CAR+ Т-клеток анти-ВСМА вместе с ВСМА-конъюгированными шариками (Фиг.19В) или стимуляции анти-CD3 (Фиг.19С).

[0762] В другом эксперименте, композиции CAR-Т-клеток анти-ВСМА полученные, по существу, как описано в Примере 1, высевают в 96-луночные планшеты при плотности  $5 \times 10^5$  клеток на лунку. Исследуемые композиции CAR-Т-клеток при высевании содержат в среднем приблизительно 45% клеток CAR+ анти-ВСМА. Клетки из каждой композиции инкубируют в течение 18 часов в присутствии шариков из 5-мкг/мл, 50-мкг/мл или 200-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков при отношении Т-клеток к шарикам 1:1. Как контроль, клетки инкубируют вместе с шариками, конъюгированными с антителом анти-CD3/анти-CD28- (положительный контроль), или без добавления агента (отрицательный контроль). Инкубирование осуществляют в отсутствие леналидомида или в присутствии 0,5 мкм или 5 мкм леналидомида. После инкубирования, клетки обрабатывают реагентами, которые делают возможным окрашивание внеклеточным и внутриклеточным антителом с помощью проточной цитометрии для факторов транскрипции Blimp1, EOMES, GATA-3, Ikaros, Helios и Tbet и маркеров CD25, CD31 и PD-1.

[0763] Уровни маркеров после инкубирования композиции CAR+ Т-клеток от одного иллюстративного донора показаны для BLIMP-1 (Фиг.20А), CD25 (Фиг.20В), CD31 (Фиг.20С), PD-1 (Фиг.20D), Tbet (Фиг.20Е) и EOMES (Фиг.20F), GATA-3 (Фиг.20G) Helios (Фиг.20H) и Ikaros (Фиг.20I). Как показано, экспрессирование ряда факторов транскрипции, ассоциированных с оцениваемыми эффекторными Т-клетками, и маркеров активации увеличивается после стимуляции ВСМА-конъюгированными шариками. Для многих оцениваемых маркеров, степень увеличения экспрессирования сходна с экспрессированием, индуцируемым стимуляцией шариками анти-CD3/анти-CD28. В некоторых случаях, степень стимуляции ВСМА-конъюгированными шариками является наибольшей в присутствии 5 мкг шариков. Как показано на Фиг.20I, уровень экспрессирования Ikaros уменьшается в присутствии леналидомида при всех условиях. Сходные результаты наблюдают для композиции CAR+ Т-клеток, генерируемой от второго донора, за исключением того, что не наблюдается изменений экспрессирования Helios от Т-клеток от этого донора, при стимуляции при исследуемых условиях.

**Пример 11** Оценка активности CAR Т-клеток анти-ВСМА стимулируемых ВСМА-конъюгированными шариками в присутствии или в отсутствие леналидомида

**А. Эффекторные ответы**

[0764] Оттаивают замороженные с помощью крионики CAR Т-клетки анти-ВСМА, полученные, по существу, как описано в Примере 1, и приготовленные при отношении Т-клеток CD4+ и CD8+ 1:1. Если не указано иного, шариками (диаметр примерно 4,5 мкм) от 5-мкг/мл или 50-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков, генерируемой, как описано в Примере 9, добавляют в лунки при отношении Т-клеток к шарикам 1:1 в присутствии или в отсутствие 5 мкг леналидомида. Клетки инкубируют до 14 дней и анализируют в различных временных точках на секретирование цитокинов, размножение клеток с помощью проточной цитометрии на суррогатный маркер EGFRt и на цитолитическую активность.

**а. Экспрессирование цитокинов**

*(i) Присутствие цитокинов в супернатанте*

[0765] Через двадцать четыре часа после добавления ВСМА-конъюгированных шариков, оценивают присутствие TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-2 в супернатантах культур. Как показано на Фигурах 21А-21С, инкубирование вместе с ВСМА-конъюгированными шариками индуцирует секретирование IFN $\gamma$  (Фиг.21А), IL-2 (Фиг.21В) и TNF- $\alpha$  (Фиг.21С) в супернатантах культур. Степень продуцирования цитокинов больше, когда клетки инкубируются вместе с шариками из 50-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков, по сравнению с 5-мкг/мл композицией ВСМА-конъюгированных шариков, это демонстрирует, что стимуляция CAR с помощью шариков ВСМА зависит от дозы. Как показано, леналидомид увеличивает ВСМА-индуцированное продуцирование цитокинов CAR+ Т-клетками после стимуляции ВСМА-конъюгированными шариками.

[0766] В другом иллюстративном исследовании, две различных композиции CAR Т-клеток анти-ВСМА генерируют от разных доноров, каждая содержит Т-клетки,

экспрессирующие один и тот же CAR анти-BCMA. Клетки оттаивают и инкубируют вместе с шариками (диаметр примерно 4,5 мкМ) из 5-мкг/мл или 200-мкг/мл композиции BCMA-конъюгированных шариков, генерируемой как описано в Примере 1. Инкубирование осуществляют при отношении Т-клеток к шарикам 1:1 в присутствии или в отсутствие 1 мкМ или 5 мкМ леналидомида. Через двадцать четыре часа после добавления BCMA-конъюгированных шариков, оценивают продуцирование IL-2 CAR+ Т-клетками анти-BCMA в супернатантах культур. Как показано на Фиг.21D, более высокое продуцирование IL-2 наблюдают в присутствии стимуляции высокой концентрацией антигена (200 мкг/мл BCMA-конъюгированных шариков), по сравнению со стимуляцией более низкой концентрацией антигена (5 мкг/мл BCMA-конъюгированных шариков). Леналидомид, либо при 1 мкМ, либо при 5 мкМ, увеличивает продуцирование цитокинов в присутствии стимуляции как высокой, так и низкой концентрации антигена.

*(ii) Внутриклеточные уровни цитокинов*

[0767] CAR+ Т-клетки анти-BCMA инкубируют в присутствии 1 мкМ леналидомида или несущей среды и 50 мкг/мл BCMA-Fc-конъюгированных шариков в течение 2 часов и клетки оценивают с помощью проточной цитометрии на фосфорилированный STAT 5. Для оценки уровней цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , CAR+ Т-клетки анти-BCMA инкубируют в присутствии 0,1 мкМ или 1 мкМ леналидомида или несущей среды и 5 мкг/мл, 50 мкг/мл или 200 мкг/мл BCMA-Fc-конъюгированных шариков в течение 24 часов. Клетки гейтируют на трансдуцированных живых клетках CD3+ и оценивают с помощью проточной цитометрии на внутриклеточную аккумуляцию цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в клетках CD4+ и CD8+.

[0768] Как показано на Фиг.22A, 2-часовая стимуляция антигеном увеличивает процент Т-клеток положительных относительно фосфорилированного STAT5, по сравнению с контролем без стимуляции (показано точечной линией). Результаты для внутриклеточных уровней цитокинов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  от CAR Т-клеток анти-BCMA, генерируемых репрезентативным донором нормальных CAR-Т-клеток показаны на Фиг.22B. В этом исследовании, продуцирование цитокинов CAR-Т анти-BCMA клетками увеличивается под действием леналидомида в широком диапазоне уровней и концентраций антигена.

**в. Пролиферация клеток**

[0769] Общее количество клеток, отслеживаемое в день 4 (Фиг.21E) и день 7 (Фиг.21F), увеличивается после стимуляции CAR+ Т-клеток анти-BCMA шариками из 50-мкг/мл композиции BCMA-конъюгированных шариков, но не из 5-мкг/мл композиции BCMA-конъюгированных шариков, по сравнению с клетками, присутствующими в момент начала инкубирования (штриховая линия). Малое увеличение пролиферации наблюдается у клеток, инкубируемых вместе с 50-мкг шариками в присутствии леналидомида в день 7.

[0770] Для дополнительной оценки пролиферации, клетки, содержащие CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-BCMA, метятся маркером пролиферации красителем CELLTRACE VIOLET (CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham MA) согласно протоколу производителя перед инкубированием вместе с BCMA-конъюгированными шариками.

Пролиферацию оценивают с помощью разбавления красителя с использованием проточной цитометрии на клетках, которые стимулируют шариками из 50-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков. По сравнению с пролиферацией в отсутствие леналидомида, имеется незначительная задержка в пролиферации как оценивается посредством разбавления CTV в присутствии леналидомида в день 4, но не в день 7 (Фиг.21G).

#### **с. Размножение**

[0771] Через четыре дня и семь дней после добавления ВСМА-конъюгированных шариков, инкубируемые клетки окрашивают с помощью CD4 или CD8 и антител анти-EGFR для определения процента клеток положительных относительно EGFRt как суррогата CAR+ Т-клеток. Во время высевания 26% CAR клеток CD4+ экспрессируют анти-ВСМА и 39% клеток CD8+ экспрессируют CAR анти-ВСМА, как определяется посредством окрашивания ВСМА-Fc. Процент Т-клеток CD4+ EGFRt+ увеличивается примерно от 26% в начале инкубирования до более чем 40% в день 4 (Фиг.21H) и до более 60% в день 7 (Фиг.21I), когда клетки инкубируют в присутствии шариков из 50-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков. Как показано на Фиг.21I, процент Т-клеток CD8+ EGFRt+ увеличивается в день 7 примерно от 38% в начале инкубирования до более 60%, когда клетки инкубируют в присутствии шариков из 50-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков. Степень размножения клеток является наибольшей, когда клетки инкубируют в присутствии шариков из 50-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков по сравнению с шариками из 5-мкг/мл композиции ВСМА-конъюгированных шариков. Присутствие леналидомида не влияет существенно на степень размножения CAR+ Т-клеток в этом исследовании.

#### **d. Цитолитическая активность**

[0772] Цитолитическая активность CAR+ Т-клеток после инкубирования вместе с ВСМА-конъюгированными шариками оценивается посредством инкубирования вместе с линией ВСМА-экспрессирующих целевых клеток RPMI-8226, которая представляет собой линию клеток ВСМА+ множественной миеломы. Через семь дней инкубирования CAR+ Т-клеток анти-ВСМА вместе с ВСМА-конъюгированными шариками (5 мкг/мл или 50 мкг/мл) в присутствии или в отсутствие леналидомида, шарики удаляют из культуры и клетки высевают вместе с целевыми клетками RPMI-8226 при отношении эффекторных клеток к целевым клеткам 3:1 или 1:1 при дополнительном присутствии или в отсутствие 5 мкМ леналидомида. Для осуществления цитолитического анализа, целевые клетки RPMI-8226 метят NucLight Red (NLR) чтобы сделать возможным отслеживание целевых клеток с помощью микроскопии. Цитолитическую активность оценивают посредством измерения потерь жизнеспособных целевых клеток в течение периода четыре дня, как определено посредством сигнала красной флуоресценции (с использованием INCUCYTE® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Количество жизнеспособных клеток нормируют на клетки в день 0 перед инкубированием вместе с целевыми клетками RPMI-8226.

[0773] Иллюстративные результаты при отношении эффекторных клеток к целевым клеткам 1:1 показаны на Фиг.21J. Как показано, CAR+ Т-клетки анти-ВСМА



дня, по сравнению с днем 7. Сходные воздействия на цитолитическую активность CAR+ Т-клеток анти-BCMA после предварительной обработки леналидомидом в течение 7 или 14 дней наблюдают у донора; цитолитическую активность после 21 дня предварительной обработки леналидомидом для этого донора не оценивают. Как показано на Фиг.23В, увеличение эффективности уничтожения для CAR+ Т-клеток анти-BCMA наблюдается для этого донора в клетках, которые предварительно инкубируют вместе с леналидомидом, во всех временных точках.

**Пример 12 Воздействия леналидомида на экспрессирование PD-1 и передачу сигналов PD-L1**

[0777] CAR Т-клетки анти-BCMA генерируются из образцов от репрезентативных здоровых доноров или из материала, полученного у пациентов с множественной миеломой, и культивируются вместе с 50 мкг/мл BCMA-Fc-конъюгированных шариков (генерируются, как описано в Примере 9) при отношении шарик : CAR+ Т-клетки 1:1, в течение 7 дней, в присутствии 1 мкМ леналидомида или контроля с несущей средой. Экспрессирование CD25, PD-1, Tim3 и Lag3 на CAR Т-клетках (используя антитело в качестве суррогатного маркера CAR), культивируемых при различных условиях, оценивается затем с помощью проточной цитометрии.

[0778] Такие CAR-Т-клетки анти-BCMA предварительно стимулируемые шариками в присутствии или в отсутствие леналидомида, или свежееоттаявшие CAR Т-клетки анти-BCMA, генерируемые из образцов от сравнимых доноров, затем освобождают от шариков, промывают и культивируют вместе с целевыми клетками RPMI-8226 (мечеными NucLight Red (NLR) чтобы сделать возможным их отслеживание с помощью микроскопии), в присутствии 1 мкМ леналидомида или контроля с несущей средой. Конкретно, для предварительно обработанных клеток, предварительная обработка которых осуществляется в присутствии леналидомида, клетки культивируют вместе с целевыми клетками в присутствии леналидомида; подобным же образом, для предварительно обработанных клеток, предварительная обработка которых осуществляется в присутствии несущей среды, клетки культивируют вместе с целевыми клетками в присутствии несущей среды. После совместного культивирования, цитолитическую активность оценивают посредством измерения потерь жизнеспособных целевых клеток в течение периода семи дней, как определяется посредством сигнала красной флуоресценции. Процент уничтожения нормируют на CAR Т-клетки анти-BCMA, предварительно стимулируемые шариками в присутствии несущей среды. Продуцирование цитокинов оценивают с помощью ELISA для супернатанта после культивирования вместе с целевыми клетками в течение 24 часов. Эксперименты осуществляют дважды на 3 донорах. Линейные модели фиксированных эффектов или модели смешанных эффектов используют для оценки значимости влияния лечения леналидомидом на цитолитическую активность и продуцирование цитокинов, с лечением, донором и временем лечения как фиксированными эффектами и леченым животным как случайным эффектом, сгруппированными в пределах времени, когда повторные измерения получают от одного и того же животного. Значения *P*

получают посредством тестов отношения правдоподобия, сравнивая полную модель с эффектом, представляющим интерес, с моделью без эффекта, представляющего интерес. [0779] Фиг.24А показывает результаты для антиген-CAR - специфичной цитолитической активности и Фиг.24В показывает результаты для продуцирования цитокинов для CAR Т-клеток анти-BCMA, которые предварительно стимулируют шариками BCMA (по сравнению со свежееоттаявшими (не стимулируемыми предварительно) CAR Т-клетками анти-BCMA) в совместных культурах, по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии или в отсутствие леналидомида. Предварительно стимулируемые CAR Т-клетки показывают уменьшение цитолитической активности ( $P=2,1 \times 10^{-4}$ ) и продуцирование цитокинов ( $P=0,03$  для IFN- $\gamma$ ) по сравнению со свежееоттаявшими CAR Т-клетками анти-BCMA. В отсутствие леналидомида при предварительной обработке и последующем совместном культивировании, предварительно стимулируемые CAR Т-клетки демонстрируют уменьшение уничтожения клеток и продуцирования цитокинов по сравнению со свежими CAR Т-клетками, показывая, что хроническая предварительная стимуляция приводит к функциональному ослаблению. Эти результаты согласуются с фенотипом подобным фенотипу истощения, индуцируемым посредством предварительной стимуляции BCMA-конъюгированными шариками. Присутствие леналидомида в ходе периода предварительной стимуляции сохраняет цитолитическую функцию ( $P=0,04$ ) и имеется тренд в направлении повышения продуцирования цитокинов, по сравнению с клетками, экспонируемыми для несущей среды в ходе периода предварительной стимуляции (Фиг.24В). Присутствие леналидомида в этом анализе согласуется с тем наблюдением, что леналидомид может уменьшить воздействия, показательные для фенотипа подобного фенотипу функционального истощения в предварительно стимулируемых CAR Т-клетках.

[0780] Как показано на Фиг.24С, оценивается фенотип CAR Т-клеток анти-BCMA, стимулируемых в течение 7 дней BCMA-шариками, и добавление леналидомида значительно увеличивает CAR+ жизнеспособность материала CAR Т анти-BCMA для 3 здоровых доноров ( $P=0,04$ ). Добавление леналидомида не изменяет общего количества клеток у всех доноров в этот 7-дневный период, и не наблюдается значительных различий в процентах CAR+ между CAR Т-клетками, обработанными несущей средой и леналидомидом. Фиг.24D показывает репрезентативные результаты анализа с помощью проточной цитометрии поверхностного экспрессирования CD25 и PD-1 (средняя интенсивность флуоресценции (MFI), для CAR Т-клеток анти-BCMA CD4+ или CD8+ после стимуляции (предварительной обработки) шариками BCMA в течение 7 дней, в присутствии или в отсутствие 1 мкМ леналидомида). Как показано, результаты показывают, что леналидомид уменьшает экспрессирование PD-1 CAR Т-клетками BCMA, в то же время увеличивая экспрессирование CD25 после пролонгированной стимуляции. Как показано на Фиг.24Е, анализ с помощью проточной цитометрии для всех трех доноров CAR Т показывает, что добавление леналидомида увеличивает поверхностное экспрессирование Tim3 в популяции CD8+ ( $P=4,0 \times 10^{-4}$ ), при смешанных воздействиях на популяцию CAR+

CD4<sup>+</sup>. У всех доноров и в популяциях CAR<sup>+</sup>, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>, леналидомид увеличивает уровень CD25 (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>;  $P=2,2 \times 10^{-16}$ ) и процент положительных относительно экспрессирования Lag3 (CD8<sup>+</sup>  $P<0,03$ ; CD4<sup>+</sup>  $P=0,002$ ). Заметим, что уменьшение процента клеток PD-1<sup>+</sup> наблюдается также в популяции CD4<sup>+</sup> ( $P=0,04$ ), при этом 2 из 3 доноров показывают также уменьшение популяции CD8<sup>+</sup>.

[0781] В другом исследовании, шарики, конъюгированные с рекомбинантным ВСМА человека, используют для стимуляции CAR Т-клеток при различных концентрациях для титрования величины стимуляции, либо при низкой (5 мкг/мл), либо при средней (50 мкг/мл), либо при высокой (200 мкг/мл) стимуляции. При условиях средней стимуляции, измеряют продуцирование секретируемых цитокинов через 24 часа после стимуляции и наблюдают 200% увеличение концентрации IL-2 и TNF- $\alpha$  по сравнению с контролем с несущей средой, при донор-зависимых увеличениях IFN- $\gamma$  (Фиг.25А). Клетки стимулируют ВСМА-конъюгированными шариками в течение 24 часов в присутствии 0,1 мкМ или 1,0 мкМ леналидомида или контроля с несущей средой. Ингибитор переноса белков добавляют в конечные часы инкубирования и клетки окрашивают на внутриклеточный IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ .

[0782] CAR Т-клетки анти-ВСМА, активированные шариками ВСМА, показывают уровень-зависимые воздействия стимуляции на продуцирование цитокинов, при этом 5-мкг шарики ВСМА вызывают ограниченное продуцирование эффекторных цитокинов CAR Т, по сравнению с 50-мкг и 200-мкг шариками ВСМА (Фиг.25В). Леналидомид увеличивает процент внутриклеточного окрашивания IFN- $\gamma^+$  и TNF- $\alpha^+$  при всех уровнях стимуляции для CAR Т-клеток, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>. Величина стимуляции либо повышает, либо понижает уровень IL-2 в ответ на леналидомид, при этом леналидомид уменьшает процент CAR<sup>+</sup> Т-клеток IL-2<sup>+</sup> при 50-мкг и 200-мкг стимуляции, но увеличивает процент CAR<sup>+</sup> Т-клеток IL-2<sup>+</sup> при условиях 5-мкг стимуляции. В отсутствие стимуляции, леналидомид не воздействует на продуцирование цитокинов CAR Т, это показывает, что усиление продуцирования цитокинов, обеспечиваемое леналидомидом, требует стимуляции.

[0783] В другом исследовании, чтобы узнать, могут ли леналидомид-индуцированные потенцирование активации CAR Т и продуцирование цитокинов пересилить PD-L1-медируемое ингибирование, клетки культивируют в присутствии шариков ВСМА, генерируемых, как описано в Примере 9, с дополнительным конъюгированием с рекомбинантным PD-L1-Fc человека или без него. Полученные от здоровых доноров или пациентов CAR Т-клетки стимулируют в присутствии ВСМА-конъюгированных шариков или ВСМА/PD-L1-конъюгированных шариков в течение 24 часов в присутствии 1 мкМ леналидомида. Продуцирование цитокинов измеряют в супернатанте. Результаты показаны на Фиг.25С. Как показано на Фиг.25С, оценка CAR Т-клеток от здоровых доноров и пациентов демонстрирует, что добавление рекомбинантного PD-L1 к шарикам с рекомбинантным ВСМА понижает уровни IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ . Показано, что обработка леналидомидом потенцирует уровни секретируемых цитокинов за пределы уровней от CAR Т-клеток, обработанных несущей средой, в присутствии PD-

L1. Результаты согласуются с тем выводом, что продуцирование цитокинов CAR-T анти-BCMA после инкубирования вместе с BCMA-конъюгированными шариками повышается под действием леналидомида в присутствии PD-L1-медируемого ингибирования.

**Пример 13 Анализ экспрессирования генов и доступности хроматина в CAR T-клетках в присутствии или в отсутствие леналидомида**

[0784] Экспрессирование генов и доступность хроматина в CAR T-клетках при стимуляции оценивают в присутствии или в отсутствие леналидомида. CAR-экспрессирующие T-клетки анти-BCMA, генерируемые от четырех (4) разных независимых доноров, стимулируют 50-мкг/мл BCMA-конъюгированными шариками в течение 24 часов (24 hr+stim) или 7 дней (d7+stim) или культивируют без стимуляции в течение 24 часов (24 hr), в присутствии или в отсутствие леналидомида (1 мкМ). Эксперименты осуществляют дважды на 3-4 донорах. CAR-экспрессирующие клетки оценивают посредством секвенирования РНК (РНК-seq) на экспрессирование генов и анализируют на транспозазадоступный хроматин с использованием секвенирования (АТАС-seq) для анализа доступности хроматина. Анализы осуществляют на 50000 клетках в каждой временной точке.

[0785] РНК-seq осуществляют на образцах комплементарной ДНК (кДНК), приготовленных из РНК, выделенных из культивируемых CAR-экспрессирующих клеток анти-BCMA. АТАС-seq осуществляют, в целом, как описано в Buenrostro et al., Nat Methods. (2013) 10(12): 1213-1218. Считываемые фрагменты АТАС со спаренными концами обрезают, совмещают с Bowtie2 и фильтруют относительно качества, длины фрагмента, дубликации и митохондриального вклада. Пики доступности АТАС-seq называют, используя MACS2 ( $q < 0,01$ ), и консенсусное множество генерируют из перекрывающихся пиков, присутствующих в 2 или более образцах, используя DiffBind. Анализ главных компонентов (PCA) осуществляют для наборов данных РНК-seq и АТАС-seq, генерируемых из DESeq2-нормированных отсчетов. Дифференциальное экспрессирование (DE, для РНК-seq) или доступность консенсусных пиков (DA, для АТАС-seq) вычисляют, моделируя эффекты донора (Доноры 1-4) и эффекты обработки (леналидомид по сравнению с несущей средой) через 24 часа и в день 7. Порог селекционного дифференциала локуса представляет собой  $q \leq 0,05$  и  $\log_2$ -кратное изменение  $\geq 0,5$  для РНК-seq или  $q \leq 0,1$  для АТАС-seq. Осуществляют анализ обогащения онтологии гена (GO) и определяют z-показатель активации на подмножестве генов, дифференциально экспрессируемых при  $q < 0,1$ , с использованием программного обеспечения Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Inc.), учитывая эффекты доноров в пределах каждого условия обработки. Анализ обогащения мотивов осуществляют для пиков, которые, как показано, являются более доступными в присутствии леналидомида, с помощью программного обеспечения HOMER, используя множество консенсусных пиков как фон для данных АТАС-seq дня 7 стимуляции (d7+stim).

[0786] Генерируют карты интенсивности РНК-seq на нормированных данных экспрессирования (транскрипты на миллион), усредненных по донорам, для каждого состояния и нормируют по строкам, используя z-показатели. Обогащение мотивов пиков

DA в день 7 осуществляют с помощью HOMER, используя множество консенсусных пиков как фон.

[0787] Результаты PCA, представляющие общее разнообразие экспрессирования генов или доступности хроматина на геноме, показаны на Фиг.26А (экспрессирование генов; на основе результатов РНК-seq) и Фиг.26В (доступность хроматина; на основе результатов АТАС-seq). Нарисованы эллипсы для указания групп, как это наблюдается, что главные факторы, вносящие вклад в разнообразие экспрессирования генов или доступности хроматина, представляют собой время культивирования и присутствие стимуляции. Клетки, культивируемые в присутствии леналидомида (кружки), демонстрируют другое общее экспрессирование генов и доступность хроматина, по сравнению с клетками, культивируемыми в отсутствие леналидомида (треугольники, несущая среда), показывая воздействие обработки леналидомидом для каждого донора и условий культивирования. Для обработки леналидомидом, общее направление изменения (показанное точечной линией между треугольником и кружком), сходно для каждого донора, и степень изменения, как правило, больше у клеток, культивируемых в течение 7 дней со стимуляцией, по сравнению с изменением у клеток, культивируемых в течение 24 часов, со стимуляцией или без нее. Таким образом, PCA демонстрирует образование кластеров на основе стимуляции (stim или no stim) и времени (24 часа или 7 дней) для наборов данных как РНК-seq (Фигура 26А), так и АТАС-seq (Фигура 26В).

[0788] Затем исследуют роль леналидомида после 24 часов или 7 дней стимуляции после учета разброса между донорами. Фигуры 27А-27D показывают изменения экспрессирования генов (Фигуры 27А и 27В, после 24-часового и 7-дневного культивирования со стимуляцией, соответственно) или доступности хроматина (Фигуры 27С и 27D, после 24-часового и 7-дневного культивирования со стимуляцией, соответственно) в присутствии леналидомида. Анализ РНК-seq показывает апрегулирование малого набора генов (214) через 24 часа и изменение большего количества генов (583) после 7 дней стимуляции в присутствии леналидомида (Фигуры 27А и 27В). Анализ АТАС-seq показывает ограниченный набор изменений доступности хроматина, ассоциированных с обработкой леналидомидом, после 24 часов стимуляции, с драматическим изменением профиля и увеличением количества сайтов с изменениями доступности хроматина (изменения доступности хроматина в 2804 пиках) после 7 дней стимуляции в присутствии леналидомида (Фигуры 27С и 27D). Эти результаты показывают, что обработка леналидомидом изменяет как транскрипционный, так и эпигенетический профиль CAR T-клеток.

[0789] Для дополнительной идентификации конкретных транскрипционных изменений, ассоциированных с обработкой леналидомидом, анализ онтологии генов применяют к набору данных РНК-seq и идентифицируются пути передачи биологических сигналов, которые обогащаются в дифференциально экспрессируемых генах (Фигуры 28А и 28В). Направленность и значимость воздействий на биологические пути показаны для 24 часов (Фиг.28А) или 7 дней (Фиг.28В). Результаты показывают, что присутствие

леналидомида дает в результате увеличение экспрессирования генов, вовлеченных в активацию и передачу сигналов Т-клеток. Результаты показывают, что пути, по-разному регулируемые в присутствии и в отсутствие леналидомида, показывают обогащение генов, ассоциированных с иммунными синапсами, генов, вовлеченных в передачу сигналов цитокинов, и генов, вовлеченных в пути активации Т-клеток. Конкретно, пути, ассоциированные с хемотаксисом Т-клеток (экстравазация лейкоцитов, интегрин, ILK и наборы CXCR4-ассоциированных генов), с внутриклеточной передачей сигналов и с цитоскелетом (Rac/Rho/Cdc42), апрегулируются в присутствии леналидомида в пределах 24 часов стимуляции по сравнению с контролем с несущей средой. В дополнение к этому, эти данные поддерживают увеличение путей передачи сигналов, связанных с ICOS - это данные, которые соответствуют предыдущим публикациям, демонстрирующим повышение уровня ICOS и ICOSL в популяции CD3<sup>+</sup> мононуклеаров периферической крови, обработанных леналидомидом *ex vivo* (Gorgun et al. (2010) Blood, 116:3227-3237). После 7 дней стимуляции, леналидомид апрегулирует пути, ассоциированные с ответом Т-клеток Th1 и совместной стимуляцией, уменьшая при этом сигнатуры Th2-ассоциированных генов.

[0790] Для выбранного подмножества генов, включая гены, вовлеченные в активацию и передачу сигналов Т-клеток, экспрессирование генов и изменение доступности хроматина в присутствии леналидомида сравниваются для клеток, культивируемых в течение 7 дней при стимуляции, для определения того, коррелирует ли доступность хроматина с транскрипцией. Фиг.29 показывает индивидуальные пики доступности хроматина (ромбики) и среднее изменение доступности хроматина для каждого гена (кружок) на графике зависимости от соответствующих изменений экспрессирования генов, измеренных с помощью РНК-seq, который показывает совпадение сигнала для двух способов. Среди доноров, значительное увеличение доступности хроматина наблюдается среди множества локусов, ассоциируемых с IFN- $\gamma$  и IL-2RA (CD25), и эти изменения коррелируют со значительным увеличением транскрипции. Что важно, апрегулирование IFN- $\gamma$  и CD25 поддерживает предыдущие данные экспериментов с хронической стимуляцией. В дополнение к этому, наблюдают также уменьшение доступности хроматина CD69 и CCR7 и транскрипции генов при обработке леналидомидом.

[0791] Анализируют набор данных ATAC-seq относительно обогащения мотивов, и результаты анализа обогащения мотивов для пиков с повышенной доступностью в присутствии леналидомида в культурах дня 7 показаны на Фиг.30. Мотивы, для которых предсказано связывание с различными факторами транскрипции, как понимается, должны быть вовлечены в активацию и передачу сигналов Т-клеток, включая AP-1/Jun и ядерный фактор  $\kappa$ B, они обогащены пиками с повышенной доступностью в присутствии леналидомида. Результаты согласуются с увеличением функциональной активности CAR-экспрессирующих Т-клеток в присутствии леналидомида.

[0792] Без желания ограничиваться теорией, исследования РНК- и ATAC-seq дают в

результате ряд возможностей увидеть возможные механизмы индуцируемых леналидомидом усилений функций CAR T. Во-первых, ряд транскрипционных изменений и изменений доступности хроматина, ассоциированных со стимуляцией и временем, преобладают по сравнению с воздействиями леналидомида, указывая на относительно небольшое воздействие леналидомида на транскрипционные сети. Во-вторых, изменения, ассоциированные с леналидомидом, являются широкими, включая ранние изменения в транскриптах, ассоциированных с восстановлением цитоскелета и хемотаксисом. После хронической стимуляции, появляется другая транскрипционная сигнатура, которая включает уменьшение транскриптов, ассоциированных с ответом Th2, контрольной точкой G2/M и ATM, вместе с увеличением для Th1, пероксисомного пролифератор-активируемого рецептора  $\gamma$  и генов, ассоциированных с актиновым цитоскелетом. Эти воздействия могут поддерживать роль обработки леналидомидом и контроля клеточного цикла и активации T-клеток. Предыдущие исследования также продемонстрировали воздействия IMiD на Th1- и Th2-ассоциированные сигнатуры, а также изменения элементов, ассоциированных с восстановлением цитоскелета и перемещением T-клеток. Продemonстрированные ранние изменения продуцирования цитокинов под действием леналидомида могут вносить вклад в изменение состояния T-клеток, что может одновременно усилить аспекты как памяти, так и эффекторной функции. В целом, эти результаты говорят, что дополнительные факторы, кроме обсуждаемых ранее, вовлечены в индуцированное леналидомидом пролонгирование функции CAR T, включая возможные изменения в контроле клеточного цикла.

[0793] Применение ATAC-seq дает дополнительную возможность увидеть потенциальные механизмы действия леналидомида. Хотя как стимуляция, так и время являются преобладающими движущими силами изменений доступности хроматина, обработка леналидомидом ассоциируется с увеличением доступности хроматина в локусах, обогащенных мотивами, ассоциированными с активацией и функцией T-клеток, после хронической стимуляции. Эти эпигенетические изменения совпадают с заметными функциональными изменениями в CAR T-клетках, инкубируемых вместе с леналидомидом. Изменения в сигнатурах доступности хроматина ассоциированы с истощением T-клеток и могут представлять собой более устойчивый показатель истощения, по сравнению с экспрессированием лигандов на поверхности T-клеток. Эти данные демонстрируют, что хроническая стимуляция леналидомидом дает в результате увеличение доступности хроматина и экспрессирования генов IL-2 и CD25 и уменьшение экспрессирования генов и доступности хроматина CCR7 и CD69. Предыдущие исследования говорят, что CCR7-экспрессирующие клетки продуцируют более высокие уровни IL-2; однако, настоящие исследования показывают, что путь IL-2 можно изменить независимо от леналидомида, что дает в результате альтернативное состояние T-клеток. CD69, маркер активации T-клеток, содержит элемент, чувствительный к ядерному фактору kB, который требуется для ответа CD69 на TNF- $\alpha$ . Замыкание CD69-ассоциированного хроматина и уменьшение количества транскриптов может представлять собой реакцию на распределенное по времени

увеличение продуцирования TNF- $\alpha$  CAR T-клетками, культивируемыми вместе с леналидомидом, или оно может представлять собой ответ T-клеток на увеличение активации в присутствии леналидомида. Клетки, обработанные леналидомидом, демонстрируют увеличение обогащения мотива факторов транскрипции факторов, ассоциированных с активацией T-клеток, поддерживая ту идею, что эти клетки экспонируются для распределенной по времени передачи сигналов активации. В целом, леналидомид-индуцированное состояние CAR T-клетки содержит элементы как функции эффекторной T-клетки, включая увеличение продуцирования IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , так и функцию T-клетки памяти, включая повышение уровня IL-2 и долговременную пролиферацию.

**Пример 14** Оценка фармакодинамического ответа фактора транскрипции Ikaros в CAR-экспрессирующих T-клетках в присутствии Соединения 1 или леналидомида

[0794] Композиции T-клеток, содержащие CAR-экспрессирующие T-клетки анти-CD19, генерируют из образцов лейкоцитоза от трех здоровых взрослых доноров людей с помощью процесса, включающего селекцию T-клеток (включая клетки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) на основе иммунного сродства из образцов, с получением в результате двух композиций, обогащенных клетками CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>, соответственно. Клетки инкубируют в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или леналидомида и оценивают экспрессирование факторов транскрипции Ikaros.

[0795] Клетки композиций, обогащенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, активируются по отдельности шариками анти-CD3/анти-CD28 и подвергаются лентивирусному трансдуцированию вектором, кодирующим CAR анти-CD19. CAR анти-CD19 содержит scFv анти-CD19, полученный из антитела мышинных (вариабельную область, полученную из FMC63), спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-зета. Конструкт экспрессии в вирусном векторе дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит как суррогатный маркер для экспрессирования CAR, который отделен от последовательности CAR последовательностью рибосомального проскока T2A. Затем трансдуцированные популяции инкубируются по отдельности в присутствии стимулирующих реагентов для размножения клеток. Размноженные клетки CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> приготавливают и криоконсервируют по отдельности и хранят. Криоконсервированные CAR-экспрессирующие клетки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> анти-CD19 от каждого донора оттаивают и объединяют при отношении CAR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> приблизительно 1:1 перед использованием.

[0796] Приблизительно  $2,5 \times 10^5$  клеток (T-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, объединенных при отношении 1:1) генерируемой композиции CAR<sup>+</sup> T-клеток стимулируют в течение ночи реагентом специфичным к CAR, а затем клетки инкубируют вместе леналидомидом (100 нМ - 10000 нМ), Соединением 1 (10 нМ - 3000 нМ) или контролем с несущей средой в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Оцениваемые концентрации Соединения 1 и леналидомида охватывают клинические C<sub>max</sub> и C<sub>min</sub>. После инкубирования, CAR-экспрессирующие T-

клетки анти-CD19 окрашивают антителами и анализируют с помощью проточной цитометрии для оценки поверхностного экспрессирования CD4, CD8 и суррогатного маркера для экспрессирования CAR, и внутриклеточных уровней Ikaros в клетках CAR+ CD4+ или CAR+ CD8+. Значение медианной интенсивности флуоресценции (MFI) для Ikaros нормируют и вычисляют как процент относительно контроля с несущей средой.

[0797] Как показано на Фиг.31А, наблюдается концентрационно-зависимое уменьшение экспрессирования внутриклеточного Ikaros, как в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4+ анти-CD-19, так и в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD8+ анти-CD-19 после инкубирования вместе с Соединением 1 или леналидомидом. Больше уменьшение экспрессирования Ikaros наблюдается в клетках в присутствии Соединения 1 по сравнению с леналидомидом. EC50 для уменьшения экспрессирования Ikaros вычисляют, как определено, по концентрации ингибитора, который уменьшает MFI Ikaros до 50% от его максимальной MFI в отсутствие ингибитора. Значения EC50 для Соединения 1 и леналидомида показаны в Таблице Е5.

Таблица Е5. EC50Ikaros (нМ) в CAR+ Т-клетках CD4+ и в CAR+ Т-клетках CD8+.

	CD4+		CD8+	
	Леналидомид	Соединение 1	Леналидомид	Соединение 1
Донор 1	61,2	67	80,9	100,9
Донор 2	ND	41,5	ND	60,8
Донор 3	169,8	99,8	235,5	161,1

ND=не определено

[0798] Сходные результаты наблюдают для дополнительной композиции CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19 CD4+ и CD8+, после стимуляции в течение ночи реагентом специфичным для CAR в присутствии указанных концентраций леналидомида, Соединения 1 или контроля с несущей средой (Фиг.31В).

[0799] Соединение 1Ю как известно, связывает Ikaros и Aiolos с цереблонеом (CRBN), запускающим убиквитинирование и деградацию протеасом. Для оценки экспрессирования Ikaros и Aiolos в стимулируемых CAR+ Т-клетках анти-CD19, CAR Т-клетки CD4+ и CD8+ стимулируют 1 мкг/мл CAR-специфичного антиидиотипического антитела в присутствии Соединения 1 при концентрации в пределах от 10 до 10000 нМ. После инкубирования в течение ночи, CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 окрашивают антителами и анализируют с помощью проточной цитометрии для оценки внутриклеточных уровней Ikaros и Aiolos в CAR+ клетках CD4+ или CAR+ CD8+, как измерено с помощью медианной интенсивности флуоресценции (MFI). Как показано на Фиг.31С, концентрационно-зависимое уменьшение внутриклеточного экспрессирования Ikaros и Aiolos наблюдается как в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4+ анти-CD-19, так и в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD8+ анти-CD-19 после инкубирования вместе с Соединением 1.

**Пример 15 Оценка функциональных воздействий на CAR-экспрессирующие Т-клетки после инкубирования вместе с целевыми клетками в присутствии Соединения**

### 1 или леналидомида

[0800] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 (содержащие клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1) генерируют, по существу, как описано в Примере 14, и инкубируют вместе с целевыми клетками K562, трансдуцированными CD19 человека (K562.CD19), в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) (при концентрациях 10 нМ, 100 нМ, 500 нМ и 1000 нМ), леналидомида (при концентрациях 100 нМ, 1000 нМ и 10,000 нМ) или контроля с несущей средой при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Оценивают экспрессирование цитокинов, цитотоксичность целевых клеток и экспрессирование поверхностных маркеров CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19.

#### А. ПРОДУЦИРОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ

[0801] Для оценки продуцирования цитокинов,  $1 \times 10^5$  клеток CAR+ анти-CD19 (Т-клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1) инкубируют вместе с целевыми клетками K562.CD19 при отношении Е:Т 5:1 или 2,5:1 в присутствии или в отсутствие леналидомида или Соединения 1, как описано выше. Через 24 часа, супернатанты собирают и анализируют на продуцирование цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ .

[0802] Как показано на Фигурах 32А (Соединение 1) и 32В (леналидомид), продуцирование цитокинов увеличивается в присутствии Соединения 1 или леналидомида, соответственно, концентрационно-зависимым образом, по сравнению с контролем с несущей средой, при отношениях Е:Т как 5:1, так и 2,5:1. Имеются различия в уровнях цитокинов для разных доноров. Обработка Соединением 1 дает в результате большее продуцирование цитокинов для множества условий по сравнению с обработкой леналидомидом при эквивалентных концентрациях. Увеличение является статистически значимым, как определено по увеличению продуцирования цитокинов в присутствии 100 нМ и 1000 нМ Соединения 1, по сравнению с эквивалентной концентрацией леналидомида при отношении Е:Т 2,5:1 и 5:1, как определено с использованием ослабленного параметрического t-теста с исправленным интервалом Велча, смотри Таблицу Е6 (Р-значения при Е:Т 2,5:1 /Р-значения при Е:Т 5:1).

[0803] Таблица Е6. Продуцирование цитокинов CAR-экспрессирующими Т-клетками анти-CD19, обработанными Соединением 1 или леналидомидом.

Концентрация (нМ):	Донор 1		Донор 2		Донор 3	
	100	1000	100	1000	100	1000
IFN- $\gamma$	***/*	*/ns	ns/ns	ns/***	***/**	***/**
IL-2	**/*	*/*	**/*	ns/ns	ns/*	ns/ns
TNF- $\alpha$	***/*	***/**	**/*	***/**	**/*	**/**

$p \leq 0,05$ : \*;  $p \leq 0,01$ : \*\*;  $p \leq 0,001$ : \*\*\*; ns: незначительно

#### В. ЦИТОЛИТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ

[0804] Для оценки цитолитической функции,  $1 \times 10^5$  или  $5 \times 10^4$  CAR+ клеток анти-CD19 (Т-клеток CD4+ и CD8+, объединенных при отношении 1:1) инкубируют вместе с

$2 \times 10^4$  целевых клеток K562.CD19 при отношении Е:Т 5:1 или 2,5:1 в присутствии или в отсутствие леналидомида или Соединения 1 или контроля с несущей средой, как описано выше. Целевые клетки K562.CD19 трансдуцируют NucLight Red чтобы сделать возможным их отслеживание с помощью микроскопии. Цитолитическую активность оценивают посредством измерения потерь жизнеспособных целевых клеток за период пять дней, как определено посредством сигнала красной флуоресценции (с использованием IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Показатель гибели определяют с использованием формулы:  $1/AUC$  и показатель гибели нормируется на клетки CAR+, культивируемые совместно с целевыми клетками, которые инкубируют вместе с контролем с несущей средой (считается за 100% гибели).

[0805] Как показано на Фиг.33А, Соединение 1 и леналидомид, как правило, оказывают ограниченное воздействие на цитолитическую функцию CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19. Когда CAR стимулируют в присутствии более высокого уровня антигена, как присутствует в совместных культурах, содержащих, при отношении Е:Т 2 5:1, Соединение 1 и леналидомид, это слегка уменьшает цитолитическую активность CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19 для некоторых доноров. Когда CAR стимулируют в присутствии более низких уровней антигена, как присутствует в совместных культурах, содержащих отношение Е:Т 5:1, наблюдают небольшое, но консистентное увеличение цитолитической активности CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 против целевых клеток от Т-клеток, которые инкубируют в присутствии высоких концентраций Соединения 1 или леналидомида для Донора 2 хотя не наблюдается воздействий для Доноров 1 и 3.

### **С. ЭКСПРЕССИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ Т-КЛЕТОК**

[0806] Для оценки поверхностного экспрессирования различных маркеров Т-клеток,  $1 \times 10^5$  целевых клеток K562.CD19 инкубируют вместе с CAR+ клетками анти-CD19 (Т-клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1) при отношении Е:Т 5:1 или 2,5:1 в присутствии или в отсутствие леналидомида или Соединения 1 или контроля с несущей средой, как описано выше. Через 24 часа CAR-экспрессирующие Т-клетки окрашивают на CD3, CD4, CD8 и суррогатный маркер на экспрессирование CAR и также на следующие поверхностные маркеры: CD69, CD107a, PD-1, CD25, CD62L, CCR7, CD45RO, CD27 и LAG3.

[0807] Уровни экспрессирования выбранных маркеров на CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4+ и CAR-экспрессирующих Т-клетках CD8+ изменяются, как правило, меньше, чем два раза по отношению к совместным культурам с контролем с несущей средой. Изменения экспрессирования маркеров в присутствии леналидомида или Соединения 1 являются донор-зависимыми, хотя для оцениваемых маркеров памяти экспрессирование CD45RO увеличивается, а экспрессирование CD27 уменьшается для всех доноров и отношений Е:Т. Экспрессирование CD27 даунрегулируется концентрационно-зависимым образом в ответ на Соединение 1 или леналидомид. Экспрессирование CD69 и LAG3 увеличивается концентрационно-зависимым образом для клеток, полученных от донора 3,

после инкубирования вместе с Соединением 1, но не после инкубирования вместе с леналидомидом полученных от того же донора клеток CAR+. Экспрессирование других оцениваемых маркеров активации остается неизменным у доноров, леченых леналидомидом или Соединением 1. Результаты согласуются с тем наблюдением, что Соединение 1 и леналидомид имеют потенциал собственного модулирования ранних фенотипов активации CAR-экспрессирующих Т-клеток.

#### **D. CD19-зависимое продуцирование цитокинов и цитолитическая активность**

[0808] Исследования, сходные с проделанными выше, осуществляют, используя целевые клетки Granta-519 или Raji для оценки продуцирования цитокинов и цитолитической активности CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 при совместном культивировании с целевыми клетками. Как показано на Фиг.33B клетки Raji выбирают по высокому экспрессированию молекулы CD1 на поверхности клетки 9, по сравнению с Granta-519, как количественно определяется с помощью проточной цитометрии. Установление количества CD19 осуществляют с помощью стандартной кривой, генерируемой с использованием молекул эквивалентных растворимых флуорофорных шариков.

[0809] CAR+ Т-клетки анти-CD19 (Т-клетки CD4+ и CD8+ объединенные при отношении 1:1) инкубируют вместе с целевыми клетками Granta-519 или Raji при отношении E:T 2,5:1 в присутствии 100 или 1000 нМ (0,1 и 1 мкМ, соответственно) Соединения 1. После 24 часов культивирования отслеживают продуцирование цитокинов в супернатанте. Как показано на Фиг.33C, IFN- $\gamma$  показывает концентрационно-зависимое повышение уровня в присутствии Соединения 1 для CAR-экспрессирующих Т-клеток CD8+ для различных доноров и IL-2 демонстрирует чуть более высокое увеличение в присутствии 100 нМ (0,1 мкМ) Соединения 1 чем при 1000 нМ (1 мкМ), при этом оба они показывают увеличение по сравнению с контролем. Цитолитическую активность также измеряют для пула доноров в зависимости от времени совместного культивирования. Как показано на Фиг.33D, Соединение 1 имеет ограниченное воздействие на цитолитическую активность в зависимости от времени для CAR-экспрессирующих Т-клеток CD8+.

#### **Пример 16 Оценка продуцирования цитокинов и экспрессирования поверхностных маркеров CAR-экспрессирующих Т-клеток после стимуляции антиидиотипическим антителом в присутствии Соединения 1 или леналидомида**

[0810] Исследования сходные с описанными в Примере 15 осуществляют для оценки продуцирования цитокинов и экспрессирования поверхностных маркеров после CAR-зависимой стимуляции CAR-экспрессирующих Т-клеток в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или леналидомида, за исключением того, что CAR-экспрессирующие клетки стимулируют антиидиотипическим антителом. Антиидиотипическое антитело используют для моделирования переменных уровней стимуляции на совместных культурах, что, как правило, невозможно для целевых клеток K562.CD19, поскольку экспрессирование

антигена на клетках K562.CD19 является однородно высоким.

[0811] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 (содержащие Т-клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1) генерируются по существу, как описано в Примере 14. Приблизительно  $1 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток добавляют в лунки 96-луночного планшета, которые предварительно покрывают антиидиотипическим антителом специфичным к scFv CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 при концентрациях 0, 0,3, 3 и 30 мкг/мл. Клетки культивируют в присутствии Соединения 1 (при концентрациях 100 нМ и 1000 нМ), леналидомида (при концентрациях 500 нМ и 5000 нМ) или контроля с несущей средой при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Оценивают экспрессирование цитокинов и экспрессирование поверхностных маркеров CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19.

#### **А. ПРОДУЦИРОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ**

[0812] Супернатанты от стимулируемых культур собирают через 24 часа и анализируют на продуцирование цитокинов. На Фигурах 34А-34С, уровень продуцирования цитокинов в отсутствие Соединения 1 или леналидомида (контроль с несущей средой) показан с помощью штриховой линии. Как показано на Фигурах 34А и 34В, продуцирование IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  увеличивается по отношению к контролю с несущей средой после обработки Соединением 1 или леналидомидом, соответственно. Увеличение является особенно очевидным при промежуточном уровне стимуляции 3 мкг/мл антиидиотипического антитела. Фиг.34С изображает результаты сходного эксперимента, оценивающего продуцирование цитокинов в супернатантах от Т-клеточных культур, собранных через 24 часа после стимуляции, в присутствии повышенных концентраций агонистического антитела анти-ID и Соединения 1 (100 нМ и 1000 нМ).

[0813] Кондиционированные супернатанты от культур стимулируемых CAR Т собирают после обработки в течение ночи и инкубируют вместе со свежееоттаявшими CAR+ Т-клетками от трех доноров, отдельно или в присутствии антитела, блокирующего IL-2. После кратковременной стимуляции, CAR Т-клетки оцениваются затем с помощью проточной цитометрии на фосфолированный STAT5. Как показано на Фиг.34D, медианная интенсивность флуоресценции фосфолированного STAT5 (pSTAT5) увеличивается после обработки Соединением 1 для обеих используемых концентраций.

#### **В. ЭКСПРЕССИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ Т-КЛЕТОК**

[0814] Экспрессирование поверхностных маркеров CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-CD19 оценивают после 4 дней культивирования при различных концентрациях антиидиотипического антитела в присутствии Соединения 1 или леналидомида. CAR-экспрессирующие Т-клетки окрашивают на CD3, CD4, CD8 и суррогатный маркер экспрессирования CAR, а также на следующие маркеры: CD25, PD-1 и CD69.

[0815] Фигуры 35А и 35В показывают экспрессирование поверхностных маркеров клеток на CAR-экспрессирующих клетках CD4+ и CD8+, соответственно, на клетках, стимулируемых в присутствии Соединения 1 и Фигуры 36А и 36В показывают

экспрессирование поверхностных маркеров клеток на CAR-экспрессирующих клетках CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, соответственно, на клетках, стимулируемых в присутствии леналидомида. На фигурах уровень экспрессирования поверхностного маркера в отсутствие Соединения 1 или леналидомида (контроль с несущей средой) показан штриховой линией. Как показано, повышение уровня поверхностных маркеров CD25 и CD69 наблюдается в CAR-экспрессирующих Т-клетках CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в присутствии Соединения 1 или леналидомида в некоторых полученных от доноров CAR-экспрессирующих клетках и в зависимости от величины стимуляции CAR. Экспрессирование PD-1 также увеличивается в присутствии Соединения 1 или леналидомида в клетках, генерируемых, по меньшей мере, от одного донора, хотя уровни PD-1 не изменяются или понижаются в клетках, генерируемых от других доноров. Повышение экспрессирования суррогатного маркера экспрессирования CAR наблюдается после добавления Соединения 1 или леналидомида при субоптимальной дозе антиидиотипического антитела 0,3 мкг/мл, но при более высоких концентрациях антиидиотипического антитела, экспрессирование суррогатного маркера не изменяется или уменьшается.

**Пример 17 Оценка экспрессирования поверхностного маркера и потенциала размножения CAR-экспрессирующих Т-клеток после серийной стимуляции в присутствии Соединения 1 или леналидомида**

[0816] Серийная стимуляция CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 осуществляется для оценки кратковременных и долговременных воздействий 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) и леналидомида. Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 (содержащие Т-клетки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, объединенные при отношении 1:1) генерируют, по существу, как описано в Примере 14. Генерируемые комбинации CAR<sup>+</sup> Т-клеток добавляют при  $1 \times 10^5$  клеток на лунку в 96-луночный планшет и инкубируют вместе с облученными положительными по красной флуоресценции целевыми клетками K562.CD19 в присутствии Соединения 1, леналидомида или контроля с несущей средой при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> при двух различных отношениях эффекторных клеток к целевым (E:T) 10:1 или 2,5:1. Инкубирование осуществляют в присутствии Соединения 1 (10, 100 или 500 нМ), леналидомида (100 или 1000 нМ) или контроля с несущей средой. Каждые 3-4 дня (начало каждого нового захода), клетки считают. Затем клетки собирают и повторно высевают при  $1 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19 со свежими средами, вновь добавляемым Соединением 1 или леналидомидом при такой же концентрации и со свежееоблученными целевыми клетками K562.CD19. Это повторяют в течение 7 заходов серийной стимуляции и клетки оценивают в различные моменты времени на экспрессирование поверхностных маркеров, цитолитическую активность и потенциал размножения.

**А. ЭКСПРЕССИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ**

[0817] Экспрессирование выбранных поверхностных маркеров оценивают на клетках в день 4 (то есть, через 4 дня после первой стимуляции) и в день 28 (то есть, через 4 дня после седьмой стимуляции). Конкретно, собранные клетки анализируют с помощью

проточной цитометрии на CD3, CD4, CD8 и на суррогатный маркер экспрессирования CAR, а также на следующие поверхностные маркеры: CD69, CD107a, PD-1, CD25, CD62L, CCR7, CD45RO, CD27 и LAG3.

[0818] Изменения оцениваемых поверхностных маркеров на CAR-экспрессирующих клетках CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> после инкубирования вместе с Соединением 1 и леналидомидом наблюдаются по-разному для всех доноров и отношений Е:Т, хотя изменения экспрессирования являются более выраженными в день 28 по сравнению с днем 4. В день 4, CD25 и LAG3 апрегулируются у всех трех доноров в ответ на обработку Соединением 1 или леналидомидом, при этом большее уменьшение наблюдают на клетках со дня 28 по сравнению с днем 4. Уровень CCR7, как правило, уменьшается в день 28 среди лечебных групп, что согласуется с той возможностью, что инкубирование вместе с целевыми клетками в присутствии Соединения 1 или леналидомида может смещать продукт Т-клеток в направлении фенотипа, ассоциированного со статусом терминально дифференцированных эффекторов. PD-1 даунрегулируются до некоторой степени у всех доноров и при обоих отношениях Е:Т на клетках в день 4 и день 28 после обработки Соединением 1 или леналидомидом, при этом большее даунрегулирование происходит на клетках в день 28. Как показано на Фигурах 37А и 37В, экспрессирование CD28 уменьшается доза-зависимым образом в присутствии повышающихся концентраций Соединения 1 и леналидомида, соответственно, на CAR-экспрессирующих Т-клетках, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>, от всех трех доноров. Все вместе изменения поверхностных маркеров в день 28 по сравнению с днем 4 согласуются со способностью Соединения 1 и леналидомида воздействовать на CAR<sup>+</sup> Т-клетки после долговременной обработки.

### **В. ЦИТОЛИТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ**

[0819] В день 24 после серийной стимуляции, цитолитическую активность CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 оценивают, в целом, как описано в Примере 15В. Как показано на Фиг.38, долговременная обработка как Соединением 1, так и леналидомидом, способна увеличить цитолитическую активность CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19.

### **С. РАЗМНОЖЕНИЕ**

[0820] Для оценки воздействия Соединения 1 и леналидомида на потенциал размножения CAR<sup>+</sup> Т-клеток, количества CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 считают после каждого захода стимуляции и вычисляют удвоения клеток.

[0821] Как показано на Фиг.39А, при отношении Е:Т 2,5:1, CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19, обработанные Соединением 1 при концентрации 500 нМ, имеют отсчеты клеток сравнимые с обработанной контрольной группой до 3-4 захода стимуляции для всех доноров. Сходные результаты наблюдают при отношении Е:Т 10:1 для двух доноров. При концентрации Соединения 1 выше 500 нМ, количество удвоений клеток CAR<sup>+</sup> при последующих заходах ниже, чем для необработанных контрольных групп. В противоположность этому, после 24 дней обработки Соединением 1 при более низких концентрациях 10 нМ и 100 нМ, отсчеты клеток для CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-

CD19 выше, чем необработанные контроли для двух из трех доноров (Фиг.39В).

[0822] Как показано на Фиг.40А, при отношении Е:Т 2,5:1 в клетках, обработанных 1000 нМ леналидомида, более низкие удвоения клеток наблюдают только у двух доноров и не до более поздних заходов стимуляции. Этот результат показывает некоторое различие активности Соединения 1 и леналидомида, поскольку 500 нМ Соединения 1 уменьшают отсчеты клеток для всех доноров при этом отношении Е:Т. При отношении Е:Т 10:1, наблюдают уменьшение удвоений клеток после 3-4 заходов стимуляции в присутствии 1000 нМ леналидомида для клеток, генерируемых от всех доноров (Фиг.40А). Как показано на Фиг.40В, обработка леналидомидом при более низкой концентрации 100 нМ увеличивает отсчеты CAR+ Т-клеток для двух из трех доноров.

[0823] Эти результат согласуются с тем наблюдением, что пролонгированная обработка CAR-экспрессирующих Т-клеток Соединением 1 или леналидомидом при физиологически релевантных концентрациях может увеличить долговременный потенциал пролиферации CAR-экспрессирующих Т-клеток, в то время как более высокие концентрации могут быть вредными для долговременных характеристик.

#### **Пример 18 Оценка противоопухолевой эффективности CAR-экспрессирующих Т-клеток в комбинации с Соединением 1 *in vivo***

[0824] Противоопухолевую эффективность CAR-экспрессирующих Т-клеток в комбинации с 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-дионом (Соединением 1) оценивают посредством отслеживания опухоли в модели привитой опухоли. Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19, содержащие Т-клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1, генерируются, по существу, как описано в Примере 14. Композиции Т-клеток генерируются от трех разных доноров.

[0825] Мышам NOD.Cg.Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) делают внутривенную инъекцию (i.v.)  $0,5 \times 10^6$  клеток опухоли лимфомы Raji (иммортилизованная линия опухолевых клеток В лимфоцитов человека, которая экспрессирует CD19), которые трансфицированы люциферазой светлячков (Raji-ffluc). Дают возможность для прививки опухоли в течение 6 дней и проверяют ее, используя биолюминесцентное получение изображений. В День 7, мыши либо не принимают лечения, либо получают одну внутривенную (i.v.) инъекцию CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19 при низкой дозе ( $0,5 \times 10^6$  клеток) или при высокой дозе ( $1,0 \times 10^6$  клеток). В одной группе для исследований (обозначается “Одновременное”), мышам вводят Соединение 1 при дозе 0,3 мг/кг или контроль с несущей средой посредством внутрибрюшинной инъекции за день до введения CAR-экспрессирующих клеток (день 6), это продолжается ежедневно в течение всего исследования. Во второй группе (обозначается “Замедленное”), мышам вводят либо контроль с несущей средой, либо Соединение 1 при дозе 0,3 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции, начиная с дня 14, это после пика размножения CAR-экспрессирующих Т-клеток, и введение продолжают ежедневно в течение всего исследования. Опухолевую нагрузку оценивают посредством биолюминесценции каждые 10 дней. Для биолюминесцентного получения изображений, мыши принимают

внутрибрюшинные (i.p.) инъекции субстрата люциферина (CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA) повторно суспендированного в PBS (15 мкг/г массы тела). Определяют среднюю интенсивность (фотон/сек/см<sup>2</sup>/стерадиан). Выживаемость мышей, леченых, как описано выше, оценивают и сравнивают до дня 100 после вливания CAR-экспрессирующих Т-клеток.

[0826] В этом исследовании, комбинация с Соединением 1, как наблюдается, уменьшает опухолевую нагрузку и улучшает данные по выживаемости как в группе “Одновременное”, так и в группе “Замедленное”, по сравнению с введением только CAR-экспрессирующих клеток. Репрезентативные кривые выживаемости, по методу Каплана-Майера (GraphPad Prism 7.0, GraphPad Software, La Jolla), от одного донора показаны на Фиг.41. Как показано, Соединение 1, вводимое либо замедленно, либо одновременно с CAR Т-клетками анти-CD19 при низкой и высокой дозе, дает в результате больший процент выживаемости мыши, по сравнению с мышами, получающими только введение CAR Т-клеток анти-CD19. Таблица E7 приводит медианную выживаемость мышей в этом исследовании.

ТАБЛИЦА E7: Выживаемость					
		Высокая доза		Низкая доза	
		Медианная выживаемость (дни после CAR-T)	Значение P*	Медианная выживаемость (дни после CAR-T)	Значение P*
CAR-T анти-CD19		77,5		39	
CAR-T анти-CD19+Соединение (одновременное)	1	Не определено	0,0301	92	0,0013
CAR-T анти-CD19+Соединение (замедленное)	1	Не определено	0,1209	55	0,0521

\* тест Гехана-Бреслоу-Уилкинсона

#### Пример 19 Передача сигналов CAR в присутствии Соединения 1

[0827] Клетки линии репортерных клеток трансдуцируют, используя лентивирусные векторы, кодирующие CAR анти-CD19, описанный в Примере 14, или CAR анти-ROR1 вводят в клетки линий репортерных клеток Jurkat для оценки передачи сигналов CAR в присутствии стимуляции CAR. CAR анти-ROR1 содержит scFv анти-ROR1, полученный из антитела мышинных, спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-зета. Линии репортерных клеток Jurkat содержат красный флуоресцентный белок, вставленный посредством нокина в эндогенный ген *Nr4a1* (*Nur77*). Это дает в результате экспрессирование репортера, контролируемого эндогенными транскрипционными регуляторными элементами гена *Nur77*.

[0828] CAR-экспрессирующие репортерные клетки анти-CD19 или CAR-экспрессирующие репортерные клетки анти-ROR1 инкубируют в присутствии 3-(5-амино-

2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или контроля с несущей средой в течение до 6 часов в присутствии связанного на планшете анти-идиотипического (ID) антитела специфичного к соответствующему CAR. Как показано на Фиг.42, увеличение репортерного сигнала наблюдают после CAR-специфичной стимуляции CAR анти-CD19 или CAR анти-ROR1, он в каждом случае увеличивается в присутствии Соединения 1. Результаты согласуются с тем выводом, что Соединение 1 можно использовать для усиления передачи сигналов CAR после распознавания антигена CAR.

**Пример 20 Долговременная стимуляция функции CAR Т-клеток и воздействие Соединения 1 на функцию CAR Т после долговременной стимуляции**

[0829] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 (содержащие Т-клетки CD4+ и CD8, объединенные при отношении 1:1) генерируют от трех разных здоровых доноров, по существу, как описано в Примере 14. Чтобы подвергнуть клетки воздействию условий хронической стимуляции, CAR+ Т-клетки инкубируют вместе со связанным на планшете антиидиотипическим (анти-ID) антителом (смотри например, WO2018/023100) и инкубируют при 37°C в течение периода 6 дней.

[0830] После 6-дневного периода культивирования, CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 удаляют из культуры и инкубируют вместе с опухолевыми сфероидами A549 CD19+ (для повторного провоцирования CAR Т-клеток) при отношении эффекторных клеток к целевым 0,5:1, если не указано иного, в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1), при концентрациях в пределах от 0,001 мкМ до 10 мкМ или контроля с несущей средой до 10 дней. Опухолевые сфериды A549 CD19+ метят красителем, чтобы дать возможность для отслеживания лизиса клеток опухоли с помощью микроскопии в ходе анализа. Свежеоттаявшие CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19, которые не подвергаются воздействию условий хронической стимуляции, инкубируют вместе со сфероидами, параллельно, как контроли. Клетки оценивают в различные моменты времени на цитолитическую функцию, количество CAR Т-клеток и продуцирование цитокинов.

**1. Воздействие хронической стимуляции на Т-клетки**

[0831] Антиген-специфичную цитолитическую активность различных CAR-экспрессирующих Т-клеток оценивают, отслеживая флуоресценцию (показатель лизиса клеток опухоли) в зависимости от времени. Цитолитическая активность CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19, которая стимулируется в течение 6-дневного периода с использованием условий хронической стимуляции, уменьшается по сравнению с свежеоттаявшими CAR-экспрессирующими Т-клетками анти-CD19 от того же донора, как показано на Фиг.43А (показаны репрезентативные результаты от двух доноров). Объем опухоли (сфероид) также оценивают в зависимости от времени, как показано на Фиг.43В. Наблюдают уменьшение сокращения объема опухоли в присутствии хронической стимуляции по сравнению со свежими CAR Т-клетками.

[0832] Для дополнительной оценки активности хронически стимулируемых клеток,

CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19, которые стимулируют в течение 6-дневного периода, или свежееоттаявшие CAR-экспрессирующие клетки анти-CD19 от того же донора, которые хронически не стимулировались, совместно культивируются вместе с целевыми клетками K562.CD19 в течение 5 дней, и оценивают их цитолитическую активность и способность продуцировать цитокины. Как показано на Фиг.43С (левая панель), уровни секретирования IFN- $\gamma$  и IL-2 уменьшаются по сравнению с продуцированием цитокином свежееоттаявшими CAR-экспрессирующими Т-клетками анти-CD19 от того же донора. Цитолитическая активность хронически стимулируемых CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19 также уменьшается по сравнению со свежееоттаявшими клетками, как видно по уменьшению количества клеток опухоли (Фиг.43С правая панель),

[0833] Эти результаты согласуются с тем выводом, что 6-дневное культивирование, подвергающее CAR Т-клетки воздействию условий хронической стимуляции, дает в результате состояние истощения Т-клеток.

## **2. Воздействие сохранения от обработки Соединением 1 после долговременной стимуляции**

[0834] Репрезентативное изображение сфероидов A549 CD19+ после 9 дней совместного культивирования со свежееоттаявшими или хронически стимулируемыми CAR Т-клетками, которым 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион (Соединение 1) дается как обработка для сохранения, показано на Фиг.43D. Фигуры 43E и 43F показывают степень антиген-специфичной цитолитической активности в зависимости от времени (Фиг.43E) и уменьшение объема опухоли со временем (Фиг.43F левая панель) или после 9 дней совместного культивирования (Фиг.43F правая панель), наблюдаемое в этом исследовании для свежих CAR Т-клеток или хронически стимулируемых CAR-экспрессирующих Т-клеток в присутствии указанных концентраций Соединения 1 или несущей среды. Как показано, присутствие соединения, как наблюдается, восстанавливает продуцирование антиген-специфичных цитокинов и уменьшение опухоли под действием CAR Т-клеток, подвергаемых хронической стимуляции. Фиг.43G показывает кривую доза-реакция для этого воздействия на уменьшение объема опухоли в этом исследовании; согласующуюся с тем, что EC50 Соединения 1 для этого воздействия составляет 0,1267 мкМ. Фиг.43H показывает объем опухоли в анализе при различных отношениях эффекторных клеток к целевым (E:T) в присутствии хронически стимулируемых CAR Т-клеток и либо Соединения 1, либо только несущей среды.

[0835] Фиг.43I показывает количества CAR Т-клеток, наблюдаемые в день 5 анализа, сравнивая результаты культур с хронически стимулируемыми или свежееоттаявшими CAR Т-клетками в присутствии 1 мкМ Соединения 1 или несущей среды (ctrl). Результаты согласуются с тем, что способность Соединения 1 увеличивать размножение и/или выживаемость CAR Т-клеток при условиях, включающих экспонирование для антигена CAR, как у свежих CAR Т-клеток, так и у CAR Т-клеток, которые подвергаются воздействию условий хронической стимуляции, дает в результате состояние истощения.

[0836] Концентрации цитокинов определяют из супернатантов, собранных в день 5

от совместных культур в этом исследовании при различных условиях. Фиг.43J изображает относительные уровни цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  по сравнению (нормированные) с уровнями, наблюдаемыми для условий, включающих свежееоттаявшие CAR-экспрессирующие Т-клетки. Показаны средние значения для 5 здоровых доноров. В совместных культурах, содержащих длговременно стимулируемые CAR-экспрессирующие Т-клетки, культивируемые вместе с опухолевыми сфероидами в присутствии Соединения 1, продуцирование цитокинов повышается по сравнению с совместными культурами, содержащими контроль с несущей средой. Результаты согласуются с тем, что имеется способность Соединения 1 восстанавливать способность хронически стимулируемых CAR Т-клеток, демонстрирующих признаки фенотипа истощения, продуцировать цитокины в ответ на экспонирование антигена CAR.

[0837] Анализ экспрессирования генов CAR Т-клетками, отсортированными от опухолевого сфероида после 5 дней совместного культивирования, анализируют с помощью секвенирования РНК (РНК-seq) на образцах комплементарной ДНК (кДНК), полученных из РНК, выделенной из длговременно стимулируемых CAR-экспрессирующих Т-клеток или CAR-экспрессирующих Т-клеток, которые не подвергаются длговременной стимуляции. Дифференциальное экспрессирование (DE для РНК-seq) вычисляют на основе эффекта обработки 0,1 мкМ и 1 мкМ Соединения 1. Порог селекционного дифференциала локуса составляет  $q \leq 0,05$  и абсолютное  $\log_2$  кратное изменение  $\geq 0,5$  для РНК-seq.

[0838] Анализ РНК-seq демонстрирует, что обработка Соединением 1 после хронической стимуляции дает в результате частичное инвертирование экспрессируемых генов в CAR Т-клетках анти-CD19, ассоциированное с их гипофункциональным, истощенным состоянием. Фиг.43К показывает графики  $\log_2$  кратного изменения ( $\log_2FC$ ) экспрессирования генов в CAR Т-клетках анти-CD19 как после длговременной стимуляции, так и после последующего инкубирования вместе с Соединением 1, по сравнению с контролем хронической стимуляции (ось у), в зависимости от экспрессирования генов в CAR+ Т-клетках анти-CD19, которые хронически стимулируются и сравниваются с клетками, которые не стимулируются, в анализе длговременной стимуляции (ось х). Как показано на Фиг.43L, добавление Соединения 1 после длговременной стимуляции инвертирует изменение экспрессирования некоторых генов. Анализ путей данных РНК-seq CAR-Т с использованием Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) показывает, что пути, вовлеченные в функцию Т-клеток, обогащаются после условий хронической стимуляции и могут инвертироваться после последующей обработки Соединением 1 Фиг.43М). Пути, которые изменяются из набора обогащенных генов, индуцируемых хронической симуляцией, представляют собой специфичные пути пролиферации клеток.

[0839] Вместе, результаты согласуются с тем выводом, что присутствие Соединения 1 может восстанавливать или инвертировать состояние истощения или хронической стимуляции у CAR Т-клеток.

**Пример 21** Оценка сигнатуры генов CAR T-клеток после одновременной долговременной стимуляции в присутствии Соединения 1 или леналидомида

[0840] CAR-экспрессирующие T-клетки анти-CD19, полученные, как описано в Примере 14, стимулируют при условиях индуцирования хронической стимуляции в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или леналидомида или контроля с несущей средой или рекомбинантного IL-2 (для сравнения), при условиях хронической стимуляции, по существу, как описано в Примере 20, за исключением того, что в ходе долговременной стимуляции присутствуют (одновременно) Соединение 1 или леналидомид. Экспрессирование генов анализируют с помощью секвенирования РНК (РНК-seq) на образцах комплементарной ДНК (кДНК), полученных из РНК, выделенной из долговременно стимулируемых CAR-экспрессирующих T-клеток или из CAR-экспрессирующих T-клеток, не подвергающихся долговременной стимуляции. Дифференциальное экспрессирование (DE, для РНК-seq) вычисляют на основе эффектов обработки (долговременная стимуляция по сравнению с отсутствием долговременной стимуляции), для долговременной стимуляции в присутствии соединения (например, Соединения 1 или леналидомида) или IL-2 или контроля с несущей средой. Порог селекционного дифференциала локуса составляет  $q \leq 0,05$  и  $\log_2$  кратное изменение  $\geq 0,5$  для РНК-seq.

[0841] Анализ РНК-seq демонстрирует, что обработка Соединением 1 или леналидомидом в ходе хронической стимуляции дает в результате частичное инвертирование экспрессируемых генов в CAR T-клетках анти-CD19, ассоциируемое с гипофункциональным, истощенным состоянием. Фиг.44А показывает графики  $\log_2$  кратного изменения ( $\log_2FC$ ) экспрессирования генов в CAR T-клетках анти-CD19 после долговременной стимуляции, в присутствии соединения или IL-2 по сравнению с хронической стимуляцией контролем (ось y), по сравнению с экспрессированием генов в CAR+ T-клетках анти-CD19, которые хронически стимулируются, и по сравнению с клетками, которые не стимулируются, при анализе долговременной стимуляции (ось x). Как показано на Фиг.44А, долговременная стимуляция дает в результате изменение (увеличение или уменьшение) экспрессирования ряда генов. Присутствие Соединения 1 в ходе долговременной стимуляции инвертирует изменение экспрессирования некоторых генов (Фиг.44В). Сходные результаты наблюдаются для леналидомида (данные не показаны). В противоположность этому, инкубирование вместе с IL-2 в ходе анализа долговременной стимуляции не влияет на дифференциальное экспрессирование генов, наблюдаемое при долговременной стимуляции в этом анализе (Фиг.44А). Сходные результаты для экспрессирования генов наблюдают после долговременной стимуляции CAR+ T-клеток, экспрессирующих CAR анти-BCMA, осуществляемой в присутствии и в отсутствие леналидомида (данные не показаны). Также определяется оценка обогащения набора генов для генов, показывающих увеличение или уменьшение экспрессирования в присутствии 0, 0,1 или 1 мкМ Соединения 1 (Фиг.44С). Анализ путей данных РНК-seq CAR-T с использованием Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) показывает

обогащение путей, вовлеченных в функцию Т-клеток, при условиях хронической стимуляции, и оно может предотвращаться или уменьшаться в присутствии одновременной обработки Соединением 1 (Фиг.44D). Эти результаты согласуются с теми данными, что одновременная обработка Соединением 1 в ходе долговременной стимуляции может ограничивать истощение CAR+Т-клеток, как оценивается по экспрессированию генов.

**Пример 22 Воздействие Соединения 1 на функцию CAR Т после одновременной долговременной стимуляции в присутствии Соединения 1**

[0842] CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19, полученные, как описано в Примере 14, стимулируют при условиях индуцирования хронической стимуляции в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) (0,1 мкМ и 1 мкМ) или контроля с несущей средой или рекомбинантного ИЛ-2 (для сравнения), в условиях хронической стимуляции, по существу, как описано в Примере 20, за исключением того, что в ходе долговременной стимуляции присутствует (одновременно) Соединение 1. Клетки опухоли Raji и Granta-519 культивируют совместно вместе с CAR+ Т-клетками при отношении Е:Т 2,5:1 после хронической стимуляции и одновременной обработки Соединением 1.

[0843] Как показано на Фиг.44Е, цитолитическая активность, как измерено по зависимости количества клеток опухоли от времени, нормированному на время ноль, улучшается для хронически стимулируемых клеток, которые инкубируются в присутствии 0,1 мкМ и 1 мкМ Соединения 1, по сравнению с цитолитической активностью хронически стимулируемых клеток в отсутствие иммуномодулирующего соединения (контроль). Улучшение цитолитической активности для соединения больше, чем для ИЛ-2. Супернатанты от совместно культивируемых клеток собирают через 24 часа и анализируют на продуцирование цитокинов. Как показано на Фиг.44F, продуцирование IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  увеличивается по сравнению с контролем с несущей средой после одновременной обработки 1 мкМ Соединения 1 для обеих линий клеток.

[0844] Вместе с результатами в Примере 21, эти результаты демонстрируют, что Соединение 1 может усиливать или увеличивать активность или функцию Т-клеток в ответ на антиген CAR, не давая в результате истощение в ходе хронической стимуляции или не усиливая его, и может уменьшить или предотвратить развитие фенотипа истощения в ответ на хроническую стимуляцию. Результаты согласуются с теми данными, что одновременная обработка Соединением 1 в ходе хронической стимуляции улучшает функцию CAR-Т-клеток и может ограничить истощение CAR Т-клеток.

**Пример 23 Сравнение воздействия Соединения 1 на функцию CAR-Т-клеток после долговременной стимуляции или одновременно с ней**

[0845] CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех доноров, полученные, как описано в Примере 14, стимулируют при условиях индуцирования хронической стимуляции либо в присутствии (одновременно), либо после обработки (сохранение) 0,1 мкМ и 1 мкМ 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или контролем с несущей средой или рекомбинантным ИЛ-2 (для сравнения)

при условиях хронической стимуляции, в целом, как описано в Примерах 20 и 21. Долговременно стимулируемые CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 культивируются совместно посредством инкубирования вместе с опухолевыми сфероидами Granta-519, и клетки оценивают в различных временных точках на цитолитическую функцию и функцию цитокинов. В ходе одновременных обработок Соединение 1 присутствует в ходе долговременной стимуляции, но не присутствует в ходе совместного культивирования с целевыми клетками. В ходе обработки сохранения Соединение 1 не присутствует в ходе долговременной стимуляции, но присутствует в ходе совместного культивирования вместе с целевыми клетками.

[0846] Усредненные измерения размеров опухолевых сфероидов в день 9 после совместного культивирования с CAR+ Т-клетками после долговременной стимуляции в присутствии Соединения 1, как одновременной обработки с долговременной стимуляцией (Фиг.45А) или как последующей обработки Соединением 1 после долговременной стимуляции (Фиг.45В), показывает концентрационно зависимое уменьшение объема опухоли. Более сильное уменьшение наблюдают в ходе последующей обработки Соединением 1.

[0847] Концентрации цитокинов определяют из супернатантов, собранных в день 5, от совместных культур при указанных выше условиях этого исследования. Фигуры 45С и 45D изображают относительные уровни цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  для CAR Т-клеток в присутствии Соединения 1, как для одновременной обработки при долговременной стимуляции (Фиг.45С) или как для последующей обработки Соединением 1 после долговременной стимуляции (Фиг.45D). Как показано на Фиг.45С, CAR Т-клетки, стимулируемые при помощи одновременной обработки Соединением 1, показывают повышение уровня IFN- $\gamma$ , в то время как замедленная обработка 1 мкМ Соединения 1 показывает усиление продуцирования как IFN- $\gamma$ , так и TNF- $\alpha$  (Фиг.45D).

[0848] Вместе, эти результаты согласуются с тем выводом, что замедленная обработка Соединением 1 может усиливать или увеличивать характеристики Т-клеток в ответ на антиген CAR и может уменьшить или инвертировать истощенное или хронически стимулированное состояние CAR Т-клеток.

**Пример 24 Введение CAR-экспрессирующих клеток анти-CD19 в комбинации с Соединением 1 субъекту с рецидивирующей и не поддающейся лечению лимфомой не-Ходжкина (NHL)**

[0849] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 получают, по существу, как описано в Примере 14, и генерируемые композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток CD4+ и композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток CD8+ по отдельности вводят субъектам с рецидивирующей/не поддающейся лечению (R/R) лимфомой не-Ходжкина В клеток (NHL) в комбинации с последующим введением 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1). Группы субъектов, выбранных для лечения, включают субъектов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL); de novo или трансформированной из медленно растущей лимфомы (NO); В-

клеточной лимфомы высокой степени, с перегруппировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (лимфома с двойным/тройным совпадением); фолликулярной лимфомы степени 3b (FLG3B); обогащенной Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточной лимфомы; EBV-позитивной DLBCL, NO; и первичной медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфомы. Леченые субъекты также включают тех, которые имеют рецидив после, по меньшей мере, двух предыдущих линий терапии или являются не поддающимися лечению с их помощью, включая CD20-нацеленный агент и антрациклин, и имеют при скрининге оценку Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) равную или меньшую 1.

[0850] Перед вливанием CAR+ Т-клеток, субъекты принимают противолимфомную химиотерапию с флударабином (flu, 30 мг/м<sup>2</sup>/день) и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м<sup>2</sup>/день) в течение трех (3) дней. Субъекты принимают CAR-экспрессирующие Т-клетки через 2-7 дней после противолимфомной химиотерапии. Субъектам вводят одну дозу  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих Т-клеток (каждую дозу посредством отдельных вливаний при отношении 1:1 CAR+-экспрессирующих Т-клеток CD4+ и CAR-экспрессирующих Т-клеток CD8+, соответственно).

[0851] Соединение 1 вводят перорально субъектам, начиная со дня 29 ( $\pm 7$  дней) после вливания CAR-Т-клеток при дозе 1 мг, 2 мг или 3 мг в течение 5 последовательных дней из 7 дней недели в течение 180 дней.

[0852] Ответ на лечение оценивают на основе рентгенографической оценки опухоли посредством позитронно-эмиссионной томографии (PET) и/или компьютерной томографии (СТ) или магнитно-резонансной томографии (MRI) на фоновом уровне перед лечением и в разные моменты времени после лечения (например, на основе классификации Lugano, смотри, например, Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067). Также оценивается присутствие или отсутствие нежелательных явлений, возникающих в ходе лечения (TEAE) и после лечения. Субъекты также оцениваются и отслеживаются на нейротоксичность (неврологические осложнения, включая симптомы спутанности сознания, афазии, энцефалопатии, миоклонуса, судорожных припадков, судорог, летаргии и/или изменения психического состояния), разделенные на степени по шкале 1-5, согласно National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria (CTCAE) scale, version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Common Toxicity Criteria (CTCAE), version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). Смотри Common Terminology for Adverse Events (CTCAE) Version 4, U.S. Department of Health and Human Services, Published: May 28, 2009 (v4.03: June 14, 2010); и Guido Cavaletti & Paola Marmioli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (December 2010). Синдром высвобождения цитокинов (CRS) также определяется и отслеживается, разделяется на степени по тяжести. Смотри Lee et al, *Blood*. 2014;124(2):188-95. Субъекты также оцениваются на фармакокинетику (PK) CAR+ Т-клеток анти-CD19 до и после лечения Соединением 1 и на PK для Соединения 1.

[0853] Дозирование Соединения 1 прекращается после дня 180 (6 месяцев после вливания CAR-Т-клеток), если только субъект не реализует частичного ответа (PR), в этом

случае дальнейшее введение Соединения 1 может продолжаться до прогрессирования заболевания.

**Пример 25** Оценка фармакодинамического ответа фактора транскрипции Aiolos и Ikaros в CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-CD19 в присутствии Соединения 1 и Соединения 2

[0854] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 (содержащие Т-клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1) генерируют от пяти разных здоровых доноров, по существу, как описано в Примере 14. Приблизительно  $2,5 \times 10^5$  клеток из генерируемой композиции CAR+ Т-клеток стимулируют в течение ночи 1 мкг/мл с CAR-специфичного антиидиотипического антитела в присутствии 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона (Соединения 2) при концентрациях в пределах от 10 до 10000 нМ или контролем с несущей средой в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После инкубирования в течение ночи, CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 окрашивают антителами и анализируют с помощью проточной цитометрии для оценки внутриклеточных уровней Ikaros и Aiolos в клетках CAR+ CD4+ или клетках CAR+ CD8+, как измерено по медианной интенсивности флуоресценции (MFI). Величина медианной интенсивности флуоресценции (MFI) для Ikaros и Aiolos нормируется и вычисляется как процент по сравнению с контролем с несущей средой.

[0855] Концентрационно-зависимое уменьшение внутриклеточного экспрессирования Ikaros и Aiolos наблюдают в стимулируемых CAR-экспрессирующих Т-клетках анти-CD19 после инкубирования либо вместе с Соединением 1, либо вместе с Соединением 2 (Фиг.46). EC<sub>50</sub> для уменьшения экспрессирования Aiolos и Ikaros вычисляют, как определено по концентрации ингибитора, который уменьшает MFI Aiolos или Ikaros до 50% от их максимальной MFI в отсутствие ингибитора. Значения EC<sub>50</sub> для Соединения 1 и Соединения 2 показаны в Таблице E8, как среднее для 5 доноров (диапазон среди доноров показан на основе 95% доверительного интервала). Результаты показывают, что Соединение 2 является приблизительно в 10-20 раз более сильнодействующим чем Соединение 1 при медируемой соединением деградации Ikaros и Aiolos в CAR-экспрессирующих Т-клетках.

Таблица E8. EC<sub>50</sub> (нМ) Aiolos и Ikaros в CAR+ Т-клетках.

	Соединение 1	Соединение 2
Aiolos	52,7 (41,7-66,5)	2,5 (1,6-3,96)
Ikaros	59,3 (47,6-74,1)	4,0 (3,0-5,4)

**Пример 26** Оценка воздействия иммуномодулирующих соединений на функцию CAR Т после долговременной стимуляции

[0856] Композиции CAR-экспрессирующих Т-клеток анти-CD19 (содержащие Т-клетки CD4+ и CD8+, объединенные при отношении 1:1) генерируют от трех разных

здоровых доноров, по существу, как описано в Примере 14. Чтобы подвергнуть клетки воздействию условий хронической стимуляции, CAR+ Т-клетки инкубируют вместе 30 мкг/мл связанного на планшете антиидиотипического (анти-ID) антитела (смотри, например, WO2018/023100) и инкубируют при 37°C в течение периода 6 дней в присутствии титрующего количества 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона (Соединения 1) или (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона (Соединения 2).

[0857] Пролиферация Т-клеток в ходе культивирования оценивается, и она показана на Фиг.47А для трех доноров (среднее значение  $\pm$ SEM). Как показано, присутствие иммуномодулирующих соединений уменьшает отсчеты CAR Т-клеток. Жизнеспособность оценивают в день 6 обработки с помощью проточной цитометрии с использованием красителя для живых/мертвых. Как показано на Фиг.47В (среднее значение  $\pm$ SEM), иммуномодулирующие соединения не оказывают воздействия на жизнеспособность клеток, когда стимуляция осуществляется с помощью либо 3 мкг/мл анти-ID (левая панель), либо 30 мкг/мл анти-ID (правая панель). Вместе, эти результаты демонстрируют воздействие иммуномодулирующих соединений на удвоения клеток без влияния на жизнеспособность клеток.

[0858] Для выяснения возможного воздействия на клеточный цикл, клеточный цикл определяют с использованием инкорпорирования EDU в течение 2 часов после 3 дней стимуляции и обработки иммуномодулирующим соединением. Результаты на Фиг.47С показывают, что обработка иммуномодулирующими соединениями повышает процент CAR Т-клеток в фазе G1 клеточного цикла. Процент Т-клеток в фазе G1 клеточного цикла при увеличении концентраций иммуномодулирующих соединений показан на Фиг.47D (левая панель, 3 мкг/мл анти-ID, правая панель, 30 мкг/мл анти-ID. Без какого-либо желания ограничиваться теорией, аккумулятивное CAR Т-клеток в фазе G1 клеточного цикла, при обработке иммуномодулирующими соединениями может учитывать один из механизмов, с помощью которых иммуномодулирующие соединения ограничивают появления истощения в ходе хронической стимуляции.

[0859] Определяют внутриклеточные уровни цитокинов в CAR Т-клетках, которые стимулируют в течение 24 часов или 72 часов 30 мкг/мл анти-ID. Т-клетки культивируют вместе с анти-ID-конъюгированными шариками в течение 4 часов в присутствии ингибитора Гольджи. Внутриклеточные уровни цитокинов IFN $\gamma$ , перфорина, гранзима В и IL-2 определяют с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг.47Е, обработка клеток иммуномодулирующими соединениями увеличивает внутриклеточное экспрессирование эффекторных цитокинов (IFN $\gamma$ , перфорина, гранзима В), как определено по средней интенсивности флуоресценции, но значительных изменений продуцирования IL-2 нет. Сходные результаты наблюдаются при измерении процента клеток положительных относительно цитокинов.

**Пример 27 Воздействие иммуномодулирующих соединений на функцию CAR Т после одновременной обработки в ходе долговременной стимуляции**

[0860] CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19, полученные, как описано в Примере 14, стимулируют 30 мкг/мл связанного на планшете антиидиотипического (анти-ID) антитела в течение 6 дней в присутствии (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона (Соединения 2) или контроля с несущей средой, по существу, как описано в Примере 22. После долговременной, хронической стимуляции с одновременной обработкой Соединением 2, CAR Т-клетки оценивают на экспрессирование Ikaros или на функцию CAR Т после повторного провоцирования CD19-экспрессирующими целевыми клетками.

#### **А. Экспрессирование Ikaros**

[0861] Экспрессирование Ikaros в CAR Т-клетках, которые подвергаются хронической стимуляции в присутствии Соединения 2 (1 нМ, 10 нМ или 100 нМ), измеряют с помощью внутриклеточного анализа проточной цитометрии с использованием антитела к Ikaros. Как показано на Фиг.48А, уменьшение экспрессирования Ikaros сохраняется в хронически стимулируемых клетках, обрабатываемых 100 нМ, но не 10 нМ Соединения 2.

#### **В. Цитолитическая активность**

[0862] CAR Т-клетки, которые стимулируют в течение 6 дней анти-ID одновременно в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ или 0,01 мкМ), отмывают от соединения и совместно культивируют с клетками опухоли CD19+ при отношении эффекторных клеток к целевым (Е:Т) 1:1 в отсутствие Соединения 2. Оцениваемые клетки опухоли CD19+ включают Т-клетки К562 трансдуцированные CD19 (К562.CD19), клетки Raji или клетки Granta-519. Как показано на Фиг.48В, цитолитическая активность, как измеряется по количеству клеток опухоли в зависимости от времени, улучшается для хронически стимулируемых клеток, которые одновременно инкубируют в присутствии Соединения 2, по сравнению с отсутствием соединения (контроль) до повторного провоцирования CD19-экспрессирующими целевыми клетками. Эти результаты согласуются с теми данными, что иммуномодулирующее соединение может уменьшить или предотвратить развитие фенотипа истощения в ответ на хроническую стимуляцию.

#### **С. Анализ роста опухолевых сфероидов**

[0863] CAR Т-клетки, которые стимулируют в течение 6 дней анти-ID одновременно в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ или 0,01 мкМ), совместно культивируют посредством инкубирования вместе с опухолевыми сфероидами Granta-519 и цитолитическая функция и функция цитокинов CAR Т-клеток оценивается в различных временных точках. Для сравнения, цитолитическую активность также оценивают для клеток, которые сходным образом хронически стимулируются анти-ID в присутствии 1 мкМ или 0,1 мкМ Соединения 1. Отслеживают усредненное измерение размера опухолевых сфероидов в различные моменты времени после совместного культивирования с CAR Т-клетками. Как показано на Фиг.48С, одновременная обработка Соединением 2 в ходе хронической стимуляции анти-ID продуцирует CAR Т-клетки с улучшенной цитолитической функцией с уменьшением роста сфероидов Granta-519. Средний объем опухоли через 9 дней показан на Фиг.48D, которая демонстрирует, что Соединение 2

значительно увеличивает цитолитическую функцию CAR+Т-клеток против опухолевых сфероидов Granta-519. Улучшение цитолитической функции становится больше при одновременной обработке Соединением 2 чем Соединением 1.

[0864] Цитокины (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNFальфа) измеряют из супернатанта хронически стимулируемых CAR Т-клеток, выше, которые совместно культивируют в течение 5 дней вместе с опухолевыми сфероидами CD19. log<sub>2</sub> кратное изменение по сравнению с контрольными клетками (хронически стимулируемые клетки, которые не обрабатывают одновременно иммуномодулирующим соединением) показано на Фиг.48Е. Как показано, имеется статистически значимое повышение уровня IFN $\gamma$  в культурах, инкубируемых вместе с хронически стимулируемыми клетками, которые одновременно обрабатываются Соединением 2. Кроме того, эти результаты поддерживают то, что иммуномодулирующие соединения при условиях, которые могут ускорять истощение, например, в ходе хронической стимуляции, могут улучшать или сохранять функцию CAR Т-клеток и ограничивать, уменьшать или предотвращать истощение CAR Т-клеток. Все вместе, приведенные выше результаты поддерживают использование иммуномодулирующих соединений подобных Соединению 2 для улучшения функции CAR Т-клеток, включая такие условия, которые потенциально вызывают истощение, например, при ответе на антиген CAR. Такие воздействия Соединения 2 могут превосходить другие иммуномодулирующие соединения, а также, воздействия могут реализоваться при более низких дозах благодаря большему в 10-20 раз воздействию Соединения 2 на деградацию Ikaros.

#### **Пример 28 Воздействие иммуномодулирующих соединений на сохранение функции CAR Т после долговременной стимуляции**

[0865] CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 от трех доноров, полученные, как описано в Примере 14, стимулируют при условиях индуцирования хронической стимуляции (для продуцирования гипофункциональных, истощенных CAR Т-клеток), а затем обрабатывают (сохраняют) (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дионом (Соединением 2) или контролем с несущей средой. Долговременную, хроническую стимуляцию осуществляют посредством стимуляции CAR+Т-клеток 30 мкг/мл связанного на планшете антиидиотипического (анти-ID) антитела в течение 6 дней, по существу, как описано в Примере 22. После хронической стимуляции, CAR Т-клетки повторно провоцируют CD19-экспрессирующими целевыми клетками в присутствии Соединения 2 и оценивают их цитолитическую активность или продуцирование цитокинов.

#### **А. Цитолитическая активность**

[0866] CAR Т-клетки, которые стимулируют в течение 6 дней анти-ID, культивируют совместно с клетками опухоли CD19+ при отношении эффекторных клеток к целевым (Е:Т) 1:1 в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ или 0,01 мкМ). Оцениваемые клетки опухоли CD19+ включают Т-клетки K562, трансдуцированные CD19 (K562.CD19), клетки Raji или клетки Granta-519. Как показано на Фиг.49А, имеется статистически

значимое улучшение цитолитической активности, как измерено по количеству клеток опухоли в зависимости от времени, когда хронически стимулируемые клетки повторно провоцируют CD19-экспрессирующими клетками в присутствии Соединения 2, по сравнению с отсутствием соединения (контроль). Эти результаты согласуются с теми данными, что иммуномодулирующее соединение может сохранять фенотип истощения, вызываемый хронической стимуляцией.

### **В. Анализ роста опухолевых сфероидов**

[0867] CAR T-клетки, которые стимулируют в течение 6 дней анти-ID, культивируют совместно посредством инкубирования вместе с опухолевыми сфероидами Granta-519 в присутствии или в отсутствие Соединения 2 (0,001 мкМ или 0,01 мкМ). Клетки оценивают в различных временных точках на цитолитическую функцию и функцию цитокинов. Для сравнения, цитолитическую активность также оценивают для клеток, которые сходным образом хронически стимулируют анти-ID, с последующим совместным культивированием в присутствии 1 мкМ или 0,1 мкМ Соединения 1. Оценивают усредненное измерение размеров опухолевых сфероидов в день 9 после совместного культивирования с CAR T-клетками. Как показано на Фиг.49В, обработка для сохранения Соединением 2 улучшает цитолитическую активность CAR T-клеток для уменьшения роста сфероидов Granta-519. Улучшение цитолитической функции становится больше после обработки для сохранения Соединением 2, чем Соединением 1. Цитокины (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNFальфа) измеряют из супернатанта хронически стимулируемых CAR T-клеток, описанных выше, которые культивируют совместно в течение 5 дней вместе с опухолевыми сфероидами CD19. log<sub>2</sub> кратное изменение по сравнению с контрольными клетками (хронически стимулируемые клетки, которые не обрабатывают иммуномодулирующим соединением) показано на Фиг.49С. Как показано, имеется статистически значимое повышение уровней IFN $\gamma$  в культурах, инкубируемых вместе с хронически стимулируемыми клетками, которые затем обрабатывают Соединением 2, в ходе повторного провоцирования CD19-экспрессирующими опухолевыми сфероидами.

[0868] Модель опухолевых сфероидов A549.CD19 используется затем для выяснения активности модуляций T-клеток у соединений. Рост опухолевых сфероидов A549.CD19 является нечувствительным к лечению монотерапией иммуномодулирующими соединениями. CAR T-клетки, которые стимулируют в течение 6 дней анти-ID, совместно культивируют посредством инкубирования вместе с опухолевыми сфероидами A549.CD19, в присутствии Соединения 2 (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ). Оценивают усредненные измерения размеров опухолевых сфероидов в день 9 после совместного культивирования с CAR T-клетками. Как показано на Фиг.50А, обработка для сохранения Соединением 2 улучшает цитолитическую активность CAR T-клеток для уменьшения роста сфероидов A549.CD19. Цитокины (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNFальфа) измеряют из супернатанта хронически стимулируемых CAR T-клеток, обсуждаемых выше, которые совместно культивируются в течение 5 дней вместе с опухолевыми сфероидами CD19. log<sub>2</sub> кратное изменение по сравнению с контрольными клетками (хронически стимулируемые клетки, которые не

обрабатываются одновременно иммуномодулирующим соединением) показано на Фиг.50В. Как показано, имеется статистически значимое повышение уровня IFN $\gamma$  в культурах, инкубируемых вместе с хронически стимулируемыми клетками, которые затем обрабатывают Соединением 2, в ходе повторного провоцирования CD19-экспрессирующими опухолевыми сфероидами. Количество CAR T-клеток в совместных культурах с опухолевыми сфероидами, измеренное в день 5, повышается при обработке Соединением 2 (Фиг.50С).

[0869] Эти результаты дополнительно поддерживают то, что иммуномодулирующие соединения, такие как Соединение 2, могут сохранять или инвертировать CAR T-клетки, которые истощаются. Этот результат наблюдается в физиологически релевантной модели 3D культуры опухолевых сфероидов, содержащей как сфероиды Granta, как известно, чувствительные к иммуномодулирующим соединениям, так и сфероиды A549.CD19, которые являются резистентными к иммуномодулирующим соединениям. Хотя все оцениваемые иммуномодулирующие соединения демонстрируют способность к сохранению функции CAR T-клеток, Соединение 2 демонстрирует превосходящую способность к сохранению противоопухолевой функциональности по сравнению с Соединением 1 и является более сильнодействующим, поскольку воздействия наблюдаются при гораздо более низких дозах.

#### **Пример 29 Воздействие иммуномодулирующих соединений на функцию CAR T-клеток анти-CD19 в линиях резистентных CAR T-клеток**

[0870] Поскольку клеточные иммуномодулирующие соединения, как известно, имеют антилимфомную активность, осуществляют эксперименты для оценки противоопухолевого комбинированного воздействия при субтерапевтических отношениях эффекторных клеток CAR T-клеток анти-CD19.

[0871] CAR T-клетки анти-CD19 культивируют совместно с клетками опухоли RL CD19+ при отношении эффекторных клеток к целевым (E:T) 1:1 в присутствии (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона (Соединения 2) (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ). острую цитолитическую активность измеряют с помощью количества клеток опухоли в зависимости от времени. Как показано на Фиг.51А, линия клеток опухоли RL является чувствительной к монотерапии Соединением 2 при дозах 0,01 мкМ или 0,1 мкМ. Совместное культивирование CAR T-клеток с резистентными T-клетками опухоли RL в присутствии Соединения 2 улучшает цитолитическую функцию CAR T-клеток.

[0872] Цитолитическую активность также оценивают на модели сфероидов. Примерно 5000 клеток RL высевают за 48 часов до добавления 5000 CAR T-клеток анти-CD19 (отношение E:T 1:1). Клетки CAR анти-CD19 T культивируют совместно с опухолевыми сфероидами RL в присутствии Соединения 1 (1 мкМ) или Соединения 2 (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ). Размер опухоли оценивают в день 4 после инкубирования вместе с CAR T-клетками. Фиг.51В показывает, что опухолевые сфероиды RL являются чувствительными к иммуномодулирующим соединениям, в частности, при 1

мкМ дозе Соединения 1 или 0,01-мкМ или 0,1-мкМ дозах Соединения 2. Уменьшение размера опухоли наблюдают для комбинации CAR Т-клеток анти-CD19 и иммуномодулирующего соединения при всех исследуемых дозах.

[0873] Затем клетки RL используют для оценки способности иммуномодулирующих соединений сохранять или инвертировать CAR Т-клетки анти-CD19 после истощения. CAR-экспрессирующие Т-клетки анти-CD19 стимулируют при условиях индуцирования хронической стимуляции, а затем обрабатывают (сохраняют) Соединением 1 (1 мкМ) или Соединением 2 (0,001 мкМ, 0,01 мкМ или 0,1 мкМ) или контролем с несущей средой. Долговременную, хроническую стимуляцию осуществляют посредством стимуляции CAR Т-клеток 30 мкг/мл связанного на планшете антиидиотипического (анти-ID) антитела в течение 6 дней, по существу, как описано в Примере 22. После хронической стимуляции CAR Т-клетки культивируют вместе с клетками RL в присутствии Соединения 1 или Соединения 2. Цитолитическую активность оценивают в зависимости от времени, измеряя количество клеток опухоли в культуре. Как показано на Фиг.51С обработка для сохранения либо Соединением 1, либо Соединением 2 существенно улучшает цитолитическую активность CAR Т-клеток для уменьшения роста клеток RL. Эти результаты демонстрируют, что оцениваемые иммуномодулирующие соединения могут сохранять хронически стимулируемые CAR Т-клетки анти-CD19 чтобы дать возможность для клиренса RL-резистентных линий.

**Пример 30 Цитолитическая функция и продуцирование цитокинов хронически стимулируемыми CAR Т-клетками анти-BCMA против BCMA-экспрессирующих целевых клеток MM в присутствии иммуномодулирующего соединения для клеток**

[0874] Замороженные с помощью крионики CAR Т-клетки анти-BCMA, полученные, по существу, как описано в Примере 1, и приготовленные при отношении Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, 1:1, оттаивают. CAR Т-клетки анти-BCMA стимулируют BCMA-конъюгированными шариками (диаметр примерно 4,5 мкм из 50 мкг/мл композиции BCMA-конъюгированных шариков, генерируемой, как описано в Примере 9) при отношении Т-клеток к шарикам 1:1 в присутствии или в отсутствие леналидомида (1000 нМ), Соединения 2 (0,1 нМ, 1 нМ или 10 нМ) или контроля с несущей средой DMSO. Затем клетки инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 дней.

[0875] В день 7, CAR клетки анти-BCMA из всех образцов считают, используя устройство Cellometer, и окрашивают для анализа с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивают красителем жизнеспособности и анализируют с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг.52, жизнеспособность и отсчеты CAR Т-клеток анти-BCMA повышаются в присутствии леналидомида или Соединения 2.

[0876] Цитолитическую активность оценивают, используя BCMA-экспрессирующие целевые клетки OPM-2 и RPMI-8226, трансдуцированные NucLight Red, красным флуоресцентным белком, детектируемым с помощью микроскопии, чтобы дать возможность для измерения гибели целевых клеток. CAR Т-клетки анти-BCMA, которые стимулируют в течение 7 дней BCMA-конъюгированными шариками в присутствии

соединений, культивируют совместно с целевыми клетками RPMI-8226 при отношении (эффекторные:целевые) 0,3:1 или 1:1. Культуры инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и получают изображения каждые 2 часа в течение 5-7 дней с помощью системы анализа живых клеток Essen IncuCyte Zoom для отслеживания NucLightRed-положительных целевых клеток. Когда долговременную стимуляцию осуществляют в присутствии леналидомида или Соединения 2, CAR T-клетки анти-BCMA показывают увеличение цитолитической активности (Фиг.53А, результаты показаны для отношения Е:Т 0,3:1).

[0877] Для измерений цитокинов, собирают не содержащие клеток супернатанты из описанного выше цитолитического анализа через 24 часа после высевания. Уровни цитокинов измеряют с использованием набора цитокинов IFN $\gamma$ , IL-2 и TNFальфа Meso Scale Discovery (Mesoscale) согласно инструкциям производителя. Данные анализируют с использованием GraphPad Prism для вычисления абсолютных изменений уровней цитокинов по сравнению с контролем с несущей средой DMSO. Как показано на Фиг.53В-Д, когда долговременную стимуляцию осуществляют в присутствии леналидомида или Соединения 2, CAR T-клетки анти-BCMA показывают увеличение продуцирования IFN-гамма (Фиг.53В), IL-2 (Фиг.53С) или TNF-альфа (Фиг.53Д).

[0878] Эти результаты демонстрируют, что леналидомид или Соединение 2, присутствующее в ходе хронической стимуляции, повышает цитолитическую активность и продуцирование цитокинов CAR T-клетками анти-BCMA после повторного провоцирования антигеном и в отсутствие соединения в ходе повторного провоцирования. Эти результаты дополнительно поддерживают вывод о способности иммуномодулирующих соединений для клеток, таких как леналидомид или Соединение 2, уменьшать или предотвращать развитие фенотипа истощения в ответ на хроническую стимуляцию, тем самым улучшая функцию CAR-T-клеток и ограничивая истощение CAR T-клеток.

**Пример 31 Сохранение цитолитической функции и продуцирования цитокинов после хронической стимуляции CAR T-клеток анти-BCMA иммуномодулирующим Соединением для клеток**

[0879] Осуществляют исследования для определения того, сохраняет ли Соединение 2 функцию CAR T-клеток анти-BCMA после хронической стимуляции. Для прямой стимуляции посредством зацепления с CAR для индуцирования хронической стимуляции клеток, CAR T-клетки анти-BCMA стимулируют BCMA-конъюгированными шариками (диаметр примерно 4,5 мкм из 50 мкг/мл композиции BCMA-конъюгированных шариков, генерируемых, как описано в Примере 9) при отношении Т-клеток к шарикам 1:1. Затем клетки инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 7 дней.

[0880] CAR T-клетки анти-BCMA, которые стимулируют в течение 7 дней BCMA-конъюгированными шариками, повторно провоцируют BCMA-экспрессирующими клетками RPMI-8226 MM при отношении Е:Т 0,3:1 в присутствии Соединения 2 (1 нМ или 10 нМ). Культуры инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и получают изображения каждые 2 часа в течение 5-7 дней с помощью системы анализа живых клеток Essen IncuCyte Zoom для

отслеживания NucLightRed-позитивных целевых клеток. Как показано на Фиг.54А, имеется повышение цитолитической активности, когда хронически стимулируемые клетки повторно провоцируют ВСМА-экспрессирующими клетками в присутствии Соединения 2, по сравнению с отсутствием соединения (контроль). Собирают супернатанты, не содержащие клеток, из описанного выше цитолитического анализа через 24 часа после высевания и используют их для измерения уровня IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF с помощью MSD, как описано в Примере 30. Как показано на Фиг.54В-Д, CAR Т-клетки анти-ВСМА показывают увеличение продуцирования IFN-гамма (Фиг.54В), IL-2 (Фиг.54С) или TNF-альфа (Фиг.54Д), когда хронически стимулируемые клетки повторно провоцируют ВСМА-экспрессирующими клетками в присутствии Соединения 2, по сравнению с отсутствием соединения (контроль).

[0881] Для дополнительного выяснения роли Соединения 2 для целевых клеток по сравнению с собственными воздействиями CAR Т-клеток, резистентную линию IMiD/CELMoD клеток DF-15R также используют для повторного провоцирования CAR Т-клеток анти-ВСМА, которые хронически стимулируют в течение 7 дней. Цитолитическую активность и продуцирование цитокинов после повторного провоцирования оценивают, как описано выше. CAR Т-клетки анти-ВСМА показывают увеличение как цитолитической активности (Фиг.55А), так и продуцирования цитокинов (Фиг.55В-Д) в присутствии DF-15R, что указывает на повышение собственной функциональности CAR Т.

[0882] Эти результаты дополнительно демонстрируют, что после хронической стимуляции, добавление иммуномодулирующих соединений для клеток, таких как Соединение 2, в ходе повторного провоцирования антигеном сохраняет истощенные CAR Т-клетки анти-ВСМА, как показывает увеличение цитолитической активности и продуцирование цитокинов.

[0883] Настоящее изобретение, как предполагается, не ограничивается рамками конкретных описанных вариантов осуществления, которые приводятся, например, для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов будут очевидны из описания и концепций в настоящем документе. Такие варианты могут осуществляться без отклонения от истинных рамок и духа описания и, как предполагается, попадают в рамки настоящего изобретения.

#### Последовательности

SEQ ID NO.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	Описание
1	ESKYGPPCPPCP	Спейсер (шарнир IgG4) (aa) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	Спейсер (шарнир IgG4) (nt)

		Номo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG K	Спейсер шарнир- CH3 Номo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Спейсер шарнир- CH2-CH3 Номo sapiens
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGR GGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAV QDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGV EEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSL WNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAQAQAPVKLSLNL LASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSG FAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSH EDSRLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-шарнир-Fc Номo sapiens
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	Искусственная T2A
7	RKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVA FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTD LHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECV DKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGP DNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMV GAL LLLLVVALGIGLFM	Искусственная tEGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179, Accession No. P10747) Номo sapiens

9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179, Accession No. P10747) Homo sapiens
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 (аминокислоты 180-220, P10747) Homo sapiens
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	CD28 (LL - GG) Homo sapiens
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC EL	4-1BB (аминокислоты 214-255, Q07011,1) Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 зета Homo sapiens
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 зета Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR	CD3 зета Homo sapiens
16	PGGG-(SGGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин	Линкер
17	GSADDAKKDAAKKGKS	Линкер
18	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQR YCNASVTNSVKGTNA	Внеклеточный домен ВСМА человека (GenBank No. NP_001183,2)

19	GGGGS	Линкерная последовательность
20	PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Модифицированный Fc IgG1 человека
21	MPLLLLLLPLWAGALA	Сигнальный пептид CD33
22	MPLLLLLLPLWAGALAMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAGGGGSPKSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Конструкция BCMA-Fc
23	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
24	GSGATNFSLKQAGDVEENPGP	P2A
25	ATNFSLKQAGDVEENPGP	P2A
26	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
27	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
28	RKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVA FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECV DKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNLT VWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GAL LLLL VVALGIGLFM	Искусственная tEGFR

29	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDMLISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Спейсер шарнир- CH2-CH3 Homo sapiens
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTA YLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
31	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQ QKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRDFTLTIDPV EEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK	Варибельная легкая цепь (VL) Анти-BCMA
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWVK QAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSA TTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYWGQ GTLVTVSA	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
33	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQ KPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISVQ AEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLDIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
34	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYVCARYSGSFDNWGQGTLVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
35	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNHWYQQ PGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQS EDEADYYCAAWDGLNGLVFGGGTKLTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
36	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLCKASGYTFIDYYVYWMR QAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELSRLRSDDTAMYVCARSQRDGYMDYWGQGTLV TVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
37	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAP KLMYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSNTRSTLVFGGGTKLTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA

38	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD YMESSLRSEDTAVYYCARSGYSKSIVSYMDYWGQGL VTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
39	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSNVFWYQQL PGTAPKLVIIYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
40	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDTAVYYCARSGYGSYRWEDSWGQGLVT VSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
41	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVFWYQQL PGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSASYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
42	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMHV RQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQDRITVTRDTSS NTGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPYSGVLDKVGQGLV TVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
43	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
44	DYGVS	CDR H1 FMC63
45	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2 FMC63
46	YAMDYWG	CDR H3 FMC63
47	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3 FMC63
48	RASQDISKYLN	CDR L1 FMC63
49	SRLHSGV	CDR L2 FMC63
50	HTSRLHS	LC-CDR2 FMC63
51	GNTLPYTFG	CDR L3 FMC63
52	QQGNTLPYT	LC-CDR3 FMC63
53	EVKLVQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFL KMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVT VSS	VH FMC63

54	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL FMC63
55	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEG STKGEVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVV WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS	scFv FMC63
56	KASQNVGTNVA	CDR L1 SJ25C1
57	SATYRNS	CDR L2 SJ25C1
58	QQYNRYPYT	CDR L3 SJ25C1
59	SYWMN	CDR H1 SJ25C1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2 SJ25C1
61	KTISSVVDYFDY	CDR H3 SJ25C1
62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSS TAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGT TVTVSS	VH SJ25C1
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQ KPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQ SKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGKLEIKR	VL SJ25C1
64	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSS TAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDR VSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSG VPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYT SGGGKLEIKR	scFv SJ25C1
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3 FMC63
67	HTSRLHS	LC-CDR2 FMC63
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3 FMC63

69	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctgggcgaccgggtgac catcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctgaactggatcagcagaagc ccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccc agccggttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaa caggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccttacaccttggcg gcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcg gcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggcctggcctggtgg ccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactac ggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggctgatctg gggcagcagaccactactacaacagcgcctgaagagccggctgaccatcatcaagg acaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgcc atctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggcc agggcaccagcgtgaccgtgagcagc	Последовательнос ть, кодирующая scFv
70	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
71	GGGS	Линкер
72	GGGSGGGGSGGGGS	Линкер
73	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер
74	SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA	Линкер
75	MALPVTALLLPLALLLHAARP	Сигнальный пептид CD8a
76	METDTLLLWVLLLVPGSTG	Сигнальный пептид
77	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCARAEMGAVFDIWGQGMVTV SS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
78	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQK P GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRISWPFTFGGGTKVEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
79	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDGTYLGGLWYFDLWGR GTLVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA

80	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQGLGLPLTFGGGTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
81	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWR QAPGQGLEWMGIINPGGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMESSLRSEDVAVYYCARESWPMDVWGQGTITVTS S	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
82	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSE FAVYYCQQYAAIPTFGGGTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
83	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIR QPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGRGYATSLAFDIWGQGTMTV VSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
84	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRHVWPPTFGGGTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQ APGKGLEWVSTISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGSQEHLIFDYWGQGLVTVS S	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
86	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRFYYPWTFGGGTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
87	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNSK TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDFWGSPPGLDYWGQ TLVTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
88	DIQLTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQK GKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQIYTFPPTFGGGTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
89	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA

	YMELSSLRSEDVAVYYCARTPEYSSSIWHYYYGMDVWG QGTTVTVSS	
90	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQFAHTPFTFGGGTKVEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
91	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGPLQEPYDYGMDVWG QGTTVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
92	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK GQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSED FAVYYCQQHHVWPLTFGGGTKVEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
93	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDVAVYYCARGGYSHDMWSEDWGQGT LTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
94	LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRSSNIGSNVNWYRQLP GAAPKLLIYSNNQRPPGVPVRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEATYYCATWDDNLNVHYVFGTGKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
95	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFTDYSINWVRQ APGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFLDTSVST AYLQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQGT LTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
96	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIGAHLIHWYQ QKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTISL QAEDAIIYYCLQSRIFPRTFGQGTKLEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVR RAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN SRNTL YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT LTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
98	DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA

99	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPAHHYYGGMDVWGQGT TVTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
100	DIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISSSFLAWYQQKP GQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED SAVYYCQQYHSSPSWTFGQGTKLEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
101	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVR RAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN SRNTL YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT TVTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
102	DIRLTQSPSPLSASVGDRTITCQASEDINKFLNWHQTPG KAPKLLIYDASTLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDI GTYYCQQYESLPLTFGGGKTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
103	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGMSWVR RAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN SRNTL YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGT TVTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
104	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQQKP GQAPRLLMYGASSRASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYAGSPPTFGQGTKVEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
105	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQ APGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETSAST AYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALT VSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
106	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQ QKPGQPPTLLIQLASNVQTGV PARFSGSGSRTDFTLTIDPV EEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGKTKLEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
107	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYSMNWVKQ APGKGLKWMGRINTETGEPLYADDFKGRFAFSLETSAST AYLVINNLKNEDTATFFCSNDYLYSCDYWGQGTTLTVSS	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
108	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRASESVSVIGAHLIHWY QQKPGQP PKLLIYLASNLETGV PARFSGSGSGTDFTLTIDP VEEDDVAIYSCLQSRI PRTFGGGKTKLEIK	Вариабельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
109	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFPDYINWVR QAPGQGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSI	Вариабельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA

	NTAYMELSSLTSEDTA VYFCASLYDYDWYFDVWGQGT MVTVSS	
110	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHW YLQKPGQSPQLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGQGTKLEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
111	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSPDYINWVR QAPGQGLEWMGWYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSS STAYMELSSLRSEDTA VYFCASLYDYDWYFDVWGQGT MVTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
112	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHW YLQKPGQSPQLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGADFTLKIS RVEAEDVGVYYCAETSHVPWTFGQGTKLEIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
113	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTLDYYAIGWFRQ APGKEREGVICISRSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKKTV YLQMISLKPEDTAAYYCAAGADCSGYLRDYEFRGQGTQ MVTVSS	sdAb Анти-BCMA
114	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	Спейсер CD28
115	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN	ТМ CD8a
116	LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	Спейсер CD28 (усеченный)
117	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACD	шарнир CD8a
118	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACD	шарнир CD8a
119	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACD	шарнир CD8a
120	DTGLYICKVELMYPPPYLGGINGTQIYVIDPEPCPDS	шарнир CTLA4
121	FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS	ТМ CTLA4
122	QIKESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLV	шарнир PD-1
123	VG VVGGLLGSVLLVWVLAVI	ТМ PD-1
124	GLAVSTISSFFPPGYQ	шарнир FcγRIIIa
125	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE	шарнир IgG1

	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
126	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARAEMGAVFDIWGQGMVTV SSGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRISWPFTFGGG TKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRL LHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CAR анти-BCMA
127	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRISWPFTFGGGTKVEIKRGSTSGSGKPGSGEG STKGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAEMGAVFDIWGQGT MVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRL LHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CAR анти-BCMA
128	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGTYLGGLWYFDLWGR GTLVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPLSLP VTP GEPASISCRSSQSL LHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL GSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QGLGLPLTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR	CAR анти-BCMA

	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
129	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQGLGLPLTFGGGTKVEIKRGSTSGSG KPGSGEGSTKGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGTYLG GLWYFDLWGRGTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
130	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYMHVVR QAPGQGLEWMGIINPGGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMESSLRSED TAVYYCARESWPMDVWGQTTVTVS SGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF SGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYAA YPTFGGGTK VEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPF VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
131	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE FAVYYCQQYAA YPTFGGGTKVEIKRGSTSGSGKPGSGEG STKGQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYM HWVRQAPGQGLEWMGIINPGGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARESWPMDVWGQGT TVTSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKPF	CAR анти-BCMA

	<p>WVWLVVGGVGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM  NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP  AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP  RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD  GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	
132	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIR  QPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS  LKLSSVTAADTAVYYCARGRGYATSLAFDIWGQTMVT  VSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVLTQSPATLSLSPGERAT  LSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPA  RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRHVWPPTFGG  GTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP  FWWLVVGGVGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY  MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA  PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK  PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH  DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	CAR анти-BCMA
133	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK  GQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED  FAVYYCQQRHVWPPTFGGGTKVEIKRGSTSGSGKPGSGE  GSTKGQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSY  WGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS  KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGRGYATSLAFDIWGQ  GTMVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK  PFWWLVVGGVGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSD  YMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD  APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG  KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG  HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	CAR анти-BCMA
134	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSSYSMNWVRQ  APGKGLEWVSTISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY  LQMNSLRAEDTAVYYCARGSQEHLIFDYWGQGLVTVS  SGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVLTQSPATLSLSPGERATLS  CRASQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPAR  FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRFYYPWTFGGG</p>	CAR анти-BCMA

	TKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
135	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRFYYPWTFGGGKTKVEIKRGSTSGSGKPGSGE GSTKGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSTISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSQEHLIFDYWGQG TLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
136	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDFWSGSPGLDYWGQG TLVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIQLTQSPSSVSASVG DRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQIYTFPFTF GGGKTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
137	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKP GKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQIYTFPFTFGGGKTKVEIKRGSTSGSGKPGSGE GSTKGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR	CAR анти-BCMA

	DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTDFWVSGSPGLD YWGQGTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLP GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
138	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTA YMESSLRSEDVAVYYCARTPEYSSSIWHYHYGMDVWG QGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQQAHTPFTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	CAR анти-BCMA
139	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQAHTPFTFGGGTKVEIKRGSTSGS GKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG GTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMESSLRSEDVAVYYCARTPEYSSSI WHYHYGMDVWGQGTTVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF AAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	CAR анти-BCMA
140	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN	CAR анти-BCMA

	<p>             TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGPLQEPPYDYGMDVWG              QGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGEIVMTQSPATLSV              SPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYSAST              RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQHHV              WPLTFGGGTKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP              LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRS              RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRV              KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG              RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG              ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR           </p>	
141	<p>             EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQK              GQAPRLLIYSASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE              FAVYYCQQHHVWPLTFGGGTKVEIKRGSTSGSGKPGSGE              GSTKGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM              HWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR              DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGPLQEPPYDYGM              DVWGQGTTVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP              LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSR              LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVK              SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD              PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER              RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR           </p>	CAR анти-BCMA
142	<p>             QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAP              KLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA              DYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGG              GGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLKLSCKASGYTFIDY              YVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT              MTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAMYYCARSQRDGYMDY              WGQGLTVTVSSAAAEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK              HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFW              VRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA              YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL              DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE              IGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP              R           </p>	CAR анти-BCMA

143	<p>QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQ  LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ  AEDEADYYCQSYDSSLGYVFGTGTKVTVLGSRRGGGGSG  GGGSGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS  GYTFTDYMHVWRQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQ  KFQDRITVTRDTSSNTGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPY  SGVLDKWGQGTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTII  HVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTV  AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP  RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE  EYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM  AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH  MQALPPR</p>	CAR анти-BCMA
144	<p>SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNHWYQQL  PGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQS  EDEADYYCAAWDGSLNGLVFGGGTKLTVLGSRRGGGGSG  GGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG  YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS TRYSPSFQ  GHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARYSGSFD  NWGQGTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG  KHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF  WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF  AAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD  VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA  YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  LPPR</p>	CAR анти-BCMA
145	<p>LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRSSNIGSNSVNWYRQLP  GAAPKLLIYSNNQRPPGVPVRFSGSKSGTSASLAISGLQSE  DEATYYCATWDDNLNVHYVFGTGTKVTVLGSRRGGGGG  GGGGSGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA  SGGTFFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKF  QGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGGYYS  HDMWSEDWGQGTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNG  TIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV  TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY</p>	CAR анти-BCMA

	APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR	
146	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVFWYQQL PGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDLSASVYVFGTGTKVTVLGSRRGGGS GGGSGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSYGS YRWEDSWGQGLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVVGGVLACYLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	CAR анти-BCMA
147	LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRSSNIGSNVSNWYRQLP GAAPKLLIYSNNQRPPGVPVRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEATYYCATWDDNLNVHYVFGTGTKVTVLGSRRGGGS GGGSGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGGYYS HDMWSEDWGQGLVTVSSAAAPTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVTLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
148	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWyQQL PGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQS EDEADYYCAAWDGSLNGLVFGGGTKLTVLGSRRGGGGSG GGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSSTRYSPSFQ	CAR анти-BCMA

	GHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGSFD NWGQGTLVTVSSAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	
149	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVFWYQQL PGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSASYVFGTGTKVTVLGSRRGGGS GGGSGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSGYGS YRWEDSWGQGTLVTVSSAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	CAR анти-BCMA
150	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLGSRRGGGSG GGGSGGGGSLEMAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTDYMHWRQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQ KFQDRITVTRDTSSNTGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPY SGVLDKWGQGTLVTVSSAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR	CAR анти-BCMA

151	<p>QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAP  KLMIEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA  DYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGG  GGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLCKASGYTFIDY  YVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT  MTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAMYYCARSQRDGYMDY  WGQGLVTVSSAAAPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA  CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT  LYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE  EGGCELRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD  VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA  YSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQA  LPPR</p>	CAR анти-BCMA
152	<p>DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQ  QKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRDFTLTIDPV  EEDDVAVYYCLQSRTPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGS  GEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSI  NWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSL  ETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQG  TSVTVSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR  GRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL  RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR  RGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  KGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	CAR анти-BCMA
153	<p>DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIGAHLIHWYQ  QKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGDFTLTISL  QAEDAAIYYCLQSRIFPRTFGQGTKLEIKGSTSGSGKPGSG  EGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTDYS  INWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFS  LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQ  GTLVTVSSAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK  RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE  LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK</p>	CAR анти-BCMA

	RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
154	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIGAHLIHWYQ QKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDAAIYYCLQSRIFPRTFGQGTKLEIKGSTSGSGKPGSG EGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYS INWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQ GTLVTVSSAAADTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYV IDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
155	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIGAHLIHWYQ QKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDAAIYYCLQSRIFPRTFGQGTKLEIKGSTSGSGKPGSG EGSTKGQVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDYS INWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQ GTLVTVSSAAAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHSPSPRP AGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
156	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGDYTEDYWGQGTLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPASVSGSPGQSITISCT GSSSDVGKYNLVSWEYQPPGKAPKLIYDVNKRPSGVSN RFSGSKSGNTATLTISGLQGDDEADYICSSYGGSRSYVFG TGTKVTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG	CAR анти-BCMA

	<p>LPSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL  VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG  KMFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYI  FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA  DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG  GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK  GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	
157	<p>EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFKQ  APGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSK  SIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAWSAPTDYWGQGLVTV  SSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPAFLSASVGDRVTVT  CRASQGISNYLAWYQQKPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRF  RGTGYGTEFSLTIDSLQPEDFATYYCQQSYTSRQTFGPGT  RLDIKESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR  TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  EQFQSTYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI  EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV  DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKMFV  VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPF  MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA  YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPR  RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDG  LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	CAR анти-BCMA
158	<p>EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSDYYMSWIRQ  APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSL  YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGPPSFDIWGQGMVTVS  SGGGGSGGGGSGGGGSSVYLTQPPSVSVAPGQTARITCG  ANNIGSKSVHWYQQKPGQAPMLVYDDDDRPSGIPERFS  GSNSGNTATLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRDHYVFGT  GTKLTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI  SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  REEQFQSTYRVS SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP  SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV</p>	CAR анти-BCMA

	<p>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR  LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK  MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIF  KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSAD  APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG  KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG  HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	
159	<p>SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWWYQQL  PGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQS  EDEADYYCAAWDGLNGLVFGGGTKLTVLGSRRGGGGSG  GGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG  YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQ  GHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARYSGSFD  NWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP  KDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH  NAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS  LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF  FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  SLGKMFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKK  LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS  RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD  PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	CAR анти-BCMA
160	<p>QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAP  KLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA  DYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRRGGGGSGGGGSGG  GGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLKLSCKASGYTFIDY  YVYWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT  MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAMYCYARSQRDGYMDY  WGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP  DTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  AKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS  LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF</p>	CAR анти-BCMA

	FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGKMFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
161	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAP KLMYIEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEA DYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGG GGSLEMAEVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGYTFIDY YVYWMRQAPGGGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAMYCARSQRDGYMDY WGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGKMFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
162	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGFALSNHGMSWVR RAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSTL YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTTVTVSSAS GGGGSGGRASGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA

163	<p>QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVR  QAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSVKGRFTISRDN SKN  TLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPAHHYYGGMDVWGQGT  TVT VSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVLTQSPGTLSPGE  RATLSCRASQSISSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRAT  GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSW  TFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR  GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL  RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR  RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM  KGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>	CAR анти-BCMA
164	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVR  RAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN SRNTL  YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTTVT VSSAS  GGGGSGGRASGGGGSDIRLTQSPSPLSASVGDRVTITCQA  SEDINKFLNWHQTPGKAPKLLIYDASTLQTGVPSRFSGS  GSGTDFTLTINSLQPEDIGTYCQQYESLPLTFGGGKVEI  KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF  KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD  APAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG  KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK  GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>	CAR анти-BCMA
165	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVR  RAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDN SRNTL  YLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGESDVWGQGTTVT VSSAS  GGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA  SOSIGSSSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRASGIPDRFSG  SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSPPFTFGQGTK  VEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT  RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL  YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR  SADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE</p>	CAR анти-BCMA

	MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
166	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWVK QAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSA TTAYLQINNLTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYWGQ GTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDVVMQTQSHRFMSTSV GDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQKPGQSPKLLIFSASYR YTGVPDRFTGSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCQQHYS TPWTFGGGTKLDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP PR	CAR анти-BCMA
167	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTA YLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAY DFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CAR анти-BCMA
168	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRA PGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTA YLQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPASLAMS LGKRATISCR ASESVSVIGAHLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPA RFSGSGSGTDFTLTIDPVEEDDAIYSCLQSRIFPRTFGGGT KLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH	CAR анти-BCMA

	TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
169	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQ APGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVETSAST AYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRA SESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSR TIPRTFGGGT KLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
170	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYSMNWVKQ APGKGLKWMGRINTETGEPLYADDFKGRFAFSLETSAST AYLVINNLKNEDTATFFCSNDYLYSCDYWGQGTTLTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRA SESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARF SGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSR TIPRTFGGGT KLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
171	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQ QKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPV EEDDVAVYYCLQSR TIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGS GEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSI NWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSL ETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQG	CAR анти-BCMA

	<p>TSVTVSSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE  ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI  TLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY  APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  REEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK  MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL  HMQALPPR</p>	
172	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVR  QAPGQGLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSI  NTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWFVWGGQT  MVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQP  ASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS  NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSIY  PWTFGQGTKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCG  VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC  SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN  LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ  KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY  DALHMQALPPR</p>	CAR анти-BCMA
173	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVR  QAPGQGLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSI  NTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWFVWGGQT  MVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQP  ASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS  NRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSIY  PWTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP  AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC  KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC  ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR  RRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI  GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP  R</p>	CAR анти-BCMA
174	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVR  QAPGQGLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSI  NTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLYDYDWFVWGGQT</p>	CAR анти-BCMA

	<p>MVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQP  ASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS  NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSS  IYPWTFGQGTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL  FPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT  QKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK  LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK  FSSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD  PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>	
175	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVR  QAPGQGLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSS  STAYMELSSLRSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGM  VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGEPAS  ISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS  NRFSGVPDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSH  VWPWTFGQGTKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTC  GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC  SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL  GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD  ALHMQALPPR</p>	CAR анти-BCMA
176	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVR  QAPGQGLEWMGWIYFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSS  STAYMELSSLRSEDVAVYFCASLYDYDWYFDVWGQGM  VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGEPAS  ISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS  NRFSGVPDRFSGSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSH  VWPWTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP  AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC  KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC</p>	CAR анти-BCMA

	ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP R	
177	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSPDYINWVR QAPGQGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTGRVTMTRDTSS STAYMELSSLRSEDTA VYFCASLYDYDWYFDVWGQGM VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLVTPGEPAS ISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVP WTFGQGTKLEIKPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR анти-BCMA
178	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	TM CD8a
179	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	TM CD8a
180	RAAA	Связывающий пептид
181	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLR AEDTAVYYCAKVDGDYTEDYWGQGLTVT SS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
182	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVS WYQQPPGKAPKLIYDVNKRPSGVSNRFSKSGNTATL TISGLQGDDEADYYCSSYGGRSYVFGTGTKVTVL	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA

183	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQ APGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSK SIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAWSAPTDYWGQGLVTV SS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
184	DIQMTQSPAFLSASVGDRTVTCRASQGISNYLAWYQQK PGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYGTEFSLTIDSLQP EDFATYYCQQSYTSRQTFGPGTRLDIK	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
185	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGPPSFDIWGQGMVTVS S	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
186	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHWYQQKP GQAPMLVYDDDDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGVEA GDEADYFCHLWDRSRDHVFGTGKLTVL	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
187	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSEDVAVYYCARSGYSKIVSYMDYWGQGL VTVSS	Варибельная тяжелая цепь (VH) анти-BCMA
188	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSNVFWYQQ LPGTAPKLVYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGKVTVLG	Варибельная легкая цепь (VL) анти-BCMA
189	ASGGGGSGGRASGGGG	Линкер

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ сохранения активности Т-клеток, включающий экспонирование Т-клеток из множества клеток, имеющих фенотип истощения, для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблонем (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3).

2. Способ по п.1, где одна или несколько Т-клеток включают Т-клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, который специфично связывается с целевым антигеном.

3. Способ повышения активности или сильнодействия Т-клеток и предотвращения или ингибирования, уменьшения или замедления начала истощения Т-клеток, включающий экспонирование Т-клеток из множества клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблонем (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где, по меньшей мере, часть экспонирования осуществляется при условиях, которые индуцируют или могут индуцировать фенотип истощения у Т-клеток из этого множества в отсутствие соединения.

4. Способ уменьшения или замедления начала истощения Т-клеток, включающий экспонирование Т-клеток из множества клеток для эффективного количества иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблонем (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где, по меньшей мере, часть экспонирования осуществляется при условиях, которые индуцируют или могут индуцировать фенотип истощения у Т-клеток из этого множества в отсутствие соединения.

5. Способ по п.3 или п.4, где условия включают стимулирующие условия для Т-клеток, включающие экспонирование, по меньшей мере, для одного стимулирующего агента для Т-клеток, который может стимулировать сигнал у Т-клеток из этого множества, указанный сигнал необязательно включает первичный и/или костимулирующий сигнал.

6. Способ по п.5, где условия включают постоянное, повторяющееся, пролонгированное или продолжительное экспонирование, по меньшей мере, для одного стимулирующего агента для Т-клеток.

7. Способ по п.5 или п.6, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит поликлональный агент, антиген, специфично распознающийся рецептором, экспрессируемым на Т-клетках из этого множества, или агент, который связывается рецептором антигена, экспрессируемым Т-клетками из этого множества.

8. Способ по п.5-7, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит антитело анти-CD3.

9. Способ по п.8, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток дополнительно включает агент, который специфично связывает костимулирующую молекулу Т-клетки, где костимулирующая молекула Т-клетки необязательно представляет собой CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, CD40L или ICOS.

10. Способ по п.9, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток содержит антитело анти-CD28.

11. Способ по любому из пп.3-10, где одна или несколько из Т-клеток из множества экспрессирует рекомбинантный рецептор антигена, который связывает целевой антиген.

12. Способ по п.11, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток связывается с рекомбинантным рецептором антигена.

13. Способ по п.12, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или содержит антиидиотипическое антитело специфичное к рекомбинантному рецептору антигена.

14. Способ по п.12, где, по меньшей мере, один стимулирующий агент для Т-клеток представляет собой или содержит целевой антиген или его часть, распознающуюся или связываемую рекомбинантным рецептором антигена, и/или, где условия включают экспонирование для целевого антигена.

15. Способ по любому из пп.12-14, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой рекомбинантный рецептор Т-клеток (TCR).

16. Способ по любому из пп.12-14, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

17. Способ по любому из пп.1-16, где одна или несколько Т-клеток представляют собой первичные Т-клетки человека, необязательно, от субъекта.

18. Способ по любому из пп.1-17, где экспонирование осуществляется *ex vivo*.

19. Способ по любому из пп.1-17, где экспонирование осуществляется *in vivo*.

20. Способ по п.19, где указанное экспонирование включает введение соединения субъекту, где Т-клетки необязательно происходят от субъекта, где введение соединения осуществляется указанному субъекту.

21. Способ по п.20, где указанное экспонирование включает указанное введение указанного соединения и, где перед экспонированием указанному субъекту вводится композиция, содержащая множество Т-клеток субъекта, для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием.

22. Способ по любому из пп.19-21, где указанное экспонирование включает введение указанного множества Т-клеток субъекту, где Т-клетки необязательно происходят от субъекта, где введение соединения осуществляется указанному субъекту.

23. Способ по п.22, где:

указанное экспонирование включает введение указанного множества Т-клеток указанному субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием, где перед экспонированием указанному субъекту вводится указанное соединение; или

указанное экспонирование включает введение указанного множества Т-клеток указанному субъекту для лечения заболевания или состояния, где целевой антиген необязательно ассоциируется с заболеванием или состоянием, и включает введение указанного соединения указанному субъекту.

24. Способ лечения, включающий введение субъекту иммуномодулирующего соединения, где указанное иммуномодулирующее соединение выбрано из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), где (a) указанному субъекту перед введением соединения вводится Т-клеточная терапия, включающая дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывает целевой антиген, или (b) перед введением указанного соединения или во время него, указанный субъект или образец крови от этого субъекта содержит или, как подтверждено, содержит одну или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена,

где во время введения соединения одна или несколько Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта имеют фенотип истощения.

25. Способ по п.24, где во время введения соединения, фенотип истощения одной или нескольких Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или маркер, или индикаторный параметр детектируется или измеряется у субъекта или в биологическом образце от субъекта.

26. Способ по п.24 или п.25, где, по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40% или, по меньшей мере, или примерно 50% от всех Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в биологическом образце от субъекта имеют фенотип истощения.

27. Способ по любому из пп.24-26, где примерно или больше 10%, примерно или больше 20%, примерно или больше 30%, примерно или больше 40% или примерно или больше 50% Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, в биологическом образце от субъекта имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом клеток,

экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеющих фенотип истощения, в сравнимом биологическом образце в предыдущей временной точке.

28. Способ лечения, включающий:

(а) выбор субъекта в качестве кандидата для введения иммуномодулирующего соединения, где указанный выбранный субъект имеет истощенные Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; и

(b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, где иммуномодулирующее соединение выбрано из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблонем (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование, деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3).

29. Способ по п.28, где ткань, опухоль, биологическая жидкость или биологический образец указанного выбранного субъекта или от него содержит одну или несколько Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном и который имеет фенотип истощения.

30. Способ по п.29, где ткань, опухоль, биологическая жидкость или биологический образец содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где, по меньшей мере, или примерно 10%, по меньшей мере, или примерно 20%, по меньшей мере, или примерно 30%, по меньшей мере, или примерно 40%, по меньшей мере, или примерно 50%, по меньшей мере, или примерно 60%, по меньшей мере, или примерно 70% или, по меньшей мере, или примерно 80%, от Т-клеток в указанной ткани, жидкости, опухоли или образце, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, имеют фенотип истощения.

31. Способ по п.29 или п.30, где ткань, опухоль, биологическая жидкость или биологический образец содержит множество Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном, где примерно на 10% или около того, больше, где примерно на 20% или около того, больше, примерно на 30% или около того, больше, примерно на 40% или около того, больше или примерно на 50% или около того, больше, или более чем в 2 раза больше или более чем в 3 раза больше или более чем в 5 раз больше или более чем в 10 раз больше Т-клеток в ткани, опухоли, жидкости или образце выбранного субъекта или от него, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена, имеют фенотип истощения, по сравнению с процентом или количеством Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта или в сравнимой жидкости, ткани, опухоли или образце от него в более ранней временной точке, имеющих указанный фенотип истощения.

32. Способ по п.27 или п.30, где перед указанным введением соединения, указанному субъекту вводится множество Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и более ранняя временная точка представляет собой момент времени

непосредственно перед введением субъекту Т-клеток из множества клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор антигена.

33. Способ по п.27 или п.30, где перед указанным введением соединения, указанному субъекту вводится множество Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и, где указанная более ранняя временная точка находится после точки введения Т-клеток и перед указанным выбором.

34. Способ по п.27 или п.30 или п.33, где предыдущая временная точка представляет собой момент времени:

после введения Т-клеток, экспрессирующих указанный рекомбинантный рецептор, указанному выбранному субъекту и находится на пике или максимальном уровне Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, которые детектируются в крови субъекта, или перед ним;

в диапазоне 1 дня, 2 дня, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 день, 12 дня, 13 дней, 14 дней или больше до указанного определения или выбора.

35. Способ по любому из пп.24-34, где:

во время введения Т-клеточной терапии субъект имеет заболевание или состояние; или

во время введения Т-клеточной терапии и во время введения соединения субъект имеет заболевание или состояние.

36. Способ по любому из пп.20-35, где во время введения Т-клеточной терапии субъект имеет заболевание или состояние, и во время введения **соединения** заболевание или состояние возобновляется или прогрессирует или считается не реагирующим на указанное соединение у субъекта после введения Т-клеточной терапии.

37. Способ по любому из пп.1-36, где фенотип истощения, при упоминании Т-клетки или популяции Т-клеток, включает:

повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования у Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или

понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях.

38. Способ по п.37, где происходит повышение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

39. Способ по п.37, где происходит уменьшение уровня, степени или процента больше, чем в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

40. Способ по любому из пп.37-39, где референтная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, как известно, имеющих фенотип без истощения, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно, от одного и того же субъекта, из такого же вида, что и субъект, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения.

41. Способ по любому из пп.37-40, где референтная популяция Т-клеток (а) представляет собой популяцию, соответствующую одному субъекту, содержащую Т-клетки из основного объема, выделенные из крови субъекта, у которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, где Т-клетки из основного объема необязательно не экспрессируют рекомбинантный рецептор и/или (b) получается от субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, до приема введения дозы Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

42. Способ по любому из пп.37-40, где референтная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, перед их введением субъекту, где композиция необязательно представляет собой криоконсервированный образец.

43. Способ по любому из пп.37-42, где один или несколько из одного или нескольких маркеров истощения представляет собой ингибиторный рецептор.

44. Способ по любому из пп.37-43, где один или несколько из одного или нескольких маркеров истощения выбран из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

45. Способ по любому из пп.37-44, где активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продуцирования одного воспалительного цитокина или их комбинации, где один цитокин или их комбинация необязательно выбрана из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

46. Способ по любому из пп.37-45, где экспонирование для указанного антигена или агента специфичного к рецептору антигена включает инкубирование вместе с агентом или агентом специфичным к рецептору антигена, необязательно, с агентом, который связывает рекомбинантный рецептор, где указанный антиген необязательно представляет собой целевой антиген.

47. Способ по п.46, где антиген или агент специфичный к рецептору антигена включает целевые клетки, экспрессирующие антиген, необязательно, клетки указанного заболевания, расстройства или состояния.

48. Способ по любому из пп.2 и 11-47, где целевой антиген ассоциируется, является специфичным к ним и/или экспрессируется на клетке или ткани заболевания, расстройства или состояния.

49. Способ по любому из пп.2 и 11-48, где целевой антиген представляет собой опухолевый антиген.

50. Способ по любому из пп.2 и 11-48, где целевой антиген выбран из интегрина  $\alpha\beta 6$  (интегрин  $\alpha\beta 6$ ), В-клеточного антигена созревания (BCMA), BAFF-R, B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичка, раково-тестикулярного антигена 1B (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, лиганда 1 хемокинового мотива C-C (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, CS-1, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc-подобного рецептора 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), белка связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептора альфа фолиевой кислоты, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), Рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептора тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного антигена человека, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, антигена лейкоцитов человека A1 (HLA-A1), антигена лейкоцитов человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha 2$ ), рецептора домена вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, обогащенного повторами лейцинов элемента A семейства 8 (LRRC8A), антигена Ley, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мышинных (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелана A (MART-1), нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простато-специфичного антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичного мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора 1 подобного рецептору тирозинкиназы (ROR1), сурвивина, TACI, гликопротеина трофобластов (TPBG также известен как 5T4), гликопротеина 72, ассоциированного с опухолью (TAG72), белка 1 родственного тирозинкиназе (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), белка 2 родственного тирозинкиназе (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов

(VEGFR2), опухоли 1 Вильямса (WT-1), патоген-специфичного или патоген-экспрессируемого антигена или антигена, ассоциированного с универсальной меткой, и/или биотинилированных молекул, и/или молекул экспрессируемых ВИЧ, вирусом гепатита С, вирусом гепатита В или другими патогенами.

51. Способ по любому из пп.1-42, где заболевание или состояние представляет собой В-клеточную неоплазию или неоплазию, связанную с В клетками.

52. Способ по любому из пп.2 и 11-51, где целевой антиген представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

53. Способ по любому из пп.2 и 11-52, где целевой антиген представляет собой CD19.

54. Способ по любому из пп.1-51, где заболевание или состояние представляет собой множественную миелому.

55. Способ по любому из пп.2 и 11-51 и 54, где целевой антиген представляет собой ВСМА, элемент D группы 5 класса С рецепторов, связанных с G белком (GPCR5D), CD38 (циклическую ADP рибозагидролазу), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подмножество 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI или FcRH5.

56. Способ по любому из пп.2 и 11-51 и 55, где целевой антиген представляет собой ВСМА.

57. Способ по любому из пп.26, 27 и 29-56, где биологический образец представляет собой образец крови.

58. Способ по любому из пп.26, 27 и 29-56, где биологический образец представляет собой образец опухоли, необязательно, образец от биопсии опухоли.

59. Способ лечения, включающий:

(а) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющем раковое заболевание, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при количестве, продолжительности и/или с частотой введения эффективной для:

(1) воздействия увеличения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена наивных или истощенных Т-клеток, у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(2) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(3) инвертирования фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно включающих Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного субъекта.

60. Способ по п.59, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и/или для инвертирования указанного фенотипа истощения.

61. Способ по п.59 или п.60, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения.

62. Способ по п.59 или п.60, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения.

63. Способ лечения, включающий:

(a) введение Т-клеточной терапии субъекту, имеющему раковое заболевание, указанная Т-клеточная терапия включает дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(b) введение субъекту иммуномодулирующего соединения, выбранного из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблном (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3), при количестве, продолжительности и/или с частотой введения эффективной для:

(1) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена наивных или неистощенных Т-клеток, у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(2) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(3) инвертирования фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно включающих Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного субъекта.

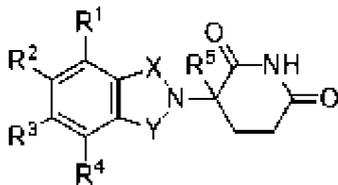
64. Способ по п.63, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и/или для инвертирования указанного фенотипа истощения.

65. Способ по п.63 или п.64, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения.

66. Способ по п.63 или п.64, где количество, продолжительность и/или частота введения являются эффективными (i) для воздействия указанного повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена, и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления фенотипа истощения и для инвертирования указанного фенотипа истощения.

67. Способ по любому из пп.1-66, где соединение обедняет или деградирует Ikaros (IKZF1).

68. Способ по любому из пп.1-67, где соединение представляет собой соединение следующей структуры:



где

один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляет собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>-;

(1) каждый из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо представляет собой галоген, алкил с 1-4 атомами углерода или алкокси с 1-4 атомами углерода, или

(2) один из R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> представляет собой -NHR<sup>a</sup>, а оставшиеся R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляют собой водород, где R<sup>a</sup> представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода;

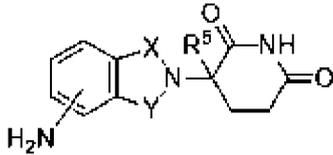
R<sup>5</sup> представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода, бензил или

галоген;

при условии, что  $R^5$  является иным, чем водород, если X и Y представляют собой -C(O)- и (i) каждый из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой фтор; или (ii) один из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  представляет собой амино;

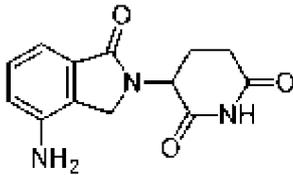
или их фармацевтически приемлемую соль.

69. Способ по любому из пп.1-68, где соединение представляет собой соединение следующей структуры:



где один из X и Y представляет собой -C(O)-, а другой из X и Y представляет собой -C(O)- или -CH<sub>2</sub>- и  $R^5$  представляет собой водород или низший алкил или их фармацевтически приемлемую соль.

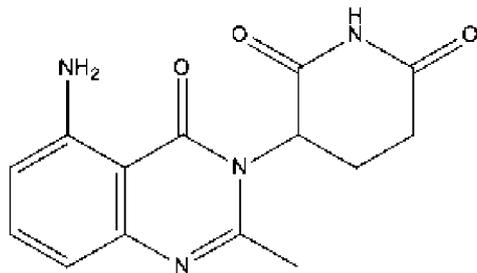
70. Способ по любому из пп.1-69, где соединение, которое представляет собой или содержит 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф.

71. Способ по любому из пп.1-70, где соединение представляет собой 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион.

72. Способ по любому из пп.1-67, где соединение представляет собой соединение, которое представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион, имеющий следующую структуру:



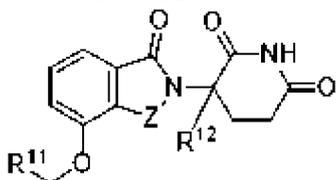
или его энантиомер или смесь энантиомеров или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, совместный кристалл, клатрат или полиморф.

73. Способ по любому из пп.1-67 и 72, где соединение представляет собой 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4H-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион.

74. Способ по любому из пп.20-73, где иммуномодулирующее соединение вводится в эффективном количестве от или примерно от 1 мг до 50 мг в день, от или примерно от 1

мг до 25 мг в день, от или примерно от 1 мг до 10 мг в день, от или примерно от 1 мг до 5 мг в день, от или примерно от 5 мг до 50 мг в день, от или примерно от 5 мг до 25 мг в день, от или примерно от 5 мг до 10 мг в день, где в ходе осуществления циклического режима введение необязательно является ежедневным.

75. Способ по любому из пп.1-67, где соединение представляет собой соединение следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер, где:

Z представляет собой C=O или CH<sub>2</sub>;

R<sup>11</sup> представляет собой Z<sup>1</sup>-R<sup>13</sup>;

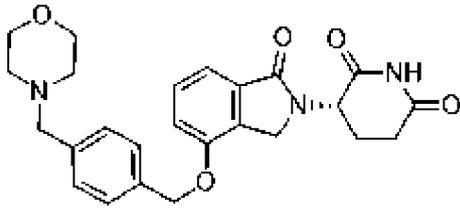
R<sup>12</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил;

Z<sup>1</sup> представляет собой 6-10 - членный арил, гетероарил или гетероцикл, каждый из которых может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или связь;

R<sup>13</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-арил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-арил, где арил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами; самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано; гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилом, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероцикл или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероцикл, где гетероцикл является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано; гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-гетероарил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-гетероарил, где гетероарил является необязательно замещенным одним или несколькими: (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, самими по себе необязательно замещенными одним или несколькими атомами галогена; (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси, самими по себе замещенными одним или несколькими атомами галогена; оксо; amino; карбоксилами; циано; гидроксилами; атомами галогена; дейтерием; 6-10 - членный арил или гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкокси или атомами галогена; -CONH<sub>2</sub>; или -COO-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилами где алкил может

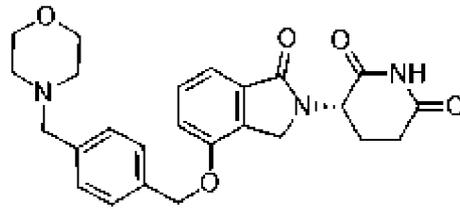
быть необязательно замещенным одним или несколькими атомами галогена; и  
 n равно 0, 1, 2 или 3.

76. Способ по любому из пп.1-67 и 75, где соединение представляет собой



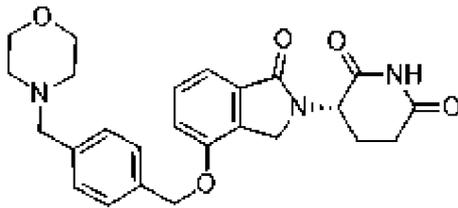
или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер.

77. Способ по любому из пп.1-67, 75 и 76, где соединение представляет собой Форму



А кристаллической формы гидроклоридной соли

78. Способ по п.77, где картина XRPD Формы А кристаллической формы



гидроклоридной соли

характеризуется пиками,

расположенными при 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или во всех следующих или в следующих примерных положениях: 9,69, 12,82, 15,09, 15,94, 16,76, 17,65, 19,44, 19,80, 2230, 22,47, 22,95, 23,02, 24,29, 24,48, 24,70, 26,27, 26,77, 27,60, 29,43, 29,72 и 32,91 градуса  $2\theta$ .

79. Способ по любому из пп.20-67 и 75-78, где иммуномодулирующее соединение вводится в количестве от или примерно от 0,1 мг до 1 мг в день, от или примерно от 0,1 мг до 0,6 мг в день, от или примерно от 0,1 мг до 0,3 мг, где введение необязательно является ежедневным в течение некоторого периода времени в циклическом режиме.

80. Способ по любому из пп.20-79, где введение соединения начинается после начала введения Т-клеточной терапии.

81. Способ по любому из пп.59-80, где раковое заболевание представляет собой В-клеточную неоплазию, неоплазию, связанную с В клетками, не гематологический рак или плотную опухоль.

82. Способ по любому из пп.59-81, где целевой антиген представляет собой опухолевый антиген, где целевой антиген необязательно ассоциируется, является специфичным к клетке или ткани рака и/или экспрессируется на ней.

83. Способ по любому из пп.59-82, где целевой антиген выбран из В-клеточного антигена созревания (BCMA), интегрина  $\alpha\nu\beta 6$  (интегрин  $\alpha\nu\beta 6$ ), VAFF-R, B7-H3, B7-H6,

карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), антигена рака яичка, раково-тестикулярного антигена 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, лиганда 1 хемокинового мотива С-С (CCL-1), CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD30, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD138, CD171, CS-1, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), усеченного белка эпидермального фактора роста (tEGFR), мутации рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, Fc-подобного рецептора 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетального рецептора ацетилхолина (фетального AchR), белка связывания фолиевой кислоты (FBP), рецептора альфа фолиевой кислоты, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), рецептора 5D, связанного с белком G (GPCR5D), Her2/neu (рецептор тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного антигена человека, ассоциированного с меланомой (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, антигена лейкоцитов человека А1 (HLA-A1), антигена лейкоцитов человека А2 (HLA-A2), Ig-каппа, Ig-лямбда, рецептора альфа IL-22 (IL-22R $\alpha$ ), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2), рецептора домена вставки киназы (kdr), молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), эпитопа CE7 L1-CAM, обогащенного повторами лейцинов элемента А семейства 8 (LRRC8A), антигена Ley, антигена, ассоциированного с меланомой (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, мышинового цитомегаловирус (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов элемента D группы 2 природных киллеров (NKG2D), мелана А (MART-1), нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), онкофетального антигена, преимущественно экспрессируемого антигеном меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простато-специфичного антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простато-специфичного мембранного антигена (PSMA), ROR1, сурвивина TACI, гликопротеина трофобластов (TPBG, также известного как 5T4), гликопротеина 72, ассоциированного с опухолью (TAG72), белка 1 родственного тирозинкиназе (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), белка 2 родственного тирозинкиназе (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), опухоли Вильямса 1 (WT-1), патоген-специфичного или патоген-экспрессируемого антигена.

84. Способ по п.51, п.82 или п.83, где В-клеточная неоплазия представляет собой лимфому.

85. Способ по п.84, где лимфома представляет собой лимфому не-Ходжкина (NHL).

86. Способ по п.85, где NHL включает агрессивную NHL, диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), DLBCL-NO, необязательно трансформированную медленно растущую В-клеточную лимфому; EBV-положительную DLBCL-NO;

обогащенную Т-клетками/гистиоцитами В-крупноклеточную лимфому; медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (PMBCL); фолликулярную лимфому (FL), необязательно, фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В); и/или В-клеточную лимфому высокой степени с перегруппировками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (двойное/тройное совпадение).

87. Способ по любому из пп.1-86, где субъект идентифицируется или был идентифицирован как имеющий статус Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG) меньший или равный 1.

88. Способ по любому 59-87, где целевой антиген представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

89. Способ по любому из пп.59-88, где целевой антиген представляет собой CD19.

90. Способ по любому из пп.59-87, где целевой антиген не представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

91. Способ по любому из пп.59-81, где рак представляет собой множественную миелому.

92. Способ по любому из пп.59-91, где целевой антиген представляет собой BCMA, элемент D группы 5 класса C рецепторов, связанных с G белком (GPRC5D), CD38 (циклическую ADP рибозагидролазу), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, подмножество 1CD2, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI или FcRH5.

93. Способ по любому из пп.59-92, где целевой антиген представляет собой BCMA.

94. Способ по любому из пп.20-93, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение трех месяцев или более после начала введения Т-клеточной терапии.

95. Способ по п.74, где эффективное количество составляет не более чем 4 мг в день или около того.

96. Способ по п.74, где эффективное количество находится в пределах от или примерно от 1,0 мг и до или примерно до 4 мг в день.

97. Способ по п.74, где эффективное количество составляет не более чем 3 мг в день или около того.

98. Способ по п.74 и 97, где эффективное количество находится в пределах от или примерно от 1,0 мг и до или примерно до 3 мг.

99. Способ по п.74, где эффективное количество составляет не более чем 2,5 мг в день или около того.

100. Способ по любому из пп.74 и 95-99, где в течение каждой недели циклического режима или в течение, по меньшей мере, одной недели циклического режима, введение соединения включает введение соединения в каждый из не более 5 последовательных дней недели, за ними следует период покоя в течение остальных дней недели, когда соединение не вводится.

101. Способ по п.100, где не более 5 последовательных дней представляют собой 3 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 4 дня, когда соединение не вводится.

102. Способ по п.100, где не более 5 последовательных дней представляют собой 4 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 3 дня, когда соединение не вводится.

103. Способ по п.100, где не более 5 последовательных дней представляют собой 5 последовательных дней в неделю, за ними следует период покоя 2 дня, когда соединение не вводится.

104. Способ по любому из пп.20-103, где введение продолжается в течение периода, который продолжается в течение примерно четырех месяцев или больше после начала введения Т-клеточной терапии.

105. Способ по любому из пп.20-104, где введение продолжается в течение периода, который продолжается в течение примерно пяти месяцев или больше после начала введения Т-клеточной терапии.

106. Способ по любому из пп.20-105, где введение продолжается в течение периода, который продолжается в течение примерно шести месяцев или больше после начала введения Т-клеточной терапии.

107. Способ по любому из пп.74 и 95-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 3 мг или около того.

108. Способ по любому из пп.74 и 95-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 2,5 мг или около того.

109. Способ по любому из пп.74 и 95-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 2 мг или около того.

110. Способ по любому из пп.74 и 95-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 1,5 мг или около того.

111. Способ по любому из пп.74 и 95-106, где введение соединения за один день представляет собой введение количества 1 мг в день или около того.

112. Способ по любому из пп.20-111, где введение соединения прекращается в конце периода, если в конце этого периода субъект демонстрирует полный ответ (CR) после лечения.

113. Способ по любому из пп.20-112, где введение соединения прекращается в конце периода, если в конце этого периода рак прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения.

114. Способ по любому из пп.20-113, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение от или примерно от трех месяцев до или примерно до шести месяцев.

115. Способ по любому из пп.20-114, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение трех или примерно трех месяцев после начала введения Т-клеточной терапии.

116. Способ по любому из пп.20-114, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение 3 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект реализует до окончания 3 месяцев или около того полный ответ (CR) после лечения или рак прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения.

117. Способ по п.116, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение 3 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект за 3 месяца реализует полный ответ (CR).

118. Способ по любому из пп.20-114, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение в течение шести месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

119. Способ по любому из пп.20-118, где введение соединения продолжается в течение периода, который продолжается в течение 6 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект реализует полный ответ (CR) после лечения до окончания 6 месяцев или около того или рак прогрессирует или возобновляется после ремиссии после лечения.

120. Способ по п.119, где период продолжается в течение 6 месяцев или около того после начала введения Т-клеточной терапии, если субъект за 6 месяцев реализует полный ответ (CR).

121. Способ по любому из пп.20-120, где введение продолжается в течение этого периода даже если субъект реализует полный ответ (CR) в некоторой временной точке до конца периода.

122. Способ по любому из пп.20-121, где субъект реализует полный ответ (CR) в течение периода введения и до конца периода введения.

123. Способ по любому из пп.20-111, 114, 115, 119, 121 и 122, дополнительно включающий продолжение введения после окончания периода, если в конце этого периода субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD).

124. Способ по любому из пп.20-123, где введение продолжается в течение более шести месяцев, если в течение шести месяцев или около того, субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) после лечения.

125. Способ по п.123 или п.124, где введение продолжается пока субъект не реализует полный ответ (CR) после лечения или пока рак не прогрессирует или не возобновляется после ремиссии после лечения.

126. Способ по любому из пп.20-125, где введение соединения начинается, когда в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии или после этого.

127. Способ по любому из пп.20-126, где введение соединения начинается примерно через 14 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии.

128. Способ по любому из пп.20-127, где введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 35 дней после начала введения Т-клеточной терапии.

129. Способ по любому из пп.20-128, где введение соединения начинается примерно через 21 - примерно 28 дней после начала введения Т-клеточной терапии.

130. Способ по любому из пп.20-129, где введение соединения начинается через 21 день или около того, через 22 дня или около того, через 23 или около того, через 24 или около того, через 25 или около того, через 26 или около того, через 27 или около того, через 28 или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

131. Способ по любому из пп.20-130, где введение соединения начинается через 28 дней или около того после начала введения Т-клеточной терапии.

132. Способ по любому из пп.20-131, где при начале введения соединения, субъект не демонстрирует острой токсичности после введения Т-клеточной терапии.

133. Способ по п.132, где:

острая токсичность представляет собой острый синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно, степени 3 или выше, CRC пролонгированной степени 3 или выше или степени 4 или 5; и/или

острая токсичность представляет собой острую нейротоксичность, необязательно, степени 3 или выше, пролонгированной степени 3 или выше или нейротоксичность степени 4 или 5.

134. Способ по любому из пп.20-133, где введение соединения временно прекращается и/или введение модифицируется, если субъект демонстрирует токсичность после введения соединения, необязательно, гематологическую токсичность.

135. Способ по п.134, где токсичность выбрана из острой нейтропении, необязательно, фебрильной нейтропении, нейтропении пролонгированной степени 3 или выше.

136. Способ по п.134 или 135, где введение соединения возобновляют, когда субъект больше не демонстрирует токсичности.

137. Способ по п.136, где введение модифицируется после возобновления введения соединения.

138. Способ по любому из пп.134-137, где модифицированное введение включает введение уменьшенного количества соединения и/или уменьшение частоты введения соединения.

139. Способ по любому из пп.134-138, где модифицированное введение включает введение уменьшенного количества соединения.

140. Способ по п.139, где доза соединения уменьшается и уменьшенное количество соединения находится в пределах между 1 мг или около того и 2 мг или около того ежедневно в течение не более 5 дней в неделю.

141. Способ по любому из пп.1-67 и 75-139, где соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона.

142. Способ по любому из пп.1-67 и 75-139, где соединение представляет собой или содержит гидрат (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона.

143. Способ по любому из пп.1-67 и 75-139, где соединение представляет собой или содержит сольват (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-диона.

144. Способ по любому из пп.1-67 и 75-139, где соединение представляет собой или содержит (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметил-бензилокси)-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил]-пиперидин-2,6-дион.

145. Способ по любому из пп.1-74 и 80-140, где соединение представляет собой или содержит сольват 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона.

146. Способ по любому из пп.1-74 и 80-140, где соединение представляет собой или содержит гидрат 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона.

147. Способ по любому из пп.1-74 и 80-140, где соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-диона.

148. Способ по любому из пп.1-74 и 80-140, где соединение представляет собой или содержит 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)-пиперидин-2,6-дион.

149. Способ по любому из пп.20-148, где соединение вводится перорально.

150. Способ по любому из пп.20-149, где введение соединения:

инвертирует фенотип истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта

предотвращает, ингибирует или замедляет появление фенотипа истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта

или понижает уровень или степень фенотипа истощения Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у субъекта или

уменьшает процент, от общего количества Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, клеток, имеющих фенотип истощения, у субъекта.

151. Способ по любому из пп.3-149, где начало введения соединения осуществляется после введения Т-клеточной терапии и после введения соединения или его начала, субъект демонстрирует восстановление или сохранение антиген- или опухоли-специфичной активности или функции Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, у указанного субъекта, необязательно, где указанное восстановление, сохранение, и/или начало введения указанного соединения, осуществляется в момент времени после того, как Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, у субъекта или в крови субъекта продемонстрируют фенотип истощения.

152. Способ по любому из пп.3-149, где введение соединения включает введение в количестве, при частоте и/или продолжительности введения эффективной для:

(а) воздействия повышения антиген-специфичной активности или активности, обусловленной рецептором антигена наивных или неистощенных Т-клеток, у субъекта,

которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(b) предотвращения, ингибирования или замедления появления фенотипа истощения у наивных или неистощенных Т-клеток у субъекта, которые необязательно включают Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, после экспонирования Т-клеток для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного соединения; или

(c) инвертирования фенотипа истощения у истощенных Т-клеток, необязательно включающих Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, у субъекта, по сравнению с отсутствием указанного введения указанного субъекта.

153. Способ по п.152, где введение соединения включает введение в количестве, при частоте и/или продолжительности введения эффективной для (i) для воздействия указанного повышения активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или замедления указанного появления указанного фенотипа истощения и/или инвертирования указанного фенотипа истощения.

154. Способ по пп.152 или 153, где Т-клетки субъекта содержат Т-клетки, экспрессирующие указанный рекомбинантный рецептор, и/или указанный антиген представляет собой целевой антиген.

155. Способ по любому из пп.150-154,

где фенотип истощения, при упоминании Т-клеток или популяции Т-клеток, включает:

повышение уровня или степени поверхностного экспрессирования Т-клетки или Т-клеток или процента Т-клеток в указанной популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностное экспрессирование одного или нескольких маркеров истощения, необязательно, 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток при таких же условиях; или

понижение уровня и степени активности, демонстрируемой указанными Т-клетками или популяцией Т-клеток при экспонировании для антигена или агента специфичного к рецептору антигена, по сравнению с референтной популяцией Т-клеток, при таких же условиях.

156. Способ по п.155, где происходит повышение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того, в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

157. Способ по п.155, где происходит уменьшение уровня, степени или процента больше в 1,2 раза или около того, в 1,5 раза или около того, в 2,0 раза или около того, в 3 раза или около того, в 4 раза или около того, в 5 раз или около того, в 6 раз или около того,

в 7 раз или около того, в 8 раз или около того, в 9 раз или около того, в 10 раз или около того или более.

158. Способ по любому из пп.155-157, где референтная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, как известно, имеющих фенотип без истощения, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно, от одного и того же субъекта из такого же вида, что и субъект, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения.

159. Способ по любому из пп.155-158,

где референтная популяция Т-клеток (а) представляет собой популяцию, соответствующую одному субъекту, содержащую Т-клетки из основного объема, выделенные из крови субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, где Т-клетки из основного объема необязательно не экспрессируют рекомбинантный рецептор, и/или (b) получается от субъекта, от которого получают Т-клетку или Т-клетки, имеющие фенотип истощения, до приема введения дозы Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

160. Способ по любому из пп.155-158,

где референтная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, перед их введением субъекту, где композиция необязательно представляет собой криоконсервированный образец.

161. Способ по любому из пп.155-160, где один или несколько маркеров истощения представляют собой ингибиторный рецептор.

162. Способ по любому из пп.155-161, где один или несколько маркеров истощения выбираются из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, VTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

163. Способ по любому из пп.155-162, где активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продуцирования одного воспалительного цитокина или их комбинации, необязательно, где один цитокин или их комбинация выбрана из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

164. Способ по любому из пп.155-163,

где экспонирование для указанного антигена или агента специфичного к рецептору антигена включает инкубирование вместе с агентом или агентом специфичным к рецептору антигена, необязательно, с агентом, который связывает рекомбинантный рецептор, где указанный антиген необязательно представляет собой целевой антиген.

165. Способ по п.164, где антиген или агент специфичный к рецептору антигена содержит целевые клетки, экспрессирующие антиген, необязательно, клетки указанного заболевания, расстройства или состояния.

166. Способ по любому из пп.2 и 11-165, где целевой антиген представляет собой антиген человека.

167. Способ по любому из пп.1-166, где субъект представляет собой человека.

168. Способ по любому из пп.1-167, где рекомбинантный рецептор антигена представляет собой химерный рецептор антигена, который специфично связывает целевой антиген.

169. Способ по п.16 или п.168, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфично связывается с целевым антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

170. Способ по п.169, где внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен цепи CD3-зета (CD3 $\zeta$ ), необязательно, цепи CD3-зета человека.

171. Способ по п.169 или п.170, где химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

172. Способ по п.171, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен CD28 или 4-1BB, необязательно, CD28 человека или 4-1BB человека

173. Способ по п.171 или п.172, где костимулирующий домен представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB человека.

174. Способ по любому из пп.16 и 168-173, где:

CAR содержит scFv специфичный к целевому антигену; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит 4-1BB, необязательно, 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен CD3 зета, необязательно, сигнальный домен CD3 зета человека; и где, необязательно, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv;

CAR содержит, по порядку, scFv специфичный к целевому антигену; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB, необязательно, сигнальный домен 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой сигнальный домен CD3 зета, необязательно, сигнальный домен CD3 зета человека; или

CAR содержит, по порядку, scFv специфичный к целевому антигену; спейсер; трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно представляет собой сигнальный домен 4-1BB и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, который необязательно представляет собой или содержит сигнальный домен CD3 зета.

175. Способ по любому из пп.21-174, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит от или примерно от  $1 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $1 \times 10^6$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток,

в целом,  $1 \times 10^7$ - $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом,  $5 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, в целом, в каждом случае, включительно.

176. Способ по любому из пп.21-175, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^5$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^6$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^7$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $1 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $2,5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно  $5 \times 10^8$  CAR-экспрессирующих клеток.

177. Способ по любому из пп.21-176, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит  $5 \times 10^7$  или около того CAR-экспрессирующих клеток, в целом.

178. Способ по любому из пп.21-177, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит  $1 \times 10^8$  или около того CAR-экспрессирующих клеток.

179. Способ по любому из пп.21-178, где доза клеток вводится парентерально, необязательно, внутривенно.

180. Способ по любому из пп.21-179, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

181. Способ по любому из пп.21-180, где Т-клетки являются аутологичными для субъекта.

182. Способ по любому из пп.21-180, где Т-клетки являются аллогенными для субъекта.

183. Способ по любому из пп.21-182, где доза генно-инженерных Т-клеток содержит Т-клетки CD4+, экспрессирующие CAR, и Т-клетки CD8+, экспрессирующие CAR, и введение дозы включает введение множества отдельных композиций, указанное множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую один вид клеток из Т-клеток CD4+ и Т-клеток CD8+ и вторую композицию, содержащую другой вид клеток из Т-клеток CD4+ или Т-клеток CD8+.

184. Способ по любому из пп.21-183, где перед введением, субъект предварительно кондиционируется с помощью противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфамида.

185. Способ по любому из пп.21-184, дополнительно включающий непосредственно перед введением, введение субъекту противолимфомной терапии, включающей введение флударабина и/или циклофосфамида.

186. Способ по п.184 или п.185, где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида, примерно 200-400 мг/м<sup>2</sup>, необязательно 300 мг/м<sup>2</sup> или около того, включительно, и/или флударабина, примерно 20-40 мг/м<sup>2</sup>, необязательно 30 мг/м<sup>2</sup>, ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней или, где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида, примерно 500 мг/м<sup>2</sup>.

187. Способ по любому из пп.184-186, где:

противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида 300 мг/м<sup>2</sup> или около того и флударабина, примерно 30 мг/м<sup>2</sup> ежедневно в течение 3 дней; и/или

противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида, 500 мг/м<sup>2</sup> или около того, и флударабина, 30 мг/м<sup>2</sup> или около того, ежедневно в течение 3 дней.

188. Способ по любому из пп.20-187, где:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, леченых согласно настоящему способу, реализуют полный ответ (CR), который является стойким, или он является стойким, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих CR, в течение 6 месяцев или больше или в течение 9 месяцев или больше; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих CR в течение 6 месяцев, сохраняют ответ, сохраняют CR и/или проживают или проживают без прогрессирования, в течение 3 месяцев или больше и/или 6 месяцев или больше и/или в течение девяти месяцев или больше; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 70% субъектов, леченых согласно настоящему способу, реализуют объективный ответ (OR), где OR необязательно является стойким или он является стойким, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих, в течение 6 месяцев или больше или в течение 9 месяцев или больше; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, реализующих в течение 6 месяцев, сохраняют ответ или проживают 3 месяца или больше и/или 6 месяцев или больше.

189. Набор, содержащий:

(а) Т-клеточную терапию, включающую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор антигена, который связывается с целевым антигеном; и

(b) иммуномодулирующее соединение, выбранное из группы, состоящей из: аналогов талидомида; производных талидомида; соединений, которые взаимодействуют и/или связываются с цереблонеом (CRBN), и/или одного или нескольких элементов комплекса CRBN и E убиквитинлигазы; ингибиторов Ikaros (IKZF1); ингибиторов Aiolos (IKZF3) и соединений, которые усиливают или облегчают убиквитинирование и/или деплецию и/или деградацию Ikaros (IKZF1) и/или Aiolos (IKZF3); и

(с) инструкции для введения соединения и/или Т-клеточной терапии согласно способам по любому из пп.1-187.

По доверенности