

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041322**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.10

(21) Номер заявки
201590210

(22) Дата подачи заявки
2013.07.12

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)

**(54) КОНТРОЛЬ НАД ТОКСИЧНОСТЬЮ В СЛУЧАЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
АКТИВНОСТИ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ (CAR)**

(31) 61/671,482; 61/782,982

(32) 2012.07.13; 2013.03.14

(33) US

(43) 2015.08.31

(86) PCT/US2013/050267

(87) WO 2014/011984 2014.01.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ
ПЕНСИЛЬВАНИЯ; ДЗЕ ЧИЛДРЕН'З
ХОСПИТАЛ ОФ ФИЛАДЕЛЬФИЯ
(US)

(72) Изобретатель:
Джун Карл Х., Левин Брюс Л., Кейлос
Майкл Д., Грапп Стефан (US)

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

(56) WO-A1-2012079000

US-A1-20100273797

US-A1-20090325167

MORGAN et al.: "Case Report of a Serious
Adverse Event Following the Administration of T
Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor
Recognizing ErbB2." Mol Ther. 18(4): Pages 843-51,
23 February 2010, entire document

KALOS et al.: "T Cells with Chimeric
Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and
Can Establish Memory in Patients with Advanced
Leukemia." Sci Transl Med. 3(95): Pages 1-21
(95ra73), 10 August 2011, entire document

(57) Изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественного новообразования у пациента. В одном из вариантов осуществления способ включает терапию первой линии, включающую введение пациенту генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область, CD3 дзета сигнальный домен, и контроль уровней цитокинов у пациента после инфузии Т-клеток для определения типа второй линии терапии, соответствующей лечению пациента вследствие присутствия CAR Т-клеток у пациента.

B1**041322****041322****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США № 61/671482, поданной 13 июля 2012 г. и, предварительной патентной заявки США № 61/782982, поданной 14 марта 2013 г., каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Предшествующий уровень изобретения

Пациенты с рецидивирующей и рефрактерной к химиотерапии острой лимфоцитарной лейкемией (ALL) имеют неблагоприятный прогноз, несмотря на использование инвазивных способов лечения, таких как трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (Barrett et al., 1994, N Engl J Med 331:1253-8; Gokbuget et al., 2012, Blood 120:2032-41) и фрагментов CD19-биспецифических антител (Bargou et al., 2008, Science 321:974-7). Сообщалось, что Т-клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором, нацеленным на линиеспецифические антигены CD19 и CD20, эффективны у взрослых людей с CLL и лимфомами В-клеток (Till et al., 2008, Blood 112:2261-71; Kochenderfer et al., 2010, Blood 116:4099-102; Brentjens et al., 2011, Blood 118:4817-28; Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-5). Однако, эффекты CAR-Т-клеток на бластные клетки при ALL, более незрелой лейкемии с более быстрым прогрессированием, не были исследованы полностью.

Сообщалось о замедленном наступлении синдрома лизиса опухоли и секреции цитокинов, в сочетании с интенсивным *in vivo* размножением Т-клеток с химерным антигенным рецептором (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Однако, эффекты секреции цитокинов, и расстройства, связанные с *in vivo* размножением Т-клеток с химерным антигенным рецептором не были полностью исследованы.

Таким образом, в настоящей области существует потребность в композициях и способах лечения злокачественного новообразования, с использованием Химерных Антигенных

Рецепторов (CAR) и разрешением проблем токсичности CAR. Настоящее изобретение отвечает этой потребности.

Краткое содержание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием, связанным с повышенной экспрессией опухолевого антигена. В одном из вариантов осуществления способ предусматривает проведение терапии первой линии и терапии второй линии пациенту, где терапия первой линии включает введение пациенту эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала.

В одном из вариантов осуществления после проведения терапии первой линии уровни цитокина у пациента подвергают контролю для определения соответствующего типа терапии второй линии для проведения пациенту, и соответствующую терапию второй линии проводят пациенту.

В одном из вариантов осуществления повышение уровня цитокина идентифицирует тип цитокин-ингибирующей терапии для проведения пациенту.

В одном из вариантов осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1 β r, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, факторов CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXIN, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ферритина и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления цитокин-ингибирующая терапия выбрана из группы, состоящей из малой интерферирующей РНК (миРНК), микроРНК, антисмысловой нуклеиновой кислоты, рибозима, вектора экспрессии, кодирующего трансдоминантный негативный мутант, антитела, пептида, малой молекулы, цитокин-ингибирующего лекарственного средства и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления уровни цитокина подвергают контролю посредством обнаружения белкового уровня цитокина в биологическом образце пациента.

В одном из вариантов осуществления уровни цитокина подвергают контролю посредством обнаружения уровня нуклеиновой кислоты для цитокина в биологическом образце пациента.

Настоящее изобретение относится к способу снижения или предотвращения нежелательного явления, связанного с введением клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, способ, включающий текущий контроль уровней цитокина у пациента для определения соответствующего типа цитокиновой терапии для проведения у пациента и проведения у пациента соответствующей цитокиновой терапии.

В одном из вариантов осуществления повышение уровня цитокина идентифицирует тип цитокин-ингибирующей терапии для проведения пациенту.

В одном из вариантов осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, факторов CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXIN, EGF, HGF, FGF- β ,

CD40, CD40L, ферритина и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления цитокинингибирующая терапия выбрана из группы, состоящей из малой интерферирующей РНК (миРНК), микроРНК, антисмысловой нуклеиновой кислоты, рибозима, вектора экспрессии, кодирующего трансдоминантный негативный мутант, внутриклеточного антигена, пептида, малой молекулы, цитокинингибирующего лекарственного средства и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления уровни цитокина подвергают контролю посредством обнаружения уровня белка для цитокина в биологическом образце пациента.

В одном из вариантов осуществления уровни цитокина подвергают контролю посредством обнаружения уровня нуклеиновой кислоты для цитокина в биологическом образце пациента.

Краткое описание чертежей

Нижеследующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет более понятно при прочтении в совокупности с прилагаемыми фигурами. Для иллюстрации изобретения на фигурах показаны варианты осуществления, которые в настоящее время являются предпочтительными. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничено точными расстановками и инструментальными средствами вариантов осуществления, показанных на фигурах.

Фиг. 1 представляет собой изображение, демонстрирующее сывороточные уровни цитокинов у четырех различных пациентов. Все пациенты проявляли высвобождение цитокинов, в том числе IL-6.

Фиг. 2 представляет собой изображение, отображающее сывороточные уровни цитокинов, нанесенные на график для представительного пациента. Пациент находился в критическом состоянии на 5-7 дни, и улучшение состояния началось только после введения тоцилизумаба.

Фиг. 3 представляет собой изображение, демонстрирующее, что интервенции антител не оказывают воздействия на клеточную функциональность CART19 по данным измерений маркеров активности Т-клеток (перфорина и IFN- γ).

Фиг. 4, содержащая фиг. 4А-4С, представляет собой ряд изображений, отображающих клинические ответы. Фиг. 4А показывает результаты для двух детей с множественно рецидивирующей рефрактерной к химиотерапии острой лимфобластной лейкемии с CD19+ предшественниками В-клеток, которые подвергались лечению клетками CTL019, введенными посредством инфузии в День 0. Изменения сывороточной лактатдегидрогеназы (LDH) и температуры тела после инфузии CTL019, с максимальной температурой на 24-часовой период обозначены кружками. CHOP-100 получал метилпреднизолон, начиная с дня 5 при 2 мг/кг/день, со снижением на день 12. Утром дня 7 был прием этанерцепта, 0,8 мг/кг $\times$ 1. В 6 ч вечера в день 7, вводили тоцилизумаб, 8 мг/кг $\times$ 1. Временное улучшение пирексии происходило при введении кортикостероидов на день 5 у CHOP-100, с полным излечением от высоких температур, имеющих место после введения цитокин-направленной терапии, состоящей из этанерцепта и тоцилизумаба, на день 8. Фиг. 4В показывает сывороточные цитокины и маркеры воспаления, измеренные в многократных временных точках после инфузии CTL019. Значения для цитокинов показаны с использованием графика в полулогарифмическом масштабе с кратностью изменения от исходного уровня. Значения исходных уровней (День 0, перед инфузией) (пг/мл сыворотки) для каждого анализируемого вещества составляли (CHOP-100, CHOP-101): IL1- β : (0,9, 0,2); IL-6: (4,3, 1,9); TNF- α : (1,5, 0,4); IL2R α : (418,8, 205,7); IL-2: (0,7, 0,4); IL-10 (9,9, 2,3); IL1R α : (43,9, 27,9). У обоих пациентов развивались выраженные повышения количества цитокинов и цитокиновых рецепторов, включающих растворимый рецептор интерлейкина 1A и 2 (IL-1RA и IL-2R), интерлейкинов 2, 6 и 10 (IL-2, IL-6 и IL-10), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), и интерферона- γ (INF- γ). Фиг. 4С показывает изменения по циркуляции абсолютного содержания нейтрофилов (ANC), абсолютного содержания лимфоцитов (ALC) и абсолютного содержания лейкоцитов (WBC). Примечательно, что увеличение ALC в первую очередь состояло из активированных лимфоцитов CT019 T.

Фиг. 5, содержащая фиг. 5А-5D, представляет собой ряд изображений, отображающих размножение и визуализацию клеток CTL019 в периферической крови, костном мозге и СМЖ. Фиг. 5А показывает результаты проточного цитометрического анализа периферической крови, окрашенной антителами для обнаружения CD3 и анти-CD19 с CAR. Показан процент CD3-клеток, экспрессирующих CAR у CHOP-100 и CHOP-101. Фиг. 5В показывает присутствие Т-клеток CTL019 в периферической крови, костном мозге и СМЖ посредством количественной ПЦР в реальном времени. Геномную ДНК выделяли из цельной крови, аспиратов костного мозга и СМЖ, собранных в последующих временных точках до и после инфузии CTL019. Фиг. 5С показывает обнаружение методом проточной цитометрии клеток CTL019 в СМЖ, собранной от CHOP-100 и CHOP-101. Фиг. 5D показывает изображения активированных больших гранулярных лимфоцитов в окрашенных по Райту мазках периферической крови и цитоспиновых мазках СМЖ.

Фиг. 6 представляет собой изображение, показывающее экспрессию CD19 на исходном уровне и при рецидиве у CHOP-101. Образцы костного мозга от CHOP-101 были получены перед инфузией CTL019 и во время рецидива 2 месяца спустя. Мононуклеарные клетки, выделенные из образцов костного мозга, окрашивали для обнаружения CD45, CD34 и CD19 и анализировали на проточном цитометре.

Assuri C6. После установки дискриминационного окна на живые клетки, окно для бластных клеток (CD45+ SSC низкие) было отрегулировано для клеток CD34+, и гистограммы генерировали для экспрессии CD19.

Линия разделения представляет порог для одного и того же дискриминационного окна для изотипических контролей. Властные клетки до терапии имеют диапазон распределения CD19, с небольшой популяцией очень тускло окрашенных клеток, видимых как хвостовая часть левой гистограммы при 10^2 на X-оси. Образец при рецидиве не содержал каких-либо CD19-положительных бластных клеток. Анализ экспрессии CD19 в популяции бластных клеток до лечения показал присутствие небольшой популяции CD19-тусклых или -отрицательных клеток. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) этой небольшой популяции клеток составляла 187 (левая панель), аналогично MFI для анти-CD19-окрашенных рецидивирующих бластных клеток (201, правая панель). Образец костного мозга до терапии был гипоцеллюлярным с 10% бластных клеток, и образец костного мозга при рецидиве был нормоцеллюлярным с 68% бластных клеток, с учетом различий по событиям, доступных для сбора данных.

Фиг. 7 представляет собой изображение, показывающее индукцию ремиссии в костном мозге у CHOP-101 на день +23 после инфузии CTL019. Клинический отчет иммунофенотипирования для CHOP-101 при исходном уровне (Верхняя панель) и в день +23 (Нижняя панель). Клетки окрашивали для обнаружения CD10, CD19, CD20, CD34, CD38 и CD58. Проточную цитометрию проводили после лизиса эритроцитов. Отчет на день +23 показал, что лейкоциты состояли из 42,0% лимфоцитов, 6,0% моноцитов, 50,3% миелоидных форм, 0,17% миелоидных бластных клеток и не содержали жизнеспособных лимфоидных клеток-предшественников. По данным проточной цитометрии, отсутствовало убедительное иммунофенотипическое подтверждение остаточных лимфобластных предшественников В-клеток лейкемии/лимфомы. По существу, никаких жизнеспособных В-клеток не было идентифицировано.

Фиг. 8 представляет собой изображение, отображающее размножение *in vivo* и устойчивость клеток CTL019 в крови. Число лейкоцитов (WBC), CD3+ Т-клеток, и клеток CTL019 в крови показано для CHOP-100 и CHOP-101. Число клеток показано на графике в полулогарифмическом масштабе.

Фиг. 9, содержащая фиг. 9А и 9В, представляет собой ряд изображений, демонстрирующих, что индивиды имели элиминацию CD19-положительных клеток в костном мозге и крови в пределах 1 месяца после инфузии CTL019. Фиг. 9А показывает персистирующую аплазию В-клеток у CHOP-100. Верхняя панель показывает преобладающую популяцию лейкозных бластных клеток в костном мозге, аспирированных из CHOP-100, экспрессирующих CD19 и CD20 на день +6. Данная популяция отсутствует в день +23 и через 6 месяцев. Фиг. 9В показывает аплазию В-клеток и выброс ускользнувших вариантных клеток CD19 у CHOP-101. Проточный цитометрический анализ аспирированных костного мозга из CHOP-101 окрашивался анти-CD45, CD34 и CD19. В нижнем ряду использовали боковое светорассеяние и CD45-слабоположительные клетки, чтобы идентифицировать лейкозные клетки, которые экспрессируют переменные количества CD34 и CD19 на исходном уровне. Только CD19-отрицательные бластные клетки обнаруживали на день 64. Числовые значения на верхней панели представляют фракцию общих лейкоцитов, представленную в каждом квадранте. Числовые значения на нижней панели представляют процентную долю от общих лейкоцитов, представленных в низком канале CD45 слабый/33.

Фиг. 10 представляет собой график, отображающий уровни ферритина, присутствующие у пациента после приема CAR-T-клеток.

Фиг. 11 представляет собой график, отображающий уровни миоглобина, присутствующие у пациента после приема CAR-T-клеток.

Фиг. 12 представляет собой график, отображающий уровни ингибитора-1 активатора плазминогена (PAI-1), присутствующие у пациента после приема CAR-T-клеток.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественных новообразований, включающих, но ими не ограничиваясь, гемобласты и солидные опухоли. Изобретение также охватывает способы лечения и профилактики некоторых типов злокачественных новообразований, включающих первичные и метастазирующие опухоли, а также злокачественные новообразования, которые не поддаются лечению или являются резистентными по отношению к общепринятой химиотерапии. Способы включают введение пациенту терапевтически или профилактически эффективного количества Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерный антигенный рецептор (CAR). CAR представляют собой молекулы, которые сочетают специфичность антитела для желательного антигена (например, опухолевого антигена) с рецептор-активирующим внутриклеточным доменом Т-клеток для генерации химерного белка, который проявляет специфичную противоопухолевую клеточную иммунную активность.

В качестве части полного режима лечения, изобретение охватывает способы контроля некоторых злокачественных новообразований (например, профилактики или пролонгирования их рецидива или удлинения времени ремиссии) посредством оценки профиля растворимых факторов у пациентов после инфузии Т-клеток. Предпочтительно профиль растворимых факторов включает оценку профиля цитокинов. Когда профиль цитокинов указывает на увеличение конкретного цитокина после инфузии Т-клеток в сравнении с состоянием перед инфузией Т-клеток, квалифицированный специалист в данной области

может произвести выбор, чтобы ввести пациенту, нуждающемуся в таком контроле, эффективное количество цитокинингибирующего соединения или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата, гидрата, стереоизомера, клатрата или пролекарства для контроля повышенных уровней цитокина после инфузии Т-клеток.

Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что идентификация уникальной комбинации факторов, модуляция которых от исходного уровня или ранее существующих уровней при исходном состоянии может способствовать отслеживанию активации Т-клеток, целевой активности и потенциальных вредных побочных эффектов после инфузии CAR-Т-клеток для того, чтобы способствовать контролю лечения злокачественного новообразования. Примеры факторов включают, но ими не ограничены, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1R α , IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, факторы CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXIN, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ферритин и т.п.

Настоящее изобретение относится к стратегии адоптивного клеточного переноса Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) в комбинации с контролем над токсичностью, где генерируется профиль растворимых факторов от пациента после инфузии Т-клеток, и проводят терапию, направленную против повышенного растворимого фактора для лечения злокачественного новообразования. Например, получение профиля растворимого фактора в реальном времени позволяет проводить вмешательство в повышенные растворимые факторы с помощью соответствующего ингибитора для снижения уровней до нормальных уровней.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит внеклеточный домен, имеющий антигенраспознающий домен, который нацелен на желательный антиген, трансмембранный домен, и цитоплазматический домен. Настоящее изобретение не ограничено конкретным CAR. Более того, любой CAR, который нацелен на желательный антиген может использоваться в соответствии с настоящим изобретением. Композиции и способы получения CAR описаны в PCT/US11/64191, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, приведенных выше, способы приводят в результате к измеряемому снижению размера опухоли или подтверждению заболевания или прогрессирования заболевания, полной ремиссии, частичной ремиссии, стабилизации заболевания, увеличению или продлению периода выживаемости без прогрессирования заболевания, увеличению или продлению периода общей выживаемости или снижению токсичности.

Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, в котором обычно являются понятными для рядового специалиста в области, к которой относится изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем описании, могут применяться на практике для тестирования настоящего изобретения, в настоящем описании описаны предпочтительные материалы и способы. При описании и составлении формулы настоящего изобретения, будет использована следующая терминология.

Следует также понимать, что используемая в настоящем описании терминология служит цели описания только конкретных вариантов осуществления, и не подразумевается как ограничивающая.

"Приблизительно", как используют в настоящем описании, при ссылке на измеряемое значение, такое как количество, продолжительность времени и т.п., означает, что оно охватывает вариации, равные $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, в некоторых случаях $\pm 5\%$, в некоторых случаях $\pm 1\%$, и в некоторых случаях $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие вариации являются подходящими для осуществления раскрытых способов.

Термин "активация", как используют в настоящем описании, относится к состоянию Т-клеток, которые были достаточно простимулированы, чтобы индуцировать обнаруживаемую клеточную пролиферацию. Активация может также быть связана с индуцируемой выработкой цитокинов и обнаруживаемыми эффекторными функциями. Термин "активированные Т-клетки" относится, среди прочего, к Т-клеткам, которые проходят через деление клеток.

Термины "активаторы" или "агонисты" растворимого фактора используют в настоящем описании для обозначения молекул средств, способных к активации или увеличению уровней растворимого фактора. Активаторы представляют собой соединения, которые увеличивают, инициируют, индуцируют активацию, активируют или регулируют с повышением активность или экспрессию растворимого фактора, например, агонистов.

Аналитические тесты для обнаружения активаторов включают, например, экспрессирование растворимого фактора *in vitro*, в клетках, или клеточных мембранах, с применением предполагаемых агонистических соединений, и затем определение функциональных эффектов на активность растворимого фактора, как описано где-либо еще в настоящем описании.

Термин "антитело" как используют в настоящем описании, относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные им-

муноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела часто являются тетрамерами иммуноглобулиновых молекул. Антитела в настоящем изобретении могут существовать в разнообразных формах, включающих, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, B: Using Antibodies: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела и относится к антиген-определяющим вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, антитела scFv, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела.

Термин "антиген" или "Ag", как используют в настоящем описании, определяет молекулу, которая вызывает иммунный ответ. Данный иммунный ответ может включать либо выработку антител или активацию специфических иммунологически-компетентных клеток или и то и другое. Квалифицированный специалист в данной области поймет, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Квалифицированный специалист в данной области поймет, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или частичную нуклеотидную последовательность, кодирующие белок, который вызывает иммунный ответ, следовательно, кодирует "антиген", в том смысле, в каком этот термин используют в настоящем описании. Кроме того, квалифицированный специалист в области поймет, что антиген необязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно выражено, что настоящее изобретение включает, но не ограничено им, применение частичных нуклеотидных последовательностей из более, чем одного гена, и то, что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях, чтобы вызывать желательный иммунный ответ. Более того, квалифицированный специалист в данной области поймет, что антиген вообще необязательно должен кодироваться "геномом". Очевидно выражено, что антиген может генерироваться синтезированным или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничен ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Термин "аутоантиген" означает, согласно настоящему изобретению, любой свой антиген, который распознается иммунной системой, как если бы являлся чужеродным. Аутоантигены содержат, но не ограничены ими, клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности.

Термин "аутоиммунное заболевание", как используют в настоящем описании, определяют как расстройство, которое является результатом аутоиммунного ответа. Аутоиммунное заболевание является результатом неадекватного и избыточного ответа на собственный антиген. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, но не ограничены ими, болезнь Аддисона, круговую алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (Типа I), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, тяжелую миастению, обыкновенную пузычатку, псориаз, ревматический полиартрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Сегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит, среди других.

Как используют в настоящем описании, термин "аутологичный" подразумевает обозначение любого материала, полученного из индивидуума, который позже подлежит введению тому же самому индивидууму.

"Аллогенный" относится к трансплантату, полученному от другого животного такого же вида.

"Ксеногенный" относится к трансплантату, полученному от животного отличающегося вида.

Термин "злокачественное новообразование", как используют в настоящем описании, определяют как заболевание, характеризующееся быстрым неконтролируемым ростом аберрантных клеток.

Злокачественные клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Примеры различных злокачественных новообразований включают, но не ограничены ими, рак молочной железы, рак простаты, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак почки, рак печени, рак мозга, лимфому, лейкемию, рак легких и т.п.

Как используют в настоящем описании, термин "комбинированная терапия" означает, что первое средство вводят в совокупности с еще одним другим средством. Выражение "в совокупности с" относится к проведению одного способа лечения в дополнение к еще одному другому способу лечения. Как таковое, выражение "в совокупности с" относится к проведению одного способа лечения до, во время или после доставки другого способа лечения индивидууму. Такие комбинации рассматривают как часть единственного режима лечения или режима.

Как используют в настоящем описании термин "сопутствующее проведение" означает, что проведение первой терапии и проведение второй терапии при комбинированной терапии перекрываются друг с другом.

Термин "костимулирующий лиганд", как используется в настоящем описании, включает молекулу на антигенпредставляющей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывается с когнатной ко-стимулирующей молекулой на Т-клетке, посредством этого предоставляя сигнал, который, в дополнение к первичному сигналу, предоставляемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, опосредует ответ Т-клетки, включающий, но не ограниченный ими, пролиферацию, активацию, дифференциацию и т.п. Костимулирующий лиганд может включать, но ими не ограничиваясь, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которые связываются с рецептором Toll-лиганда, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимулирующий лиганд также охватывает, среди прочих, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, но не ограниченной ими, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-связанный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Термин "костимулирующая молекула" относится к партнеру когнатного связывания на Т-клетке, который специфически связывается с ко-стимулирующим лигандом, посредством этого опосредуя костимулирующий ответ от Т-клетки, такой как, но не ограниченный ею, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, но ими не ограничиваясь, молекулу класса I МНС, BTLA и рецептор Toll-лиганда.

Термин "костимулирующий сигнал", как используют в настоящем описании, относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или регуляции с повышением или регуляции с понижением ключевых молекул.

"Заболевание" представляет собой состояние здоровья животного, где животное не может поддерживать гомеостаз, и, где, если заболевание не облегчается, тогда здоровье животного продолжает ухудшаться. Напротив, "нарушение" у животного представляет собой состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного является менее благоприятным, чем могло бы быть в отсутствии нарушения. Оставленное без лечения, нарушение не обязательно вызывает дальнейшее ухудшение состояния здоровья животного.

"Эффективное количество", как используют в настоящем описании, означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический благоприятный эффект.

Как используют в настоящем описании, "эндогенный" относится к любому веществу из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому внутри них.

Как используют в настоящем описании, термин "экзогенный" относится к любому веществу, вводимому в организм, клетку, ткань или систему, которое было продуцировано вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин "экспрессия", как используют в настоящем описании, определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, управляемую ее промотором.

"Вектор экспрессии" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточные цис-действующие элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть поставлены клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, известные в данной области, такие как космиды, плазмиды (например, изолированные или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденосвязанные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

Термин "гомологичный" относится к подобию последовательностей или идентичности последовательностей между двумя полипептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Когда положение у обеих из двух сравниваемых последовательностей занято одинаковым основанием или одинаковой мономерной субъединицей аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, тогда молекулы являются гомологичными по такому положению. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией числа совпадающих или гомологичных положений, являющихся одинаковыми у двух последовательностей, разделенного на число сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений у двух последовательностей являются совпадающими или гомологичными, тогда две последовательности являются на 60% гомологичными. Посредством примера, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC имеют 50% гомологию. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены, чтобы обеспечить максимальную гомологию.

Термин "иммуноглобулин" или "Ig," как используют в настоящем описании, определяют как класс

белков, которые функционируют в качестве антител. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда называют BCR (В-клеточным рецептором) или антигенным рецептором. Пять членов, включенные в данный класс белков, представляют собой IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA представляет собой первичное антитело, которое присутствует в секретах организма, таких как слюна, слезы, грудное молоко, желудочно-кишечные секреты и слизистые секреты дыхательного и мочеполового трактов. IgG является наиболее распространенным циркулирующим антителом. IgM представляет собой основной иммуноглобулин, продуцируемый при первичном иммунном ответе у большинства индивидов. Он является наиболее эффективным иммуноглобулином при агглютинации, фиксации комплемента и других ответах с участием антител, и является важным при защите против бактерий и вирусов. IgD является иммуноглобулином, который не имеет известной функции антитела, но может служить в качестве антигенного рецептора. IgE является иммуноглобулином, который опосредует гиперчувствительность немедленного типа, вызывая высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов при воздействии аллергена.

Как используют в настоящем описании, термин "иммунный ответ" включает опосредованные Т-клетками и/или опосредованные В-клетками иммунные ответы. Примеры иммунных ответов включают ответы Т-клеток, например, выработку цитокинов и клеточную цитотоксичность. В дополнение, термин иммунный ответ включает иммунные ответы, которые косвенно находятся под воздействием активации Т-клеток, например, выработка антител (гуморальные ответы) и активации цитокинчувствительных клеток, например, макрофагов. Иммунные клетки, вовлеченные в иммунный ответ, включают лимфоциты, такие как В-клетки и Т-клетки (клетки CD4+, CD8+, Th1 и Th2); антигенпредставляющие клетки (например, профессиональные антигенпредставляющие клетки, такие как дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты, клетки Лангерганса, и непрофессиональные антигенпредставляющие клетки, такие как кератиноциты, эндотелиальные клетки, астроциты, фибробласты, олигодендроциты); природные киллерные клетки; миелоидные клетки, такие как макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы и гранулоциты.

Термины "ингибиторы" или "антагонисты" растворимого фактора используют в настоящем описании для обозначения молекул средств, способных к ингибированию, инактивации или снижению уровня растворимого фактора. Ингибиторы представляют собой соединения, которые, например, связываются с растворимым фактором, частично или полностью блокируют активность, снижают, предотвращают, задерживают активацию, инактивируют, десенсибилизируют или регулируют с понижением активность или экспрессию растворимого фактора, например, антагонисты. Ингибиторы включают полипептидные ингибиторы, такие как антитела, растворимые рецепторы и т.п., а также ингибиторы нуклеиновых кислот, такие как миРНК или антисмысловые РНК, генетически модифицированные версии растворимого фактора, например, версии с измененной активностью, а также природные и синтетические антагонисты растворимых факторов, малые химические молекулы и т.п. Аналитические тесты для обнаружения ингибиторов включают, например, экспрессирование растворимого фактора *in vitro*, в клетках или клеточных мембранах, с применением предполагаемых антагонистических соединений, и затем определение функциональных эффектов на активность растворимого фактора, как описано где-либо еще в настоящем описании.

Как используют в настоящем описании, "обучающий материал" включает публикацию, регистрационную запись, диаграмму или любой другой носитель выражения, который можно использовать для сообщения о применимости композиций и способов изобретения. Обучающий материал набора изобретения может, например, быть прикреплен к контейнеру, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию изобретения или быть поставлен вместе с контейнером, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. Альтернативно, обучающий материал может быть поставлен отдельно от контейнера с предназначением, что этот обучающий материал и соединение должны применяться совместно реципиентом.

"Выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие у живущего животного не являются "выделенными", но такие же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от существующих совместно с ними веществ в их природном состоянии, являются "выделенными."

Выделенные нуклеиновая кислота или белок могут существовать в очищенной форме по существу, или могут существовать в ненативном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

"Лентивирус", как используют в настоящем описании, относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов, будучи способными инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, так, что они являются одним из наиболее эффективных методов вектора доставки гена. ВИЧ, SIV и FIV все являются примерами лентивирусов. Векторы, полученные из лентивирусов, предлагают средство для достижения значительных уровней переноса генов *in vivo*.

Фраза "уровень растворимого фактора" в биологическом образце, как используют в настоящем описании, обычно относится к количеству белка, белкового фрагмента или уровня пептида растворимого фактора, который присутствует в биологическом образце. "Уровень растворимого фактора" необязательно должен быть измерен количественно, но может просто обнаруживаться, например, субъективным,

визуальным обнаружением человеком, при сравнении или без сравнения с уровнем из контрольного образца или уровнем, ожидаемым для контрольного образца.

Под термином "модуляция", как его используют в настоящем описании, подразумевают опосредование обнаруживаемого увеличения или уменьшения уровня ответа у индивида по сравнению с уровнем ответа у индивида при отсутствии лечения или соединения, и/или в сравнении с уровнем ответа у иного идентичного, но не подвергнутого лечению индивида. Термин охватывает возмущение нативного сигнала или ответа и/или оказание воздействия на нативный сигнал или ответ, посредством этого опосредуя благоприятный терапевтический ответ у индивида, предпочтительно, человека.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (п.к.), внутривенную (в.в.), внутримышечную (в.м.) или интратермальную инъекцию или методы инфузии.

Термины "пациент", "индивид" и т.п. используются взаимозаменяемо в настоящем описании, и относятся к любому животному или его клеткам либо *in vitro* или *in situ*, подвергаемым действию способов, описанных в настоящем описании. В некоторых неограничивающих вариантах осуществления, пациент или индивид является человеком.

Термин "одновременное введение", как используют в настоящем описании, означает, что первую терапию и вторую терапию в комбинированной терапии вводят с разделением по времени, равным не более, чем приблизительно 15 мин, таким как не более, чем приблизительно любого интервала, равного 10, 5 или 1 мин. Когда первую и вторую терапии вводят одновременно, первая и вторая терапии могут содержаться в одной и той же композиции (например, композиции, содержащей как первую, так и вторую терапию) или в отдельных композициях (например, первая терапия в одной композиции, а вторая терапия содержится в еще одной другой композиции).

Термин "одновременное введение", как используют в настоящем описании, означает, что первую терапию и вторую терапию в комбинированной терапии вводят с разделением по времени, равным не более, чем приблизительно 15 мин, таким как не более, чем приблизительно любого интервала, равного 10, 5 или 1 мин. Когда первую и вторую терапии вводят одновременно, первая и вторая терапии могут содержаться в одной и той же композиции (например, композиции, содержащей как первую, так и вторую терапию) или в отдельных композициях (например, первая терапия в одной композиции, а вторая терапия содержится в еще одной другой композиции).

Под термином "специфически связывается", как используют в настоящем описании по отношению к антителу, подразумевают антитело, которое распознает специфический антиген, но не распознает по существу или не связывает другие молекулы в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном от одного вида, может также связываться с этим антигеном от одного или нескольких видов. Но такая межвидовая реактивность не изменяет сама по себе классификацию антитела, как специфического. В еще одном примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность не изменяет сама по себе классификацию антитела, как специфического. В некоторых случаях термины "специфическое связывание" или "специфически связываясь" могут применяться при ссылке на взаимодействие антитела, белка или пептида со вторым химическим видом, для обозначения того, что взаимодействие является зависимым от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на химическом виде; например, антитело распознает и связывается с конкретной белковой структурой в большей степени, чем с белками в целом. Если антитело является специфичным для эпитопа "А", присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободного, немеченого А), в реакции, содержащей меченый "А" и антитело, будет снижать количество меченого А, связанного с антителом.

Под термином "стимуляция" подразумевают первичный ответ, индуцированный посредством связывания стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с его когнатным лигандом, опосредуя посредством этого событие передачи сигнала, такое как, но им не ограниченное, передачу сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию некоторых молекул, такую как регуляцию с понижением TGF- β , и/или реорганизацию цитоскелетных структур и т.п.

"Стимулирующая молекула", в качестве термина используемая в настоящем описании, означает молекулу на Т-клетке, которая специфически связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпредставляющей клетке.

"Стимулирующий лиганд", как используют в настоящем описании, означает лиганд, который, когда присутствует на антигенпредставляющей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), может специфически связываться с партнером когнатного связывания (именуемым в настоящем описании как "стимулирующая молекула") на Т-клетке, посредством этого опосредуя первичный ответ Т-клеток, включающий, но не ограниченный ими, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды являются хорошо известными в данной области и охватывают, среди прочего, молекулу Класа I МНС, нагруженную пептидом, антитело против CD3, суперагонистическое антитело против CD28 и суперагонистическое антитело против CD2.

Термин "индивид" подразумевает включение живых организмов, в которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающих). Примеры индивидов включают людей, собак, кошек, мы-

шей, крыс и их трансгенные виды.

Как используют в настоящем описании, "очищенная по существу" клетка представляет собой клетку, которая по существу не содержит другие клеточные типы. Термин очищенная по существу клетка также относится к клетке, которая была отделена от других клеточных типов, с которыми она обычно связана в ее природном состоянии. В некоторых случаях, популяция очищенных по существу клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях, данный термин относится просто к клетке, которая была отделена от клеток, с которыми она была естественно связана в ее природном состоянии. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления, клетки не культивируют *in vitro*.

Термин "терапевтический", как используют в настоящем описании, означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект получают посредством подавления, ремиссии или устранения болезненного состояния.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству рассматриваемого соединения, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы, или индивида, которого пытаются добиться исследователь, ветеринар, медицинский доктор или другой клиницист. Термин "терапевтически эффективное количество" включает такое количество соединения, которое, при введении является достаточным для профилактики развития, или облегчения до некоторой степени, одного или нескольких из признаков или симптомов нарушения или заболевания, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д., индивида, подлежащего лечению.

"Трансплантат", как используют в настоящем описании, относится к клеткам, ткани или органу, которые вводят в индивидуум. Источником трансплантированного материала могут быть культивируемые клетки, клетки от еще одного индивидуума, или клетки от того же самого индивидуума (например, после культивирования клеток *in vitro*). Примеры органных трансплантатов представляют собой почку, печень, сердце, легкое и поджелудочную железу.

Как используется в настоящем описании термин "лечить" заболевание означает снизить частоту проявления или тяжесть по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или расстройства, переносимого индивидуом.

Термин "трансфицированный" или "трансформированный" или "трансдуцированный," как используют в настоящем описании, относится к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная" или "трансформированная" или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована с использованием экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает первичную субъектную клетку и ее потомство.

Интервалы: по всему тексту описания, различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате интервала. Следует понимать, что описание в формате интервала приводится просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, описание интервала следует рассматривать, как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также индивидуальные числовые значения в пределах этого интервала. Например, описание интервала, такое как от 1 до 6 следует рассматривать, как конкретно раскрывающее поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также индивидуальные числа в пределах данного интервала, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Данный подход применяется вне зависимости от ширины интервала.

Описание

Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественных новообразований у пациента. В одном из вариантов осуществления способ лечения включает первую линию терапии, включающую введение CAR по изобретению пациенту для индуцирования противоопухолевого иммунного ответа, и контроль уровней растворимых факторов у пациента после инфузии Т-клеток, чтобы определить тип второй линии терапии, подходящей для лечения пациента в результате первой линии терапии.

В одном из вариантов осуществления терапия второй линии включает оценку профиля растворимых факторов у пациента после получения инфузии соответствующих Т-клеток с CAR (упоминается где-либо еще в настоящем описании как "после инфузии Т-клеток"), где, когда профиль растворимого фактора указывает на возрастание конкретного растворимого фактора после инфузии Т-клеток в сравнении с состоянием перед инфузией Т-клеток, квалифицированный специалист в данной области может провести выбор, чтобы ввести нуждающемуся пациенту эффективное количество соединения, ингибирующего растворимый фактор, чтобы контролировать повышенные уровни растворимого фактора после инфузии Т-клеток. Соответственно терапия второй линии в одном из вариантов осуществления включает введение типа ингибирующей терапии растворимого фактора, чтобы контролировать повышенные уровни некоторых растворимых факторов, являющихся результатом терапии первой линии с использованием CAR-Т-клеток.

В еще одном варианте осуществления терапия второй линии, относящаяся к введению пациенту со-

единения, ингибирующего растворимый фактор, может комбинироваться с другими общепринятыми терапиями, применяемыми для лечения, профилактики или контроля заболеваний или расстройств, связанных с или характеризующихся нежелательным ангиогенезом. Примеры таких общепринятых терапий включают, но ими не ограничены, хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию, биологическую терапию и иммунотерапию.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению может быть сконструирован, чтобы содержать внеклеточный домен, имеющий антигенсвязывающий домен, который нацелен на опухолевый антиген, слитый с доменом внутриклеточной передачи сигнала дзета цепи комплекса антигенного рецептора Т-клеток (например, CD3 дзета). Примером опухолевого антигена антигена В-клеток является CD19, поскольку данный антиген экспрессируется на злокачественных В-клетках. Однако изобретение не ограничено нацеливанием на CD19. Скорее изобретение включает любой фрагмент, связывающий опухолевый антиген. Антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно сливают с внутриклеточным доменом из одной или нескольких из костимулирующей молекулы и дзета-цепи. Предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент сливают с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит сигнальный домен CD137 (4-1BB). Причина этого состоит в том, что настоящее изобретение частично основано на открытии того, что CAR-опосредованные Т-клеточные ответы могут быть дополнительно усилены при добавлении костимулирующих доменов. Например, включение сигнального домена CD137 (4-1BB) значительно увеличивало CAR-опосредованную активность и жизнестойкость *in vivo* CAR-Т-клеток по сравнению с идентичными CAR-Т-клетками, не сконструированными для экспрессии CD137 (4-1BB). Однако, изобретение не ограничено конкретным CAR. Скорее, любой CAR, который нацелен на опухолевый антиген может применяться в настоящем изобретении. Композиции и способы получения и применения CAR описаны в PCT/US 11/64191, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Способы

Схема лечения по изобретению приводит в результате к измеряемому снижению размера опухоли или подтверждению заболевания или прогрессирования заболевания, полной ремиссии, частичной ремиссии, стабилизации заболевания, увеличению или продлению выживаемости без прогрессирования заболевания, увеличению или продлению общей выживаемости, или снижению токсичности.

В качестве части полной схемы лечения изобретение охватывает терапию первой линии и второй линии, где терапия первой линии включает введение CAR-Т-клеток изобретения пациенту. Схема лечения изобретения обеспечивает контроль злокачественного новообразования и его лечение посредством оценки профиля растворимого фактора у пациентов после инфузии Т-клеток. Соответствующая терапия второй линии включает введение пациенту подходящего ингибитора растворимого фактора, чтобы снизить повышенные уровни растворимого фактора, являющиеся результатом терапии первой линии. В некоторых случаях соответствующая терапия второй линии включает введение пациенту соответствующего активатора растворимого фактора, чтобы увеличить подавленные уровни растворимого фактора, являющиеся результатом терапии первой линии.

В одном из вариантов осуществления соответствующая терапия второй линии включает введение пациенту подходящего ингибитора цитокина, чтобы снизить повышенные уровни цитокина, являющиеся результатом терапии первой линии. В некоторых случаях соответствующая терапия второй линии включает введение пациенту подходящего активатора цитокина, чтобы повысить подавленные уровни цитокина, являющиеся результатом терапии первой линии.

В одном из вариантов осуществления дифференциальные уровни находятся выше экспрессии (высокая экспрессия) или ниже экспрессии (низкая экспрессия) при сравнении с уровнем экспрессии нормальной или контрольной клетки, данной популяции пациентов или с внутренним контролем. В некоторых вариантах осуществления сравнение уровней проводят между пациентом и индивидуумом с нормой, между пациентом после инфузии Т-клеток и до инфузии Т-клеток или между пациентом после инфузии Т-клеток при первой отметке времени и второй отметке времени.

В одном из вариантов осуществления изобретение включает оценку дифференциальных уровней одного или нескольких цитокинов для получения профиля цитокинов у пациента после инфузии Т-клеток для определения типа цитокиновой терапии для применения у пациента с целью регуляции уровня цитокина в обратную сторону до нормальных уровней. Изобретение, следовательно, может применяться, чтобы идентифицировать уровни цитокина, повышенные в результате присутствия CAR Т-клеток изобретения у пациента, что делает возможным специализированное лечение пациента с использованием ингибиторов цитокинов, чтобы понизить повышенные уровни цитокина. В еще одном варианте осуществления изобретение может применяться, чтобы идентифицировать уровни цитокина, сниженные в результате присутствия CAR-Т-клеток изобретения у пациента, что позволяет проводить специализированное лечение пациента с использованием активаторов цитокинов, чтобы повысить сниженные уровни цитокина.

В одном из вариантов осуществления уровни цитокинов, которые повышаются в результате полу-

чения инфузии CAR T-клеток, включают, но ими не ограничиваются, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, факторы CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXIN, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ферритин и т.п. Однако изобретение не должно ограничиваться этими перечисленными цитокинами. Скорее изобретение включает любой цитокин, идентифицируемый как повышенный у пациента в результате получения инфузии CAR T-клеток.

В одном из вариантов осуществления уровни цитокинов, которые снижаются в результате получения инфузии CAR-T-клеток, включают, но ими не ограничиваются, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-2R, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, TNF α , GM-CSF, G-CSF, CXCL9, CXCL10, факторы CXCR, VEGF, RANTES, EOTAXIN, EGF, HGF, FGF- β , CD40, CD40L, ферритин и т.п. Однако изобретение не должно ограничиваться этими перечисленными цитокинами. Скорее, изобретение включает любой цитокин, идентифицируемый как пониженный у пациента в результате получения инфузии CAR-T-клеток.

Обнаружение цитокина и его лечение

Несмотря на то, что данный раздел описывает обнаружение цитокина и его лечение как часть терапии второй линии, изобретение охватывает обнаружение любого растворимого фактора и его лечение как часть терапии второй линии. Следовательно, описание в контексте "цитокин" может в равной степени применяться к "растворимому фактору".

В одном из вариантов осуществления как часть терапии второй линии изобретение включает способы обнаружения уровней цитокина у пациента, который получил инфузию CAR-T-клеток изобретения. В некоторых вариантах осуществления присутствие или уровень цитокина могут применяться для выбора кандидатного лечения. В некоторых других вариантах осуществления, присутствие или уровни цитокина могут использоваться для определения успеха во время проведения курса или после лечения первой линии, второй линии или обеих первой и второй линии терапии.

Биологические образцы, в которых цитокин может обнаруживаться, включают, например, сыворотку. В некоторых вариантах осуществления, биологические образцы включают биопсию ткани, которая может иметь или не иметь жидкий компонент.

Иммунологические анализы могут применяться, чтобы качественно или количественно анализировать уровни цитокина в биологическом образце. Общий обзор применяемой технологии можно найти в ряде легкодоступных руководств, например Harlow & Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Using Antibodies: A Laboratory Manual (1999).

В дополнение к использованию иммунологических анализов для обнаружения уровней цитокинов в биологическом образце пациента оценка экспрессии и уровней цитокина могут быть проведены на основании уровня гена экспрессии конкретных цитокинов. Технологии гибридизации РНК для определения присутствия и/или уровня экспрессии мРНК являются хорошо известными квалифицированным специалистам в данной области и могут применяться для оценки присутствия или уровня экспрессии гена цитокина, представляющего интерес.

В некоторых вариантах осуществления, в способах настоящего изобретения используют партнеры селективного связывания цитокина, чтобы идентифицировать присутствие или определить уровни цитокина в биологическом образце. Партнер селективного связывания для применения вместе со способами и наборами настоящего изобретения может представлять собой, например, антитело. В некоторых аспектах, могут применяться моноклональные антитела к конкретному цитокину. В некоторых других аспектах, поликлональные антитела к конкретному цитокину могут использоваться для практической реализации способов и в наборах по настоящему изобретению.

Промышленно получаемые антитела против цитокинов являются доступными и могут использоваться вместе со способами и наборами по настоящему изобретению. Специалистам в данной области хорошо известно, что тип, источник и другие аспекты антитела для применения следует рассматривать с учетом аналитического теста, в котором используют антитело. В некоторых случаях антитела, которые будут распознавать их антиген-мишень на Вестерн-блоттинге, могут быть неприменимыми в аналитическом тесте ELISA или ELISpot (методе иммуноферментных пятен) и наоборот.

В некоторых вариантах осуществления антитела для применения в аналитических тестах настоящего изобретения могут быть получены с использованием способов получения моноклональных или поликлональных антител, которые являются хорошо известными в данной области (см., например, Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, supra; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986); и Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975)). Такие методы включают получение антител посредством выбора антител из библиотек рекомбинантных антител в фаге или аналогичных векторах, а также получение поликлональных и моноклональных антител посредством иммунизации кроликов или мышей (см., например, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)). Такие антитела могут применяться в терапевтических и диагностических областях применения, например, при лечении и/или обнаружении любого из специфичных цитокинсвязанных заболеваний или состояний, описанных в настоящем описании.

Методы обнаружения с использованием иммунологических анализов являются особенно подходящими для практического использования в месте для наблюдения за пациентами. Такие методы позволяют проводить немедленную диагностику и/или прогностическую оценку пациента. Диагностические системы места для наблюдения за пациентами описаны, например, в патенте США № 6267722, который включен в настоящее описание посредством ссылки. Другие форматы иммунологических анализов также являются доступными, так что оценку биологического образца можно проводить без необходимости посылать образец в лабораторию для оценки. Обычно эти аналитические тесты форматируют в виде твердофазных анализов, где реагент, например, антитело применяют для обнаружения цитокина. Примеры устройств для тестирования, подходящие для применения вместе с иммунологическими анализами, такими как аналитические тесты настоящего изобретения, описаны, например, в патентах США №№ 7189522; 6818455 и 6656745.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предоставляет способы обнаружения полинуклеотидных последовательностей, которые кодируют цитокин в биологическом образце. Как отмечено выше, "биологический образец" относится к клетке или популяции клеток или количеству ткани или жидкости пациента. Наиболее часто образец удален из пациента, но термин "биологический образец" может также относиться к клеткам или ткани, анализируемым *in vivo*, т.е., без удаления из пациента. Обычно "биологический образец" будет содержать клетки пациента, но данный термин может также относиться к неклеточному биологическому материалу.

В одном из вариантов осуществления используют аналитические тесты на основе амплификации, чтобы измерить уровень желательного цитокина. При таком анализе последовательности нуклеиновой кислоты желательного цитокина действуют в качестве матрицы в реакции амплификации (например, Полимеразной Цепной Реакции или ПЦР). При количественной амплификации количество продукта амплификации будет пропорциональным количеству матрицы в исходном образце. Сравнение с соответствующими контролями предоставляет меру измерения числа копий цитокинсвязанного гена. Методы количественной амплификации являются хорошо известными квалифицированным специалистам в данной области. Подробные протоколы для количественной ПЦР предоставлены, например, в Innis et al. (1990) *PCR Protocols, Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.). Методы ОТ-ПЦР являются хорошо известными специалистам (см., например, Ausubel et al., *supra*). В некоторых вариантах осуществления применяют количественную ОТ-ПЦР, например аналитический тест TaqMan™, обеспечивая таким образом сравнение уровня мРНК в образце с контрольным образцом или значением. Известные последовательности нуклеиновых кислот для желательного цитокина являются достаточными, чтобы дать возможность специалисту рутинным образом выбрать праймеры для амплификации любой части гена. Подходящие праймеры для амплификации конкретных последовательностей могут быть сконструированы с использованием принципов, хорошо известных в данной области (см., например, Dieffenbach & Dveksler, *PCR Primer: Laboratory Manual* (1995)).

В некоторых вариантах осуществления могут использоваться аналитические тесты, основанные на гибридизации, чтобы обнаружить количество желательного цитокина в клетках биологического образца. Такие аналитические тесты включают дот-блот-анализ РНК, а также другие анализы, например флуоресцентная гибридизация *in situ*, которую проводят на образцах, которые содержат клетки. Другие аналитические тесты с гибридизацией являются легко доступными в данной области.

В многочисленных вариантах осуществления настоящего изобретения уровень и/или присутствие цитокинового полинуклеотида или полипептида будет обнаружен в биологическом образце, таким образом, позволяя обнаружить дифференциальную экспрессию цитокина для получения профиля цитокинов из биологического образца, полученного от пациента, получившего инфузию CAR-T-клеток по изобретению, в сравнении с контрольным биологическим образцом.

Количество цитокинового полинуклеотида или полипептида, обнаруженное в биологическом образце, указывает на присутствие цитокина для получения профиля цитокинов с целью классификации пациента для подходящего лечения цитокинами. Например, когда профиль цитокинов указывает на возрастание конкретного цитокина после инфузии Т-клеток в сравнении с контролем (например, до инфузии Т-клеток), квалифицированный специалист в данной области может произвести выбор, чтобы ввести пациенту, нуждающемуся в таком контроле, эффективного количества цитокин-ингибирующего соединения. Альтернативно, когда профиль цитокинов указывает на снижение конкретного цитокина после инфузии Т-клеток в сравнении с контролем (например, до инфузии Т-клеток), квалифицированный специалист в данной области может произвести выбор, чтобы ввести пациенту, нуждающемуся в таком контроле, эффективного количества цитокинактивирующего соединения.

В некоторых вариантах осуществления различие в уровнях цитокина между образцом после инфузии Т-клеток и контрольным образцом составляет по меньшей мере приблизительно 0,5, 1,0, 1,5, 2,5, 10, 100, 200, 500, 1000 раз.

Способы по настоящему изобретению могут также применяться, чтобы оценить эффективность действия курса лечения. Например, у пациента после инфузии Т-клеток, содержащего повышенное количество цитокина IL-6, эффективность действия лечения против IL-6 может оцениваться посредством контроля IL-6 с течением времени. Например, снижение уровней полинуклеотида или полипептида для

IL-6 в биологическом образце, взятом у пациента, после лечения, в сравнении с уровнем в образце, взятом от млекопитающего перед, или на ранних этапах лечения указывает на эффективное лечение.

В одном из вариантов осуществления схема лечения может быть основана на нейтрализации повышенного цитокина. Например, для лечения могут быть выбраны антагонисты цитокина. Антитела являются примером подходящего антагониста и включают антитела мыши, химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела человека или их фрагменты. Химерные антитела представляют собой антитела, чьи гены легкой и тяжелой цепи были сконструированы обычно посредством генетической инженерии, из сегментов генов иммуноглобулина, принадлежащих различным видам (см., например, Boyse et al., *Annals of Oncology* 14:520-535 (2003)). Например, переменные (V) сегменты генов из моноклональных антител мыши могут быть объединены с константными (C) сегментами человека. Типичное химерное антитело представляет, таким образом, гибридный белок, состоящий из V или антигенсвязывающего домена из антитела мыши, и C или эффекторных областей из антитела человека.

Гуманизированные антитела имеют остатки каркаса переменной области в значительной степени из антитела человека (именуемого акцепторным антителом) и областей, определяющих комплементарность, в значительной степени из мышиного антитела (именуемого донорным иммуноглобулином). См. Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033 (1989) и WO 90/07861, патент США № 5693762, патент США № 5693761, патент США № 5585089, патент США № 5530101 и Winter, патент США № 5225539. Константные область(области), если присутствуют, также являются в значительной степени или полностью производными от человеческого иммуноглобулина. Антитела могут быть получены посредством общепринятых гибридных подходов, фагового дисплея (см., например, Dower et al., WO 91/17271 и McCafferty et al., WO 92/01047), применения трансгенных мышей с человеческими иммунными системами (Lonberg et al., WO93/12227 (1993)), среди других источников. Нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи иммуноглобулинов, могут быть получены из гибридом или клеточных линий, продуцирующих антитела, или основаны на последовательностях нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностях иммуноглобулинов в опубликованной литературе.

Другие антагонисты желательного цитокина могут также применяться в целях лечения. Например, класс антагонистов, которые могут применяться для целей настоящего изобретения, представляет собой растворимые формы рецепторов для цитокина. Посредством просто иллюстративных целей антагонист IL-6 представляет собой антитело против IL-6, которое специфически связывается с IL-6. Специфичное антитело обладает способностью ингибировать или антагонизировать действие IL-6 системным образом. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает IL-6 и предотвращает от взаимодействия с его рецепторами или их активации (например, IL-6R α или IL-6R β). В некоторых вариантах осуществления активность IL-6 может быть антагонизирована посредством использования антагониста рецепторов интерлейкина-6 (IL-6R). Патентная заявка США № 2006251653 описывает способы лечения заболевания, относящегося к интерлейкину-6, и раскрывает ряд антагонистов интерлейкина-6, включающих, например, гуманизированные антитела анти-IL-6R и химерные антитела анти-IL-6R. В некоторых вариантах осуществления производное IL-6 или IL-6R может применяться, чтобы блокировать и антагонизировать взаимодействие между IL-6/IL-6R.

Настоящее изобретение не ограничено цитокинами и их соответствующими активаторами и ингибиторами, описанными в настоящем описании. Скорее изобретение включает применение любого активатора и/или ингибитора цитокинов, который применяется в данной области для модуляции цитокинов. Причиной этого является то, что изобретение основано на контроле лечения злокачественного новообразования у пациента, получающего инфузию CAR-T-клеток изобретения, где вводимые посредством инфузии CAR-T-клетки приводят к возрастанию и снижению уровней различных цитокинов. Квалифицированный специалист в данной области на основании раскрытия, представленного в настоящем описании, сможет оценить, что дифференциальные уровни экспрессии цитокина в образце после инфузии Т-клеток в сравнении с контрольным образцом могут быть направлены на лечение, чтобы иметь уровень цитокина, повышенный или сниженный до нормальных уровней.

Терапевтическое применение

Настоящее изобретение охватывает клетку (например, Т-клетку), трансдуцированную с использованием лентивирусного вектора (LV). Например, LV кодирует CAR, который сочетает антигенраспознающий домен специфичного антитела с внутриклеточным доменом CD3-дзета, CD28, 4-1BB, или любых их комбинаций. Следовательно, в некоторых случаях трансдуцированная Т-клетка может вызывать CAR-опосредованный ответ Т-клетки.

Изобретение предоставляет применение CAR, чтобы перенаправить специфичность первичной Т-клетки на опухолевый антиген. Таким образом, настоящее изобретение также предоставляет способ для стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на целевую популяцию Т-клеток или ткань у млекопитающего, включающий стадию введения млекопитающему Т-клеток, которые экспрессируют CAR, где CAR содержит связывающий фрагмент, который специфически взаимодействует с предварительно заданной мишенью, часть дзета-цепи, содержащую, например, внутриклеточный домен CD3-дзета человека, и костимулирующую сигнальную область.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает тип клеточной терапии, где

Т-клетки генетически модифицируют, чтобы экспрессировать CAR, и CAR-Т-клетки вводят посредством инфузии реципиенту. Инфузированные клетки способны уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапий антителами CAR-Т-клетки способны реплицироваться *in vivo*, что приводит в результате к долговременной жизнестойкости, которая может приводить к пролонгированному контролю опухоли.

В одном из вариантов осуществления CAR-Т-клетки по изобретению могут претерпевать устойчивую экспансию Т-клеток *in vivo* и могут выживать в течение продолжительного количества времени. В еще одном варианте осуществления CAR-Т-клетки изобретения превращаются в Т-клетки со специфичной памятью, которые могут быть реактивированы, чтобы ингибировать любые дополнительные образования опухоли или рост. Например, оказалось неожиданным, что клетки CART19 изобретения могут претерпевать устойчивую экспансию Т-клеток *in vivo* и выживать при высоких уровнях в течение продолжительного количества времени в крови и костном мозге и образовывать Т-клетки со специфичной памятью. Не желая быть связанными конкретной теорией, авторы полагают, что CAR-Т-клетки могут дифференцироваться *in vivo* в состояние, подобное центральной памяти, при контакте с последующей элиминацией клеток-мишеней, экспрессирующих суррогатный антиген.

Не желая быть связанными конкретной теорией, авторы полагают, что противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый CAR-модифицированными Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ. В дополнение, CAR-опосредованный иммунный ответ может быть частью подхода адаптивной иммунотерапии, при котором CAR-модифицированные Т-клетки индуцируют иммунный ответ, специфичный к антигенсвязывающему фрагменту в CAR. Например, CART19 клетки вызывают иммунный ответ, специфичный против клеток, экспрессирующих CD19.

В то время как данные, раскрытые в настоящем описании, конкретно раскрывают лентивирусный вектор, содержащий анти-CD19 scFv, полученный из моноклонального антитела FMC63 мыши, шарнир CD8a человека и трансмембранный домен, и человеческие сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета, изобретение следует рассматривать, как включающее любое число вариаций для каждого из компонентов конструкции, как описано где-либо еще в настоящем описании. Другими словами, изобретение включает применение любого антигенсвязывающего фрагмента в CAR, чтобы генерировать CAR-опосредованный Т-клеточный ответ, специфичный к антигенсвязывающему фрагменту. Например, антигенсвязывающий фрагмент в CAR изобретения может быть нацелен на опухолевый антиген с целью лечения злокачественного новообразования.

Злокачественные новообразования, которые могут подвергаться лечению, включают опухоли, которые не являются васкуляризированными, или еще незначительно васкуляризированными, а также васкуляризированные опухоли. Злокачественные новообразования могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкомии и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Типы злокачественных новообразований, для лечения с использованием CAR по изобретению включают, но ими не ограничиваются, карциному, бластоми и саркому, и некоторые лейкомии или лимфоидные злокачественные опухоли, доброкачественные и злокачественные опухоли, и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Взрослые опухоли/злокачественные новообразования и детские опухоли/злокачественные новообразования также являются включенными.

Гематологические злокачественные новообразования представляют собой злокачественные новообразования крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных новообразований включают лейкомии, включающие острые лейкомии (такие как острая лимфоцитарная лейкомия, острая миелоцитарная лейкомия, острая миелогенная лейкомия и миелобластная, промиелоцитарная, миеломоноцитарная, моноцитарная и эритролейкемия), хронические лейкомии (такие как хроническая миелоцитарная (гранулоцитарная) лейкомия, хроническая миелогенная лейкомия и хроническая лимфоцитарная лейкомия), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (вялотекущую и высокозлокачественную формы), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточную лейкомию и миелодисплазию.

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат кист или жидких областей. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей именуют по типу клеток, которые их образуют (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфо-неоплазию, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак простаты, гепатоклеточную карциному, карциному сквамозных клеток, карциному базальных клеток, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомную карциному сальной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая

как глиома мозгового ствола и смешанные глиомы), глиобластома (также известную как мультиформная глиобластома), астроцитому, лимфому ЦНС, герминому, медуллобластома, Шванному, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластома, акустическую невриному, олигодендроглиому, менингиому, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR по изобретению конструируют для лечения конкретного злокачественного новообразования. Например, CAR, сконструированный для нацеливания CD19, может применяться для лечения злокачественных новообразований и нарушений, включающих но ими не ограниченных, пре-B ALL (назначение для детей), ALL взрослых людей, мантийноклеточной лимфомы, диффузную В-крупноклеточную лимфому, резервное лечение после аллогенной пересадки костного мозга, и т.п.

В еще одном варианте осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания CD22 для лечения диффузной В-крупноклеточной лимфомы.

В одном из вариантов осуществления злокачественные новообразования и нарушения включают, но ими не ограничены, пре-B ALL (назначение для детей), ALL взрослых людей, мантийноклеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, резервное лечение после аллогенной пересадки костного мозга, и т.п., которые могут подвергаться лечению с использованием комбинации CAR, которые нацеливают CD19, CD20, CD22 и ROR1.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на мезотелин для лечения мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака яичника и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на CD33/IL3Ra для лечения острой миелогенной лейкемии и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на с-Met для лечения рака молочной железы с тройным негативным фенотипом, немелкоклеточного рака легких и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на PSMA для лечения рака простаты и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на гликолипид F77 для лечения рака простаты и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на EGFRvIII для лечения глиобластомы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на GD-2 для лечения нейробластомы, меланомы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на NY-ESO-1 TCR для лечения миеломы, саркомы, меланомы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR может быть сконструирован для нацеливания на MAGE A3 TCR для лечения миеломы, саркомы, меланомы и т.п.

Однако изобретение не должно рассматриваться как ограниченное исключительно антигенными мишенями и заболеваниями, раскрытыми в настоящем описании. Скорее изобретение должно рассматриваться, как включающее любую антигенную мишень, которая является связанной с заболеванием, где CAR могут применяться для лечения заболевания.

CAR-модифицированные Т-клетки по изобретению могут также служить в качестве вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. Предпочтительно млекопитающее является человеком.

По отношению к иммунизации *ex vivo* по меньшей мере одно из следующих событий происходит *in vitro* перед введением клеток в млекопитающее: i) размножение клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки, и/или iii) криоконсервация клеток.

Способы *ex vivo* являются хорошо известными в данной области и более полно обсуждаются ниже. Вкратце, клетки выделяют из млекопитающего (предпочтительно, человека) и генетически модифицируют (т.е., трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) с использованием вектора, экспрессирующего CAR, раскрытого в настоящем описании. CAR-модифицированные клетки могут вводиться реципиенту-млекопитающему для обеспечения терапевтического благоприятного воздействия. Реципиент-млекопитающее может быть человеком, и CAR-модифицированные клетки могут быть аутологичными по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

Методика размножения *ex vivo* гематопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников, описанная в патенте США № 5199942, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, может применяться к клеткам настоящего изобретения. Другие подходящие способы являются известными в данной области, следовательно, настоящее изобретение, не ограничено каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. Вкратце, *ex vivo* культивирование и размножение Т-клеток включает: (1) сбор CD34+ гематопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников от млекопитающего из сбора периферической крови или эксплантатов костного мозга и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. В дополнение к факторам клеточного роста, описанным в патенте США № 5199942, другие факторы, такие

как flt3-L, IL-1, IL-3 и c-kit лиганд, могут применяться для культивирования и размножения клеток.

В дополнение к использованию вакцины на основе клеток с позиций иммунизации *ex vivo* настоящее изобретение также предоставляет композиции и способы для иммунизации *in vivo*, чтобы вызвать иммунный ответ, направленный против антигена у пациента.

В общем случае, клетки, активированные и размноженные, как описано в настоящем описании, могут использоваться при лечении и профилактики заболеваний, которые возникают у индивидуумов, которые являются иммунокомпрометированными (пациентов с ослабленным иммунитетом). В частности, CAR-модифицированные Т-клетки по изобретению применяют при лечении CCL. В некоторых вариантах осуществления клетки изобретения применяют при лечении пациентов, имеющих риск развития CCL. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики CCL, включающим введение индивиду, нуждающемуся в таком воздействии, терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных Т-клеток по изобретению.

CAR-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению могут вводиться либо по отдельности или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. Вкратце, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать целевую популяцию клеток, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физраствор, забуференный фосфатом физраствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться путем, соответствующим заболеванию, подлежащему лечению (или профилактике). Количество и частота введения будут определяться таким факторами, как состояние пациента, и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозировки могут быть определены посредством клинических испытаний.

Когда назначают "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", точное количество композиций по настоящему изобретению для введения может определяться терапевтом с учетом индивидуальных различий по возрасту, массе, размеру опухоли, степени инфицирования или метастазов и состояния пациента (индивида). В общем случае может быть установлено, что фармацевтические композиции, содержащие Т-клетки, описанные в настоящем описании, могут вводиться при дозировке, равной 10^4 - 10^9 клеток/кг массы тела, предпочтительно 10^5 - 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в пределах этих интервалов. Композиции Т-клеток могут также вводиться множество раз при этих дозировках. Клетки могут вводиться посредством использования инфузионных методов, которые являются общеизвестными при иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). Оптимальные дозировка и схема лечения для конкретного пациента могут быть легко определены квалифицированным специалистом в области медицины посредством контроля пациента по признакам заболевания и соответственной подборке лечения.

В некоторых вариантах осуществления может быть желательным вводить активированные Т-клетки индивиду и затем впоследствии проводить повторный забор крови (или осуществлять аферез), активировать взятые оттуда Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением и проводить реинфузию пациенту этих активированных и размноженных Т-клеток. Данный процесс может осуществляться множество раз каждые несколько недель. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы из взятых образцов крови, равных от 10 до 400 см³. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки активируют из взятых образцов крови, равных 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 см³. Не будучи связанными соответствием конкретной теории, авторы полагают, что использование данного протокола множественного забора крови/множественной реинфузии может служить для отбора некоторых популяций Т-клеток.

Введение субъектных композиций может проводиться любым общепринятым образом, включая ингаляцию аэрозоля, инъекцию, прием внутрь, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в настоящем описании, могут вводиться пациенту подкожно, внутривенно, внутритуморально, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (в.в.) инъекции или внутрибрюшинно. В одном из вариантов осуществления композиции Т-клеток настоящего изобретения вводят пациенту посредством внутривенной или подкожной инъекции. В еще одном варианте осуществления композиции Т-клеток по настоящему изобретению предпочтительно вводят посредством в.в. инъекции. Композиции Т-клеток могут инъекционно вводиться непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, активированные и размноженные с использованием способов, описанных в настоящем описании, или других способов, известных в данной области, где Т-клетки размножают до терапевтических уровней, вводят пациенту в совокупно-

сти с (например, до, одновременно или после) любым количеством значимых способов лечения, включающих, но не ограниченных ими, лечение с использованием средств, таких как антивирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином-2, Цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом для MS-пациентов или лечение эфализумабом для пациентов с псориазом или другие виды лечения для пациентов с PML. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по изобретению могут применяться в комбинации с химиотерапией, облучением, иммуносупрессорными средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодепрессивными средствами, такими как CAM PATH, антитела против CD3 или другие терапии антителами, цитоксин, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины и облучение. Эти лекарственные средства ингибируют либо кальцийзависимую фосфатазу кальцийневрина (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая является важной для индуцированной фактором роста передачи сигнала (рапамицин) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curg. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят пациенту в совокупности с (например, до, одновременно с или после) пересадкой костного мозга, аблативной терапией Т-клеток с использованием либо химиотерапевтических средств, таких как флударабин, дистанционной лучевой терапии (XRT), циклофосфида или антител, таких как ОКТ3 или CAMPATH. В еще одном варианте осуществления композиции клеток настоящего изобретения вводят после аблативной терапии В-клеток, такой как средствами, которые реагируют с CD20, например Ритуксаном. Например, в одном из вариантов осуществления индивиды могут проходить стандартное лечение с высокодозовой химиотерапией с последующей пересадкой стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления после трансплантата индивиды получают инфузию размноженных иммунных клеток настоящего изобретения. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

Дозировка приведенных выше способов лечения для введения пациенту будет варьироваться в соответствии с уточнением природы состояния, подвергаемого лечению и реципиента лечения. Масштабирование дозировок для введения человеку может проводиться в соответствии с практическими подходами, принятыми в данной области. Доза для CAMPATH, например, будет, как правило, находиться в интервале от 1 до приблизительно 100 мг для взрослого пациента, обычно при введении ежедневно в течение периода между 1 и 30 днями. Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг в день, несмотря на то, что в некоторых случаях могут применяться более высокие дозы до 40 мг в день (описанных в патенте США № 6120766).

Лечение синдрома высвобождения цитокинов (CRS)

Настоящее изобретение основано частично на открытии, что пролиферация *in vivo* клеток CART19 и высокая связанная с ней противоопухолевая активность, также связана с CRS, приводящему к гемофагоцитарному лимфогистиоцитозу (HLH), также называемому синдромом активации макрофагов (MAS). Не желая быть связанными конкретной теорией, авторы полагают, что MAS/HLH представляет собой уникальный биомаркер, который связан с высокой противоопухолевой активностью CART19 и может требоваться для нее.

Соответственно изобретение предоставляет первую линию терапии, включающую введение CAR по изобретению пациенту и вторую линию терапии, включающую введение типа терапии для контроля повышенных уровней некоторых растворимых факторов, являющихся результатом первой линии терапии с использованием CAR-Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления вторая линия терапии включает композиции и способы лечения CRS. Симптомы CRS включают высокие температуры, тошноту, преходящую гипотензию, гипоксию и т.п. Настоящее изобретение основано на наблюдении, что клетки CART19 индуцировали повышенные уровни растворимых факторов у пациента, включающих, но не ограниченных ими, IFN- γ , TNF α , IL-2 и IL-6. Следовательно, вторая линия терапии включает соединения и способы для нейтрализации эффектов против повышенных цитокинов, являющихся результатом введения клеток CART19. В одном из вариантов осуществления нейтрализующие средства способны к противодействию нежелательному согласованному всплеску экспрессии/активности цитокинов и, таким образом, являются применимыми для профилактики, улучшению состояния при и лечения CRS, связанного с терапией CART19.

В одном из вариантов осуществления лечение CRS проводят приблизительно в 10-12 день после инфузии клеток CART19.

В одном из вариантов осуществления вторая линия терапии включает введение стероида пациенту. В еще одном варианте осуществления, вторая линия терапии включает введение одного или нескольких из стероида, ингибитора TNF α и ингибитора IL-6. Примером ингибитора TNF α является этанерцепт. Примером ингибитора IL-6 является тоцилизумаб (тоц).

Экспериментальные примеры

Настоящее изобретение дополнительно подробно описано посредством ссылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только с целью иллюстрации, и не подразуме-

ваются как ограничивающие, если не установлено иначе. Таким образом, изобретение никаким образом не должно рассматриваться как ограниченное следующими примерами, но скорее, должно рассматриваться как охватывающее какие-либо и все вариации, которые становятся очевидными в результате идей, предоставленных в настоящем описании.

Без дополнительного описания, авторы полагают, что рядовой специалист в данной области сможет, используя предшествующее описание и следующие иллюстративные примеры, создавать и использовать соединения настоящего изобретения и осуществлять на практике заявленные способы. Следующие рабочие примеры, следовательно, конкретно указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом, оставшуюся часть раскрытия.

Пример 1. Цитокиновая терапия в комбинации с инфузией Т-клеток с CAR

Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что пациенты после инфузии Т-клеток с CAR проявляют дифференциальные уровни экспрессии различных цитокинов. В некоторых случаях, повышенные уровни некоторых цитокинов являются результатом токсичности введенных посредством инфузии Т-клеток с CAR (фиг. 1). Наблюдали, что тоцилизумаб (анти-IL6) может уменьшать токсичность CAR и, по видимому, сохранять противоопухолевые эффекты у 2 из 2 пациентов (фиг. 2). Не желая быть связанными соответствием конкретной теории, авторы полагают, что анакинра и другие реагенты, которые блокируют IL-1, могут также быть применимыми в этом отношении. Данные, представленные в настоящем описании, также демонстрируют, что IL-1 повышается у пациентов, и это может приводить к более позднему возрастанию IL-6. Анакинра представляет собой рекомбинантный белок IL-1Ra, который связывается с рецепторами IL1 и блокирует передачу сигнала как от IL-1 альфа, так и бета. Анакинра имеет короткий период полужизни. Существует преимущество применять анакинра, чтобы начать лечение пациентов, поскольку оба IL-1 альфа и бета будут блокированы, и также смягчают цитокиновый выброс и удерживают противоопухолевый эффект.

Также наблюдали, что вмешательства антителами не оказывают воздействия на клеточную функциональность CART19, по данным измерений перфорина и IFN- γ (фиг. 3).

Пример 2. Т-клетки с CB19-перенаправленным рецептором химерного антигена (CART19) индуцируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) и индукцию поддающегося лечению синдрома активации макрофагов (MAS), которые можно контролировать посредством антагониста IL-6-Тоцилизумаба (тоц)

Инфузия клеток CART19 приводит в результате к 100-100000 $\times$ пролиферации *in vivo*, синдрому лизиса опухоли, сопровождаемого продолжительной противоопухолевой активностью и пролонгированной жизнестойкостью у пациентов с опухолями В-клеток. Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что пролиферация клеток CART19 *in vivo* и, как следствие, высокая противоопухолевая активность, связана с CRS, приводящим к гемофагоцитарному лимфогистиоцитозу (HLH), также именуемому MAS. Не желая быть связанными соответствием конкретной теории, авторы полагают, что, MAS/HLH представляет собой уникальный биомаркер, который связан с высокой противоопухолевой активностью и может требоваться для нее.

Аутологичным Т-клеткам трансдуцировали с помощью лентивируса CAR, составленный из анти-CD19 scFv/4-1BB/CD3-дзета, активировали/размножали *ex-vivo* с помощью анти-CD3/анти-CD28 шариков и затем вводили инфузионно пациентам с ALL или CLL с персистирующим заболеванием после 2-8 предшествующих курсов лечения. Активность CART19 против ALL также моделировали на модели мышиного ксенотрансплантата с высоким уровнем приживления трансплантата ALL человека/Т-клеток человека и одновременным обнаружением Т-клеток с CAR и ALL, с использованием 2-цветной биолуминесцентной визуализации.

Результаты, представленные в настоящем описании, предоставляют включающие последние данные результаты для 10 пациентов, которые получали клетки CART19, включая 9 пациентов с CLL и 1 пациента детского возраста с рецидивирующей рефрактерной ALL. 6/9 Оцениваемых пациентов показали полное выздоровление (CR) или частичное выздоровление (PR), включая 4 случая замедленного CR. В то время как не наблюдали острой инфузионной токсичности, у всех исследуемых пациентов также развивался CRS. У всех наблюдали высокие температуры, а также гипотензию/гипоксию степени 3 или 4. CRS предшествовала пиковая экспрессия клеток CART19 в крови, и затем она возрастала по интенсивности до пикового значения клеток CART19 (День 10-31 после инфузии). Пациент с ALL испытывал наиболее значительную токсичность, с гипотензией степени 4 и дыхательной недостаточностью. Стероидная терапия на День 6 не приводила к улучшению. На День 9, отмечая высокие уровни TNF α и IL-6 (пиковые увеличения выше исходного уровня: IFN γ при 6040 $\times$; IL-6 при 988 $\times$; IL-2R при 56 $\times$, IL-2 при 163 $\times$ и TNF α при 17 $\times$), вводили антагонисты TNF α и IL-6 (этанерцепт и тоц). Это приводило к нормализации температуры и гипотензии в пределах 12 ч и быстрому переходу от искусственной вентиляции к комнатному воздуху. Эти интервенции не имели явного воздействие на размножение или эффективность действия клеток CART19: пик Т-клеток с CAR (2539 CAR+ клетки/мкл; 77% клеток CD3 клетки по потоку) имел место на День 11, и на День 23 костный мозг показал CR с отрицательным минимальным оста-

точным заболеванием (MRD), по сравнению с первоначальным состоянием в период исследования в костном мозге, которое показало 65% бластных клеток. Несмотря на отсутствие истории ALL в ЦНС, спинномозговая жидкость показала обнаруживаемые клетки CART19 (21 лимф/мкл; 78% CAR+). Через 4 месяца после инфузии, этот пациент сохранял CR, с 17 клеток САКТ19/мкл в крови и 31% CAR+ CD3 клетки в костном мозге.

Клиническая оценка последующих исследуемых пациентов показывает, что все они имели подтверждение MAS/HLH, включающее резкие повышения ферритина и гистологическое проявление HLH. Пиковые уровни ферритина находились в интервале от 44000 до 605000, предшествуя и продолжаясь пиковой пролиферацией Т-клеток. Другие последовательные открытия включают быстрое наступление гепатоспленомегалии, не относящейся к заболеванию, и умеренной DIC.

В последующем 3 пациента с CLL также подвергались лечению с использованием тоц, также с немедленным и резким снижением высоких температур, гипотензии и гипоксии. Один пациент получал тоц на День 10 и достигал CR, сопровождаемого размножением CART19. Еще один пациент имел быстрое снижение CRS, на день 9 после введения тоц и последующее наблюдение на ответ было слишком коротким. Третий пациент с CLL получал тоц на День 3 по причине раннего повышения температуры и не имел пролиферации CART-19 и ответа.

Чтобы смоделировать временную картину цитокиновой блокады, ксенотрансплантаты, с использованием биолюминесцентной первичной ALL у детей были установлены и затем подвергались воздействию избыточных клеток клинического изготовления. Клетки CART19 пролиферировали и приводили к пролонгированному выживанию. Цитокиновая блокада перед инфузией Т-клеток с использованием тоц и/или этанерцепта отменяла контроль над заболеванием с меньшей пролиферацией *in vivo* инфузионно введенных клеток CART19, подтверждая результат, наблюдаемый у одного пациента, получавшего раннюю дозу тоц (День 3).

Т-клетки CART19 могут производить обширное размножение *in-vivo*, долговременную жизнестойкость и противоопухолевую эффективность действия, но могут также индуцировать значительный CRS с признаками, предполагающими MAS/HLH, который быстро реагирует на блокаду цитокинов. Создаваемая перед инициацией значительной пролиферации CART19, блокада TNF α и/или IL-6 может препятствовать пролиферации и эффекторной функции, но если она создается в то время, когда клеточная пролиферация находится в процессе изменений, тоц может снижать симптомы, которые наблюдались и которые коррелируют с устойчивыми клиническими ответами.

Пример 3. Ремиссия ALL под действием Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор

Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что CAR-Т-клетки имеют клиническую активность при острой лимфоцитарной лейкемии (ALL). Вкратце два пациента детского возраста с рецидивирующей рефрактерной пре-В-клеточной ALL подвергались лечению с использованием от 10^6 до 10^7 /кг Т-клеток, трансдуцированных анти-CD19 антителом и Т-клеточной сигнальной молекулой (CTL019 CAR-Т-клетки; также именуемые CART19). CTL019-Т-клетки размножались более, чем 1000-кратно у обоих пациентов и мигрировали в костный мозг. В дополнение, CAR-Т-клетки обладали способностью пересекать гематоэнцефалический барьер и сохранялись на высоких уровнях в течение по меньшей мере 6 месяцев, по данным измерений в спинномозговой жидкости. Было отмечено восемь тяжелых неблагоприятных событий. У обоих пациентов развивались синдром высвобождения цитокинов (CRS) и аплазия В-клеток. У одного ребенка CRS был тяжелым и блокада цитокинов этанерцептом и тоцилизумабом была эффективной при обращении синдрома, и все еще не предотвращала размножение CAR-Т-клеток и противолейкемическую эффективность действия. Полную ремиссию наблюдали у обоих пациентов, и она продолжалась у одного пациента через 9 месяцев после лечения. Другой пациент имел рецидив с бластными клетками, которые больше не экспрессировали CD19 приблизительно через 2 месяца после лечения.

Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что CAR-модифицированные Т-клетки обладают способностью к лизису *in vivo* даже агрессивных клеток при рефрактерной острой лейкемии. Возникновение опухолевых клеток, которые более не экспрессируют мишень, указывают на необходимость нацеливания других молекул в дополнение к CD19 у некоторых пациентов с ALL.

Сообщалось о размножении *in vivo* и устойчивых противолейкемических эффектах клеток CTL019 (CART19) у 3 пациентов с CLL (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). CTL019 представляет собой CAR, который включает сигнальный домен CD137 (4-1BB) и экспрессируется с использованием технологии лентивирусного вектора (Milone et al., 2009, Mol Ther 17: 1453-64). Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют применение CTL019 у 2 пациентов детского возраста с рефрактерной и рецидивирующей ALL. Оба пациента имели ремиссию лейкемии, сопровождаемую устойчивым размножением CTL019 *in vivo* с миграцией в костный мозг и ЦНС. Противолейкемические эффекты были высокими, так как один пациент имел рефрактерное заболевание после химиотерапии, препятствующее пересадке стволовых клеток от аллогенного донора, а другой пациент имел рецидив после пересадки аллогенной пуповинной крови и являлся резистентным к терапии блинатумомом (химерным биспецифическим анти-CD3 и анти-CD19 антите-

лом).

В следующем разделе описаны материалы и методы, используемые в этих экспериментах.

Материалы и методы

CART19

Ранее сообщалось о получении CTL019 (CART19) (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). CTL019 обнаруживали и количественно определяли в образцах пациентов, как сообщалось ранее (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73).

Забор и обработка образцов

Образцы (периферическая кровь, костный мозг) собирали в вакуумные пробирки с сиреневой крышкой (K2EDTA) или красной крышкой (без добавок) (Becton Dickinson). Пробирки с сиреневой крышкой доставляли в лабораторию в пределах 2 ч от забора или поставляли в течение ночи при комнатной температуре в изолированных контейнерах, по существу, как описано (Olson et al., 2011, J Transl Med 9:26) перед обработкой. Образцы обрабатывали в пределах 30 мин от получения в соответствии с установленной лабораторной стандартной операционной процедурой SOP. Мононуклеарные клетки периферической крови и костного мозга очищали, обрабатывали и сохраняли в жидком азоте, как описано (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Пробирки с красной крышкой обрабатывали в интервале 2 ч от забора, включая время коагуляции; сыворотку, выделенную посредством центрифугирования, отбирали аликвотами по 100 мкл для однократного применения и сохраняли при -80°C. СМЖ доставляли в лабораторию в интервале 30 мин от аспирации и клетки в СМЖ собирали посредством центрифугирования ликвора СМЖ и обрабатывали для выделения ДНК и анализа методом проточной цитометрии.

Анализ методом количественной ПЦР

Образцы цельной крови или костного мозга собирали в вакуумные пробирки BD с сиреневой крышкой (K2EDTA) (Becton Dickinson). Геномную ДНК выделяли непосредственно из цельной крови, и анализ методом количественной ПЦР на образцах геномной ДНК проводили в совокупности с использованием технологии ABI Taqman и утвержденного аналитического теста для обнаружения интегрированной в CD19 трансгенной последовательности CAR, как описано (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73), используя 200 нг геномной ДНК на временную точку для образцов периферической крови и костного мозга и 18-21,7 нг геномной ДНК на временную точку для образцов СМЖ (спинномозговой жидкости). Чтобы определить число копий на единицу ДНК, генерировали 8-точечную стандартную кривую, состоящую из 5×10^6 копий лентивирусной плазмиды CTL019, введенной в 100 нг не-трансдуцированной контрольной геномной ДНК. Каждую точку ввода данных (образец, стандартная кривая) оценивали в трех повторных опытах с положительным значением C_t в 3/3 повторях с % CV меньше чем 0,95% для всех измеримых количественно значений. Реакцию параллельной амплификации для контроля качества запрошенной ДНК проводили с использованием 20 нг вводимой геномной ДНК из периферической крови и костного мозга (2-4,3 нг для образцов СМЖ) и комбинации праймер/зонд, специфичной для нетранскрибируемой геномной последовательности по восходящей от гена CDKN1A, как описано (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Эти реакции амплификации позволяли генерировать коэффициент коррекции (КК) для поправки рассчитанного ввода ДНК по сравнению с действительным вводом ДНК. Копии трансгена на микрограмм ДНК рассчитывали в соответствии с формулой: копии, рассчитанные по стандартной кривой для CTL019 на введенную ДНК (нг) $\times$ КК $\times$ 1000 нг. Точность данного анализа определяли по способности количественно оценивать маркирование введенного инфузионно клеточного продукта посредством К-ПЦР. Эти слепые определения позволяли генерировать К-ПЦР и значения маркировки потока, равные 11,1 и 11,6% соответственно, для СНОР-100 и маркировки 20,0 и 14,4%, соответственно, для инфузионных продуктов СНОР-101.

Анализ растворимого фактора

Цельную кровь собирали в вакуумные пробирки BD с красной крышкой (без добавок) (Becton Dickinson), обрабатывали для получения сыворотки, используя установленную лабораторную СОП, аликвотировали для однократного применения и сохраняли при -80°C. Количественное определение растворимых цитокиновых факторов проводили, используя матричную технологию на шариках Luminex и наборы, поставляемые Life technologies (Invitrogen). Аналитические тесты проводили в соответствии с протоколом изготовителя с 9-точечной стандартной кривой, генерируемой с использованием серийных 3-кратных разведений. 2 точки внешнего стандарта оценивали в двух повторных опытах и 5 точек внутренних стандартов в одном опыте; все образцы оценивали в двух повторных опытах при разведении 1:2; рассчитанный % CV для двух повторных измерений были менее 15%. Данные получали на FlexMAP-3D в процентах и анализировали, используя программное обеспечение XPront 4.0 и 5-параметрический логистический регрессивный анализ. Интервалы количественных определений по стандартной кривой определяли по 80-120% интервалу (наблюдаемое/ожидаемое значение). Приведенные значения включали значения в пределах интервала стандартной кривой и значения, рассчитанные посредством логистического регрессивного анализа.

Реагенты антител

Для этих исследований применяли следующие антитела: MDA-CAR (Jena and Cooper, 2013, L. Анти-идиотипические антитела для CD19. PlosONE 2013; в печати), антитела мыши против CD19 CAR, конъюгированные с Alexa647. Антитела для мультипараметрического иммунофенотипирования: панели обнаружения Т-клеток: анти-CD3-FITC, анти-CD8-PE, анти-CD14-PE-Cy7, анти-CD16-PE-Cy7, анти-CD19-PE-Cy7, анти-CD16-PE-Cy7. Панели обнаружения В-клеток: анти-CD20-FITC, анти-CD45-PE, анти-CD45-APC, анти-CD19-PE-Cy7, анти-CD19-PE, анти-CD34-PCP-e710 и анти-CD34-APC приобретали от e-Biosciences.

Мультипараметрическая проточная цитометрия

Клетки оценивали посредством проточной цитометрии непосредственно после обработки Фиколл-Пак, за исключением образца для исходного уровня CHOP-101, который оценивали немедленно после оттаивания криоконсервированного образца. Мультипараметрическое иммунофенотипирование для образцов периферической крови и костного мозга проводили, используя приблизительно $0,2-0,5 \times 10^6$ общих клеток на условие (в зависимости от клеточного выхода в образцах), и для образцов СМЖ с использованием следовых количеств клеток, собранных после центрифугирования ликвора СМЖ, и используя красители для флуоресценции минус один (FMO), как описано в тексте. Клетки окрашивали в 100 мкл PBS в течение 30 мин на льду, используя концентрации антител и реагента, рекомендованные изготовителем, промывали и ресуспендировали в 0,5% параформальдегиде и данные получали, используя цитометр Accuri C6, оборудованный Синим (488) и Красным (633 нм) лазером. Файлы Accuri экспортировали в FCS-формате файлов и анализировали, используя программное обеспечение FlowJo (Version 9.5.3, Treestar). Значения компенсации устанавливали, используя одиночные красители антител и компенсационные шарики BD (Becton Dickinson) и рассчитывали посредством программного обеспечения. Стратегия сортировки для Т-клеток была следующей: Живые клетки (FSC/SSC) > дамп-канал (CD14+CD16+CD19-PECy7) по сравнению с CD3+ > CD3+. Общая стратегия сортировки для В-клеток была следующей: Живые клетки (FSC/SSC) > SSC низкие события > CD19+. Более подробно сортировка для образцов CHOP-100 и CHOP-101 описана на индивидуальных фигурах.

Молекулярный анализ MRD

Молекулярный анализ MRD проводили посредством Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA) и высокопроизводительного секвенирования нового поколения области BCR IGH CDR3 с использованием аналитического теста immunoSEQ на платформе Illumina HiSeq/MiSeq (Larimore et al., 2012, J Immunol 189:3221-30). Для этих анализов, 701-6000 нг (приблизительно 111000-950000 геномных эквивалентов) геномной ДНК, выделенной из образцов цельной крови или костного мозга полученных от пациентов, подвергали комбинированной мультиплексной ПЦР и секвенированию с последующими алгоритмическими анализами для количественного определения индивидуальных последовательностей IGH CDR3 в образцах. Параллельные амплификации и секвенирование области TCRB CDR3 (Robins et al., 2009, Blood 114:4099-107) в каждом образце проводили для оценки качества образцов ДНК. Для каждого пациента анализированные нуклеотидные последовательности IGH CDR3 из образцов с различными временными точками выравнивали, используя инструмент EMBL-EBI для множественного выравнивания последовательностей (Goujon et al., 2010, Nucleic Acids Res 38:W695-9; Sievers et al., 2011, Mol Syst Biol 7:539). Доминантный клон от образца с самой ранней временной точкой биоинформатически проводили через проанализированные последовательности IGH CDR3 в образцах следующей временной точки, чтобы идентифицировать присутствие последовательностей с 95% или выше попарной идентичностью последовательностей. Суммарные данные считывания секвенирования для этих последовательностей, аналогичные данным для доминантного клона приводятся для каждой временной точки.

Далее описаны результаты экспериментов.

Описания клинических случаев

CHOP-100 представлял собой 7-летнюю девочку при ее втором рецидиве ALL. Диагноз ей был поставлен 2 года ранее, и она достигла отрицательной ремиссии минимального остаточного заболевания (MRD), с рецидивом через 17 месяцев после постановки диагноза. Она повторно имела ремиссию после реиндукционной химиотерапии, но возврат заболевания наступил 4 месяца спустя, после чего она не реагировала на фуллеклофарибин/этопозид/циклофосфамид. Ее кариотип на исходном уровне представлял собой 48,XX,del(9)(p21.3),+11,del(14)(q2?q24),+16/46,XX[4]. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) собирали посредством афереза перед интенсивной химиотерапией, предполагая, что может быть недостаточное количество циркулирующих Т-клеток, способных для воспроизводства клеток после такого интенсивного лечения. Данному пациенту инфузионно вводили клетки CTL019, которые были размножены в условиях анти-CD3/CD28 и лентивирусно трансдуцировали для экспрессии анти-CD19 CAR при суммарной дозе, равной $3,8 \times 10^8$ клеток/кг ($1,2 \times 10^7$ CTL019 клеток/кг), вводимой через 3 последующих дня, как описано ранее (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Она не получала лимфоистощающей химиотерапии перед ее инфузиями CTL019, с наиболее недавней цитотоксической терапией, даваемой за 6 недель перед инфузией CTL019. Не отмечали никаких проявлений немедленной инфузионной токсичности, но она была госпи-

тализована по причине субфебрильных температур тела, которые прогрессировали до высоких температур на 4-ый день, и на 5-ый день пациента перевели в педиатрическое отделение интенсивной терапии (СНОР-100, фиг. 4А). Это сопровождалось быстрым нарастанием значительной респираторной и сердечно-сосудистой недостаточности, требующей искусственной вентиляции легких и поддержания артериального давления.

Вторым пациентом с ALL являлась 10-летняя девочка (СНОР-101), которая переносила ее второй рецидив после 4/6 трансплантаций пуповинной крови трансплантат от совместимого неродственного донора через 28 месяцев после постановки диагноза и за 10 месяцев перед инфузией CTL019. Она перенесла реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD) после трансплантации, которую устранили лечением; она не подвергалась иммуносупрессии во время рецидива. У нее в последующем не возникало ремиссии, несмотря на множество цитотоксических и биологических терапий. Ее исходный кариотип представлял собой 46 XX, del(1) (p13), t (2;9) (q?21;q?21), t (3;17) (p24;q23), del (6) (q16q21), del(9) (q13q22), der(16)t(1;?;16) (p13;?p13.3) [9],//46, Xy[1]. Перед сбором РВМС ей провели два цикла лечения блинату-момаба (Bargou et al., 2008, Science 321:974-7) без какого-либо ответа. Клетки ее периферической крови имели 68% донорского происхождения во время сбора РВМС. CTL019 Т-клетки получены и введены инфузионно при общей дозе, равной 10^7 клеток/кг ($1,4 \times 10^6$ клеток CTL019/кг) в однократной дозе, после химиотерапии этопозидом/циклофосфамидом, даваемой для лимфоистощения на неделю раньше. Ее костный мозг за день перед инфузией CTL019 заменяли популяцией клеток CD19+/CD34+ ALL, с переменной экспрессией CD19 посредством стандартной клинической проточной цитометрии (фиг. 7). У нее не наблюдали проявлений немедленной инфузиальной токсичности, но на День 6 появилась высокая температура и ее поместили в больницу. Она не испытывала никакой кардиопульмонарной токсичности и не получала глюкокортикоидов или противцитокиновой терапии. СНОР-101 испытывала высокую температуру неизвестного происхождения, предполагаемой как следствие высвобождения цитокинов (фиг. 4В), миалгии и два дня спутанности сознания (степень 3), которые закончились спонтанно. У нее не было очевидных признаков GVHD после инфузии клеток CTL019. Хотя эти клетки были собраны от пациента, они имели в основном донорское происхождение (пуповинная кровь).

Индукция ремиссии у обоих индивидов

Оба индивида имели увеличение циркулирующих лимфоцитов и нейтрофилов через 2 недели после инфузии CTL019, как показано на графиках, изображающих суммарные WBC, ALC, и ANC относительно времени инфузии CTL019 (фиг. 4С). Большинство лимфоцитов состояли из Т-клеток, которые экспрессировали химерный антигенный рецептор (фиг. 8), показанный более подробно на фиг. 5. У обоих индивидов документально зафиксирована высокая температура неинфекционного происхождения, с последующим повышением LDH (фиг. 4А). Повышения LDH и высокие температуры были аналогичны показателям, прежде описанным у пациентов с CLL после инфузии CTL019 (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33; Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Приблизительно через один месяц после инфузии достигали негативной (< 0,01%) морфологической ремиссии MRD лейкемии у обоих индивидов (табл. 1).

Клиническую ремиссию у СНОР-100 связывали с глубокой молекулярной ремиссией, которая устойчиво держалась в течение по меньшей мере 9 месяцев, с января 2013 г. (табл. 1). Высокопроизводительное секвенирование ДНК локуса IGН показало выраженное снижение общих считываний IGН на День +23 в крови и костном мозге СНОР-100. Злокачественный клон не обнаруживался в крови или костном мозге у более чем 1 миллиона клеточных эквивалентов, которые секвенировали на День +180. Напротив, последовательности Т-клеточного рецептора легко обнаруживались в крови и костном мозге, указывая на целостность ДНК, тестируемую во всех временных точках.

Таблица 1. Индукция молекулярной ремиссии в крови и костном мозге СНОР-100 и 101

Пациент	Ткань	Временная точка (день)	Число вводимых геномов (клеточные эквиваленты)	Общие считывания TCRβ	Общие считывания IGH	Общие уникальные считывания IGH	Считывания доминантного клона	Частота клона опухоли (%)
СНР959-100	Кровь	-1	111340	525717	189	6	185	97,88
		23	218210	1651129	0	0	0	0,00
		87	288152	1416378	0	0	0	0,00
		180	420571	1276098	6	2	0	0,00
	Костный мозг	-1	317460	348687	59791	318	59774	99,97
		23	362819	1712507	37	2	33	89,19
		87	645333	425128	10	1	10	100,00
		180	952381	800670	45	7	0	0,00
СНР959-101	Кровь	-1	152584	1873116	38170	52	30425	79,71
		23	417371	1462911	92	5	18	19,60
	Костный мозг	-1	158730	2417992	68368	65	50887	74,43
		23	305067	1978600	1414	11	946	66,90
		60	916571	н/о	530833	206	363736	68,90

Молекулярный анализ минимального остаточного заболевания проводили на ДНК, выделенной из цельной крови или костного мозга

Токсичность СТЛ019

Нежелательные явления степени 3 и 4 представлены в обобщенном виде в табл. 2. Острую токсичность наблюдали у обоих пациентов, которая состояла из лихорадочного состояния и синдрома высвобождения цитокинов (CRS), которые переходили в синдром активации макрофагов (MAS). Оба пациента находились под текущим контролем и получали профилактическое лечение для синдрома лизиса опухоли. Оба испытывали значительное повышение LDH, причины которого вероятно являлись многофакторными, но могли включать синдром лизиса опухоли. Каждое значение мочевой кислоты у СНОР-100 было либо ниже нормального или находилось в интервале для нормы, и она получала аллопуринол только в дни 5-6. СНОР-101 получала профилактический аллопуринол в дни 0-14 и имела аномальные значения мочевой кислоты, равные 4,8-5,7 в дни 8-10, указывающие на мягкий синдром лизиса опухоли.

Таблица 2. Нежелательные явления (степень 3 и 4) у СНОР-100 и СНОР-101

СНР595-100				
Категория НЯ	Токсичность НЯ	Степень НЯ	Описание НЯ	Продолжительность
ИНФЕКЦИЯ	Фебрильная нейтропения	3	Фебрильная нейтропения. Температура: Пиковая температура 40,7°C, снижение на день 7 после введения тоцилизумаба	7 дней
Общее состояние	Гипотензия	4	Шок, нуждающийся в поддержании повышенного давления. Исключение всех средств поддержания повышенного давления, кроме добутамина.	4 дня при степени 4, исключение всех вазопрессоров на 12 день
СОСУДИСТЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ	Синдром острой кровопотери	4	Состояние, угрожающее жизни, показано средство, повышающее давление или поддерживающее дыхательную функцию	см. выше
ЛЕГОЧНЫЕ/РЕСПИРАЦИЯ	Синдром острой дыхательной недостаточности (ARDS)	4	Присутствие, показано интубирование. Рентген грудной клетки становится ясным на 8 день.	12 дней

СНР595-101				
Категория НЯ	Токсичность НЯ	Степень НЯ	Описание НЯ	Продолжительность
ИНФЕКЦИЯ	Фебрильная нейтропения	3	Фебрильная нейтропения. Температура: Пиковая температура 40,3°C, снижение на день 6	6 дней
НЕВРОЛОГИЯ	Гипотензия	3	Родители отмечали спутанность сознания. МРТ норма.	3 дня
МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ/ ЛАБОРАТОРИЯ	повышенная AST	4	Пиковое значение AST: 1060 (степень 4)	1 день при степени 4
МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ/ ЛАБОРАТОРИЯ	повышенная ALT	4	Пиковое значение ALT: 748 (степень 4)	1 день при степени 4

Степень нежелательных явлений присваивали в соответствии с Общими Критериями терминологии для нежелательных явлений 3.0.

У СНОР-100, глюкокортикоиды вводили на День +5 с коротким ответом на кривой температур, но без ремиссии гипотензии. Однократный курс противоцитокиновой терапии, состоящей из этанерцепта и тоцилизумаба, проводили на День +8, и он сопровождался быстрыми клиническими эффектами: в пределах нескольких часов температура снижалась, постепенно снижали дозу вазоактивных лекарственных средств и вспомогательное дыхание, так как клинический и радиологический ARDS устранялся. У нее отсутствовало лабораторное подтверждение синдрома лизиса опухоли; однако биохимическое подтверждение MAS было отмечено повышением ферритина до 45529 нг/дл на День + 11, коагулопатией с повышенным d-димером и гипофибриногенемией, гепатоспленомегалией, повышением трансаминаз, повышенным LDH (фиг. 4C) и повышенными триглицеридами, а также профилем цитокинов, согласующимся с MAS. Ее ферритин уменьшился до 2368 на День +26, и клинические и лабораторные аномалии MAS закончились.

У СНОР-101, несмотря на отсутствие прямого подтверждения синдрома лизиса опухоли, отличного от лихорадочного состояния и изменений LDH (фиг. 4C), также развивались признаки MAS с повышениями ферритина до 33360 на День +, с пиковым значением при 74899 на день 11, трансаминазами, которые достигали степени 4 в течение 1 дня, и повышенным d-димером в сыворотке. Эти биохимические изменения были обратимыми, так как трансаминазы улучшились до степени 1, а ферритин уменьшился до 3894 на День +21. Она была выписана из больницы на День + 16.

У обоих индивидов развивались значительные повышения числа цитокинов и цитокиновых рецепторов в сыворотке (фиг. 1B). У обоих пациентов повышения интерферона- γ и IL-6 были наиболее значительными. Эти наблюдения были аналогичны картине, наблюдаемой прежде у пациентов с CLL, которые также испытывали ремиссию лейкемии после инфузии CTL019 (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Пиковые повышения цитокинов коррелировали по времени с системным воспалением, если судить по изменениям центральной температуры тела (фиг. 4C).

In vivo размножение CTL019 у пациентов с ALL

Фракция Т-клеток CTL019 в циркуляции прогрессирующе увеличивалась in vivo до 72% (СНОР-100) и 34% (СНОР-101) Т-клеток (фиг. 5A). Начальная эффективность трансдукции составляла 11,6% и 14,4% у Т-клеток, вводимых инфузионно в СНОР-100 и -101 соответственно. Принимая во внимание то, что общая ALC существенно увеличивалась у обоих пациентов (фиг. 4C), и то, что частота клеток CTL019 прогрессирующе увеличивалась in vivo от частоты исходного уровня (фиг. 8), имело место устойчивое и селективное размножение клеток CTL019 у обоих пациентов. Селективное увеличение Т-клеток, экспрессирующих CTL019 у обоих пациентов, согласуется с противолейкемическим механизмом, включающим CD19-управляемое размножение, и с последующей элиминацией клеток, которые экспрессируют CD19 у обоих пациентов (фиг. 6 и 9).

Анализ методом молекулярного глубокого секвенирования TCR в образцах периферической крови и костного мозга у СНОР-100, полученных в День +23, когда посредством проточной цитометрии было показано, что >65% клеток CD3+ в периферической крови и костном мозге представляют собой CTL019+, показал отсутствие Т-клеток доминантного клонотипа TCR в обоих расположениях, с 10% наиболее распространенных Т-клеток, присутствующих при частотах между 0,18-0,7% в костном мозге и 0,19-0,8% в периферической крови. Шесть из 10 доминантных клонов были распределены между двумя расположениями. В дополнение, присутствуют как CD4, так и CD8 CAR-T-клетки. Таким образом, CAR-T-клетки, по-видимому, пролиферируют после CD19-стимулируемого размножения, а не под действием сигналов TCR или клон-специфичных событий, таких как активация посредством интеграции лентивируса.

Направленная миграция и морфология CAR-T-клеток CTL019 в костном мозге и ЦНС

Клетки CTL019 размножались более чем 1000-кратно в периферической крови и костном мозге (фиг. 5). Частота клеток CTL019 увеличилась на более чем 10% циркулирующих Т-клеток на День + 20 у обоих индивидов (фиг. 8), с абсолютной магнитудой размножения CTL019, аналогичной наблюдаемой у пациентов с CLL (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73). Неожиданно, клетки в СМЖ

также показали высокую степень маркировки гена CTL019, а также выживали с высокой частотой более 6 месяцев (фиг. 5B). Направленная миграция клеток CTL019 в СМЖ была неожиданной, с учетом того, что ни один пациент не имел обнаруживаемой лейкемии ЦНС по данным цитоспинального мазка во время инфузии или оценки через 1 месяц после лечения. Кроме того, в предшествующих сообщениях о CAR-терапии для злокачественных В-клеток не отмечали направленной миграции CAR-T-клеток в ЦНС (Till et al., 2008, Blood 112:2261-71; Brentjens et al., 2011, Blood 118:4817-28; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest 121:1822-5; Jensen et al., 2010, Biol Blood Marrow Transplant 16:1245-56; Till et al., 2012, Blood 119:3940-50; Kochenderfer et al., 2012, Blood 119:2709-20). Морфология лимфоцитов в крови и СМЖ показана для СНОР-100 и 101 на фиг. 5D. Поскольку >70% лимфоцитов, находящихся в циркуляции на День +10 представляли собой клетки CTL019 (v 5A и 5B), большинство крупных гранулярных лимфоцитов, показанных на левой панели фиг. 5D, вероятно являются клетками CTL019. Аналогично, поскольку многие лимфоциты в СМЖ, полученные от СНОР-101 на День +23, представляли собой клетки CTL019 (фиг. 5B и 5C), цитоспинальный мазок лимфоцитов СМЖ на фиг. 5D наиболее вероятно представляет морфологию клеток CTL019 *in vivo*, которые направленно мигрировали в ЦНС.

Индукция аплазии В-клеток

Оба индивида имели элиминацию CD19-положительных клеток в костном мозге и крови в пределах 1 месяца после инфузии CTL019 (фиг. 6, и фиг. 9). У СНОР-100, высокая доля клеток, остающихся в костном мозге на День+6 после инфузии, представляли собой CD19+CD20+ лейкемические бластные клетки. Данная популяция клеток была необнаруживаемой на День+23, причем этот эффект поддерживался свыше 9 месяцев у данного пациента (фиг. 9A). С учетом того, что СНОР-100 не проходила химиотерапию в течение 6 недель, предшествующих инфузии CTL019, данное указывает на то, что клеток CTL019 было достаточно для удаления нормальных и лейкемических В-клеток в данном случае.

Появление варианта исчезновения CD19 у СНОР-101

СНОР-101 испытывала клинический рецидив, с явным проявлением в периферической крови через 2 месяца после инфузии CTL019, что подтверждается повторным появлением бластных клеток в циркуляции. Эти клетки являлись CD4 5дим-положительными, CD34-положительными и не экспрессировали CD19 (фиг. 6). Отсутствие исходных доминантных клеток CD34dim+CD34+CD19dim+ согласуется с сильным противолейкемическим селективным давлением CAR-T-клеток CTL019, направленных на CD19 (фиг. 9B). Глубокое секвенирование IGH показало присутствие злокачественного клона в периферической крови и костном мозге уже на День+23 (табл. 1), несмотря на клиническую оценку негативности MRD по данным проточной цитометрии в этой временной точке (фиг. 7). В дополнение, глубокое секвенирование материала, полученного при клиническом рецидиве, показало, что клетки CD45dimCD34+CD19 являются клонально родственными первоначально доминантным клеткам CD45dim+CD34+CD19dim+, поскольку они совместно используют такую же последовательность IGH.

Ремиссия ALL под действием Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор

Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют индукцию ремиссии рецидивирующей и рефрактерной лейкемии у первых двух пациентов, проходивших лечение по данному протоколу. Ремиссия была устойчивой у одного индивида и сопровождалась рецидивом вследствие появления CD19-отрицательных бластных клеток у другого индивида. Генетически модифицированные клетки CTL019 направленно мигрировали в ЦНС при высоких уровнях у обоих пациентов. Наблюдали повышения цитокинов, которые являлись нацеленными на мишень, обратимыми, и временно сопровождалась элиминацией бластных клеток, которые экспрессировали CD19 у обоих индивидов. Индукция полной ремиссии при рефрактерной CD19-положительной ALL после инфузии CAR-T-клеток является обнадеживающей, в особенности с учетом низкой частоты ремиссий после инфузии аллогенных донорных лимфоцитарных инфузий, которые не экспрессируют CAR (Kolb et al., 1995, Blood 86:2041-50; Collins et al., 1997, J Clin Oncol 15:433-44; Collins et al., 2000, Bone Marrow Transplant 26(5):511-6). Технология глубокого секвенирования показала, что инфузия CTL019 с CAR была связана с устойчивым 5-log снижением частоты появления злокачественных В-клеток у СНОР-100, дополнительно указывающей на высокие противоопухолевые эффекты при рефрактерной к химиотерапии лейкемии.

Досадное появление CD19-отрицательных бластных клеток у одного индивида согласуется с более ранними сообщениями, которые документально свидетельствуют о существовании CD19-отрицательных клетках-предшественниках при некоторых случаях ALL (Hotfilder et al., 2005, Cancer Research 65: 1442-9; le Viseur et al., 2008, Cancer Cell 14:47-58). Возможно совместная инфузия CAR-T-клеток, перенаправленных на новые особенности, в дополнение к CD19 может снизить вероятность данного события. До сих пор рецидив с CD19-отрицательными ускользающими клетками у взрослых с CLL после лечения клетками CTL019 не наблюдался (Kalos et al., 2011, Science Translational Medicine 3:95ra73), позволяя предположить, что данный случай может быть специфичным для подтипа острой лейкемии. Индукция ремиссии у СНОР-100 не требовала проведения сопутствующей химиотерапии, и согласуется с более ранним сообщением, показывающим, что ремиссии при CLL могут задерживаться на несколько недель после химиотерапии (Porter et al., 2011, N Engl J Med 365:725-33). Таким образом, сопутствующее введение цитотоксической химиотерапии может являться необязательным для CAR-опосредованных противоопухолевых эффектов.

Оба пациента детского возраста с ALL испытывали значительную токсичность после инфузии CTL019. Наблюдали индукцию аплазии В-клеток, которая указывает на то, что CAR-T-клетки могут функционировать на фоне рецидивирующей острой лейкемии. У обоих пациентов также развивались клинические и очевидные доказательства синдрома высвобождения цитокинов и синдрома активации макрофагов в пределах недели от инфузии.

Профиль цитокинов, наблюдаемый у этих пациентов является аналогичным данным более ранних сообщений о картинах распределения цитокинов у детей с гемофагоцитозом и синдромом активации макрофагов или гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (Tang et al., 2008, Br J Haematol 143:84-91; Behrens et al., 2011, J Clin Invest 121 (6):2264-77). Синдром активации макрофагов характеризуется гипервоспалением с продолжительным лихорадочным состоянием, гепатоспленомегалией и цитопениями. Результаты лабораторного исследования, характерными для данного синдрома, являются повышенный ферритин, триглицериды, трансаминазы, билирубин (в основном, конъюгированный) и растворимая а-цепь рецептора интерлейкина-2, и сниженный фибриноген (Janka et al., 2012, Annu Rev Med 63:233-46). Недавние исследования показали, что тоцилизумаб (анти-IL6) является перспективным для лечения резистентной к глюкокортикоидам GVHD (Drobyski et al., 2011, Biol Blood Marrow Transplant 17(12): 1862-8; Le Huu et al., 2012, J Invest Dermatol 132(12):2752-61; Tawara et al., 2011, Clinical Cancer Research 17:77-88), и результаты, представленные в настоящем описании согласуются с этим данными.

Интенсивное размножение CTL019 in vivo, персистирующая аплазия В-клеток и значительная антилейкемическая активность предполагают существенные и устойчивые эффекторные функции клеток CTL019 у пациентов детского возраста с прогрессирующей ALL. Высокая эффективность направленной миграции CAR-T-клеток в ЦНС является обнадеживающей в качестве механизма для надзора, чтобы предотвратить рецидив в неприкосновенном участке, таком как ЦНС (Pullen et al., 1993, J Clin Oncol 11 (5): 839-49), и поддерживает необходимость тестирования направленных терапий с CAR-T-клетками для лимфом ЦНС и первичных злокачественных изменений в ЦНС. За исключением аплазии В-клеток, продолжительность которой в настоящее время не определена, полагают, что применение иммунотерапии, таких как CTL019, может иметь благоприятный профиль долговременных нежелательных явлений по сравнению с высокими дозами химиотерапии и облучения, которые используются в качестве современного стандарта клинической практики для большинства случаев лейкемии у детей (Garcia-Manero and Thomas, 2001, Hematol Oncol Clin North Am 15(1):163-205).

Индукция полных ремиссий ALL посредством Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор

Тоцилизумаб (анти-IL6) имеет перспективу применения для лечения резистентной к глюкокортикоидам GVHD, и результаты, представленные в настоящем описании, согласуются с этими данными. Дополнительно, интересно отметить, что у CHOP 100, CRS проявления в виде высокой температуры, гипотензии и мультиорганной недостаточности были резистентными к высоким дозам глюкокортикоидов, вводимых в течение предшествующих 2 дней перед цитокин-направленной терапией. Окончательно у CHOP-100 бифазные изменения IL-1 β , IL-1RA и IL-2, показанные на фиг. 4B, могут иметь отношение к цитокин-направленной терапии с использованием этанерцепта и тоцилизумаба.

Индукция ремиссии у пациента, рефрактерного к терапии блинатумомабом, дополнительно подчеркивает активность клеток CTL019. Высокая эффективность направленной миграции CAR-T-клеток в ЦНС является обнадеживающей в качестве механизма для надзора, чтобы предотвратить рецидив в неприкосновенном месте, таком как ЦНС, и подтверждает необходимость тестирования направленных терапий с CAR-T-клетками для лечения лимфом ЦНС и первичных злокачественных изменений в ЦНС. Ни один пациент не испытывал когнитивных эффектов, которые могли бы быть отнесены к направленной миграции Т-клеток в ЦНС.

Пример 4. Итоговая информация

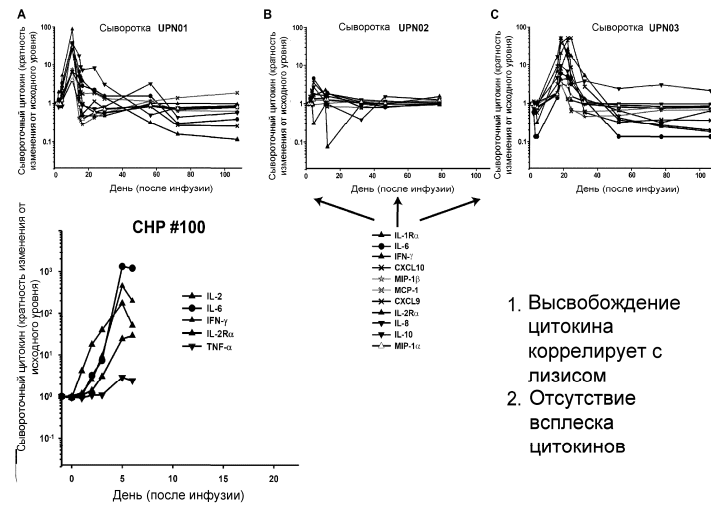
У пациентов, принимающих CAR-T-клетки, измеряли различные маркеры. В качестве неограничивающего примера измеряли ферритин, миоглобин, и ингибитор-1 (PAI-1) активатора плазминогена; см. фиг. 10, 11 и 12 соответственно. Повышенные уровни этих маркеров коррелировали с конечным результатом. Пациентов, обозначенных как -01, -03, -09, -100 и -101, классифицировали, как пациентов с полным клиническим ответом. Пациентов, обозначенных как -02, -05, -10, (вторая инфузия и ответ приблизительно на День 70) и -12, классифицировали как пациентов с частичным клиническим ответом. Пациентов, обозначенных как -06, -07 и -14, классифицировали как пациентов с отсутствием клинического ответа.

Раскрытия всяких и каждого патента, патентной заявки и публикации, цитируемых в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В то время как настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие варианты осуществления и вариации настоящего изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области без отступления от истинной сущности и объема притязаний изобретения. Прилагаемая формула изобретения подразумевает рассмотрение, как включающая такие варианты осуществления и эквивалентные вариации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

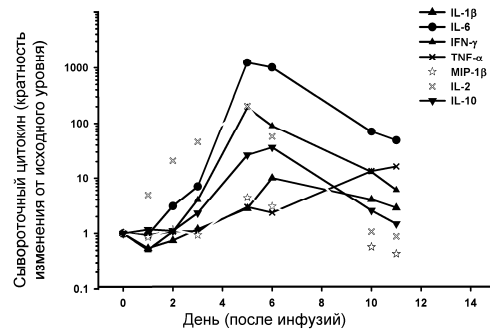
1. Способ лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием, связанным с повышенной экспрессией опухолевого антигена,
 - где способ включает проведение у пациента терапии первой линии и терапии второй линии,
 - где терапия первой линии включает введение пациенту эффективного количества Т-клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки),
 - где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен,
 - где уровень цитокина повышается после проведения терапии первой линии по сравнению с уровнем перед проведением терапии первой линии,
 - где цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1 и IL-6, и любой их комбинации,
 - где вторая линия терапии включает введение ингибитора цитокина, выбранного из группы, состоящей из анакинра, тоцилизумаба и любой их комбинации.
2. Способ лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием, связанным с повышенной экспрессией опухолевого антигена,
 - где способ включает введение пациенту эффективного количества Т-клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки),
 - где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен,
 - где способ дополнительно включает введение ингибитора цитокина для контроля токсичности, вызванной введением указанных Т-клеток,
 - где ингибитор цитокина ингибирует цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-1, IL-6 и любой их комбинации.
3. Способ лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием, связанным с повышенной экспрессией опухолевого антигена,
 - где способ включает введение пациенту эффективного количества Т-клеток, генетически модифицированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки),
 - где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и сигнальный домен,
 - где введение указанных CAR-модифицированных Т-клеток приводит к синдрому высвобождения цитокинов (CRS), и дополнительно включает применение ингибитора цитокина для лечения указанного CRS,
 - где ингибитор цитокина ингибирует цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-1, IL-6 и любой их комбинации.
4. Способ лечения синдрома высвобождения цитокинов (CRS), возникающего при введении пациенту Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки), включающий введение ингибитора цитокина пациенту,
 - где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и межклеточный сигнальный домен,
 - где CAR Т-клетки используются для лечения злокачественного новообразования у пациента, где злокачественное новообразование связано с повышенной экспрессией опухолевого антигена,
 - дополнительно, где указанный ингибитор цитокина является ингибитором IL-6.
5. Способ лечения синдрома высвобождения цитокинов (CRS), возникающего при введении пациенту Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки), включающий введение ингибитора цитокина пациенту,
 - где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и межклеточный сигнальный домен,
 - где CAR Т-клетки используются для лечения злокачественного новообразования у пациента, где злокачественное новообразование связано с повышенной экспрессией опухолевого антигена,
 - дополнительно, где указанный ингибитор цитокина является ингибитором IL-1.
6. Способ по любому из пп.1-3, где после введения CAR Т-клеток контролируют уровни цитокинов у пациентов для определения подходящего типа ингибитора цитокина.
7. Способ по п.6, где уровень цитокина контролируют посредством обнаружения уровня белка цитокина в биологическом образце пациента.
8. Способ по п.6, где уровень цитокина контролируют посредством обнаружения уровня нуклеиновой кислоты, кодирующей цитокин, в биологическом образце пациента.
9. Способ по любому из пп.1-4 и 6-8, где цитокином является IL-6 и ингибитором цитокина является тоцилизумаб.
10. Способ по любому из пп.1-3 и 5-8, где цитокином является IL-1, IL-1 α или IL-1 β и ингибитором цитокина является анакинра.

11. Способ по любому из пп.1-3 и 5-8, где цитокин представляет собой IL-1 α или IL-1 β и ингибитором цитокина является анакинра.
12. Способ по любому из пп.1-3 и 5-8, где цитокин представляет собой IL-1 β и ингибитором цитокина является анакинра.
13. Способ по любому из пп.1-12, где антигенсвязывающий домен нацеливается на опухолевый антиген.
14. Способ по любому из пп.1-13, где антигенсвязывающий фрагмент слит с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы, состоящей из сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3 дзета и любой их комбинации.
15. Способ по любому из пп.1-14, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из одного или нескольких из CD19, CD20, CD22, EGFRvIII и IL3Ra.
16. Способ по любому из пп.1-15, где опухолевым антигеном является CD19.
17. Способ по любому из пп.1-16, где CAR T-клетка индуцирует повышенные уровни IFN- γ или IL-2 у пациента.
18. Способ по любому из пп.3, 4 и 5, где CRS приводит к гемофагоцитарному лимфогистиоцитозу и/или синдрому активации макрофагов.
19. Способ по любому из пп.1-18, где злокачественное новообразование представляет собой гематологическое злокачественное новообразование, выбранное из группы, включающей острый лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, миелобластный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, моноцитарный лейкоз, эритролейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хроническая лимфоцитарный лейкоз, истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию, пре-B ALL (в педиатрии), ALL у взрослых, мантийноклеточную лимфому и диффузную В-крупноклеточную лимфому.
20. Способ по п.19, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из пре-B ALL (в педиатрии), ALL у взрослых, мантийноклеточной лимфомы или диффузной В-крупноклеточной лимфомы.
21. Способ по любому из пп.1-20, где злокачественное новообразование является рефрактерным или резистентным к общепринятой химиотерапии.
22. Способ по любому из пп.1-21, где CAR T-клетки представляют собой Т-клетки человека, трансдуцированные *in vitro* вектором, кодирующим CAR, и CAR-модифицированные Т-клетки являются аутологичными для реципиента.
23. Способ по любому из пп.1-22, где CAR-модифицированные Т-клетки вводят в виде фармацевтической композиции в сочетании с комбинацией разбавителей и/или другими эксципиентами.
24. Способ по п.9, где тоцилизумаб вводят в дозе 8 мг/кг.
25. Способ по любому из пп.1-24, дополнительно включающий введение кортикостероида пациенту.
26. Способ по п.25, где кортикостероидом является метилпреднизолон.
27. Способ лечения синдрома высвобождения цитокинов (CRS), возникающего при введении пациенту Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки), включающий введение тоцилизумаба пациенту,
где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и межклеточный сигнальный домен,
где CAR Т-клетки используют для лечения злокачественного новообразования у пациента.
28. Способ лечения синдрома высвобождения цитокинов (CRS), возникающего при введении пациенту Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR Т-клетки), включающий введение анакинры пациенту,
где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и межклеточный сигнальный домен,
где CAR Т-клетки используются для лечения злокачественного новообразования у пациента.

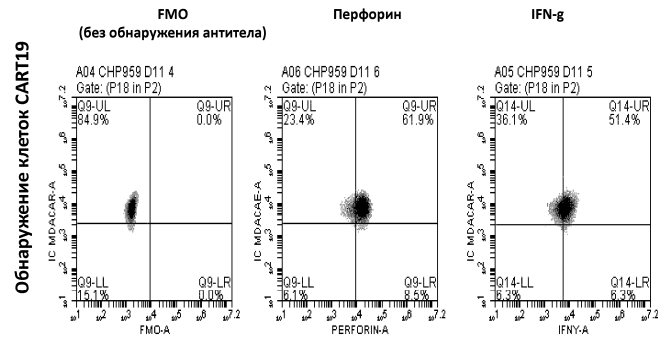


Фиг. 1

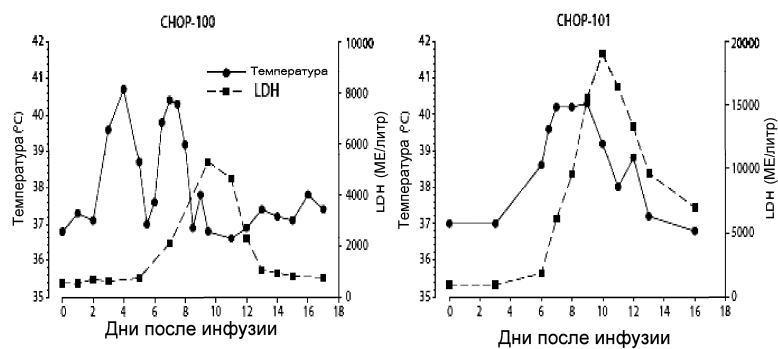
Замедленный синдром высвобождения цитокинов и синдром лизиса опухоли у р/р ALL при ответе на мишень



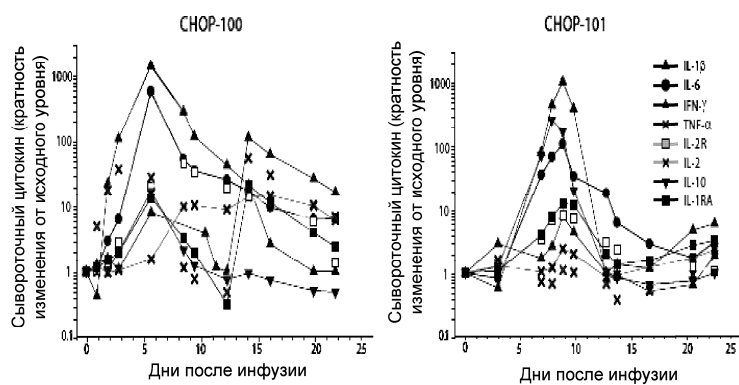
Фиг. 2



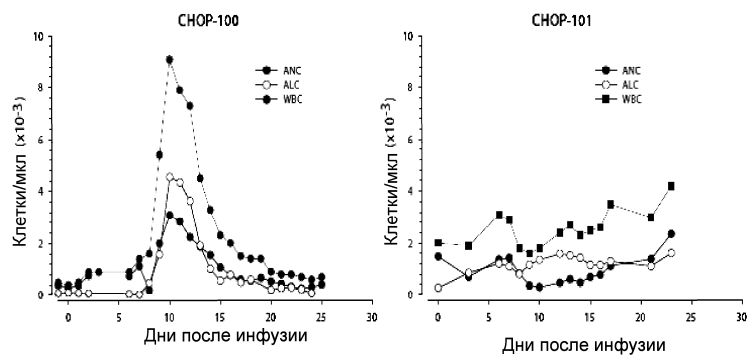
Фиг. 3



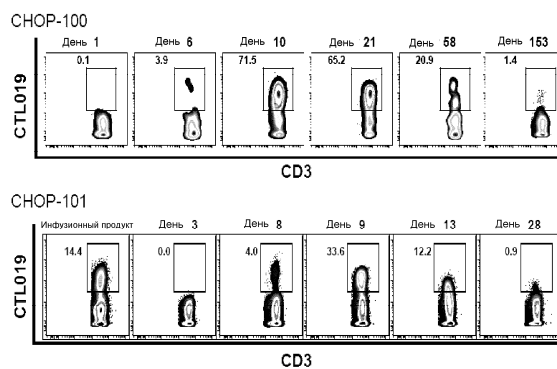
Фиг. 4А



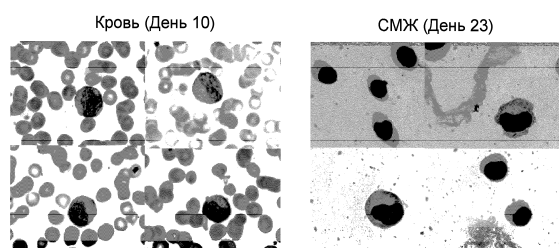
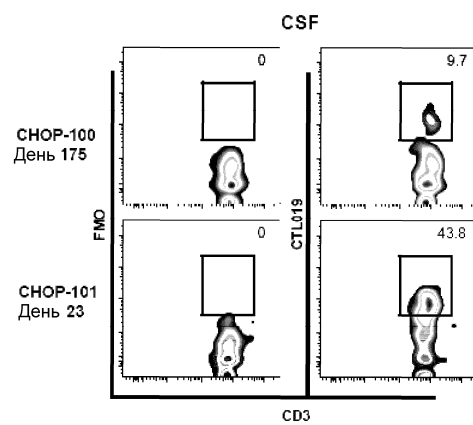
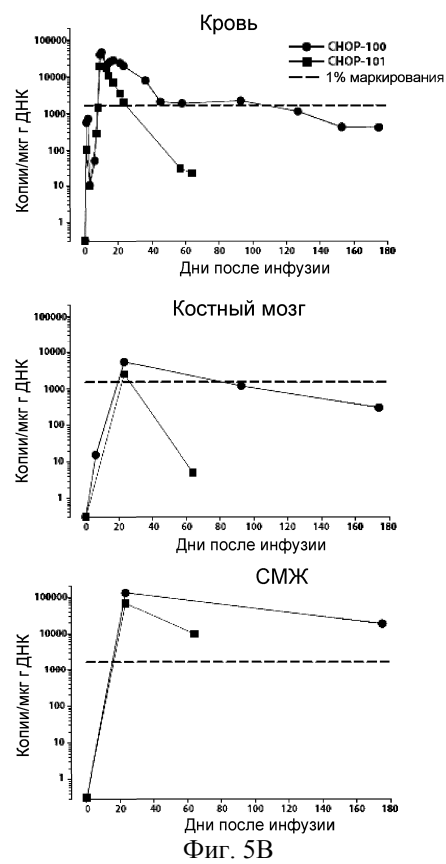
Фиг. 4В



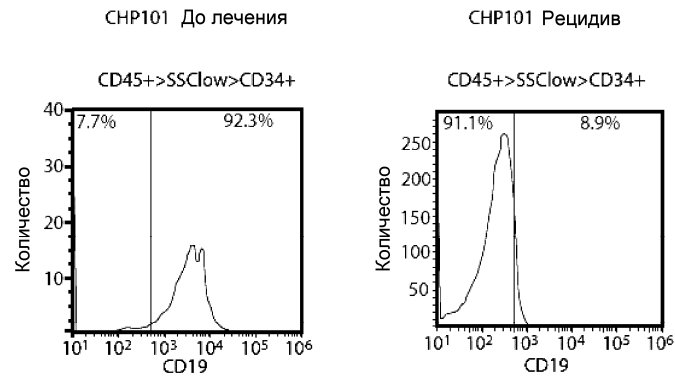
Фиг. 4С



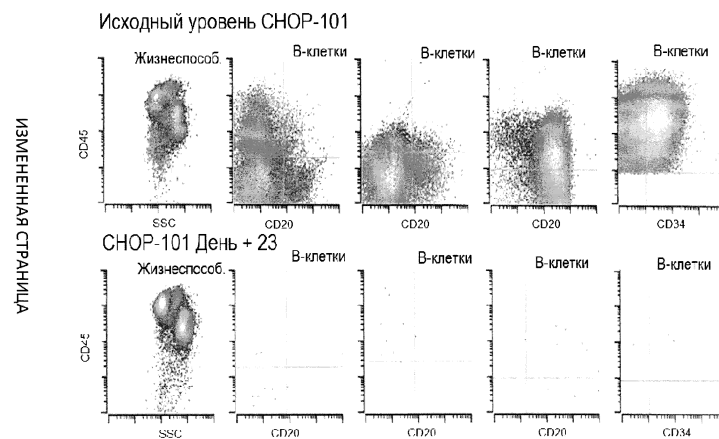
Фиг. 5А



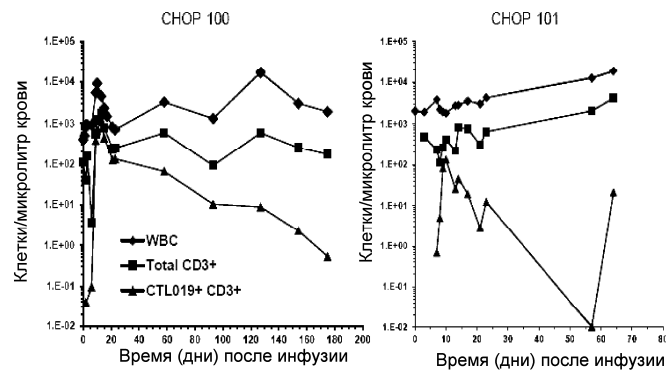
Фиг. 5D



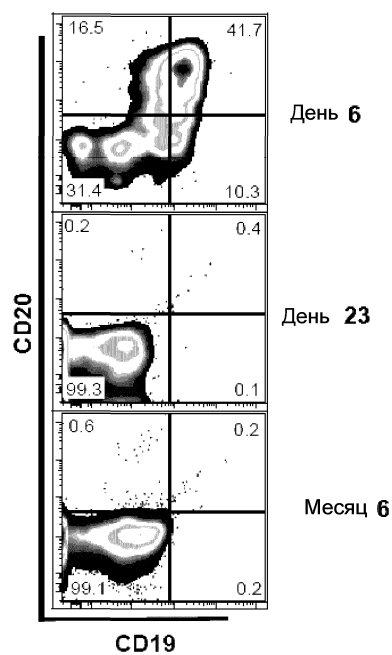
Фиг. 6



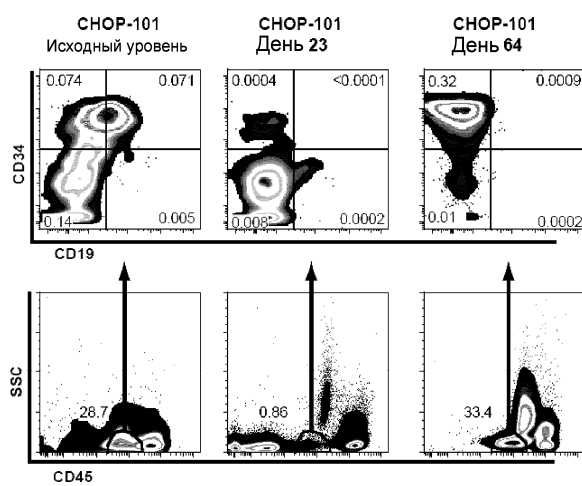
Фиг. 7



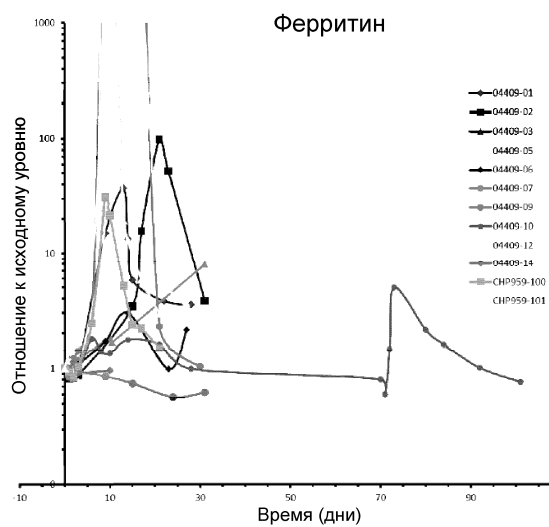
Фиг. 8



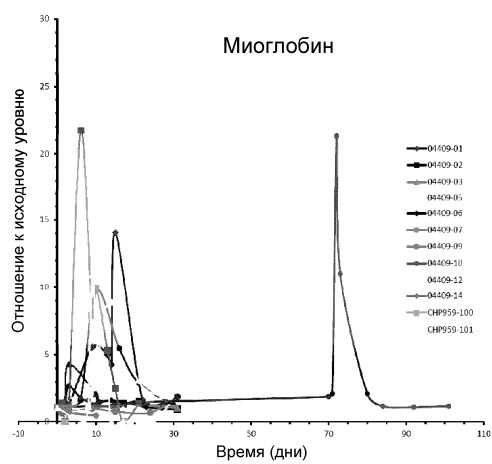
Фиг. 9А



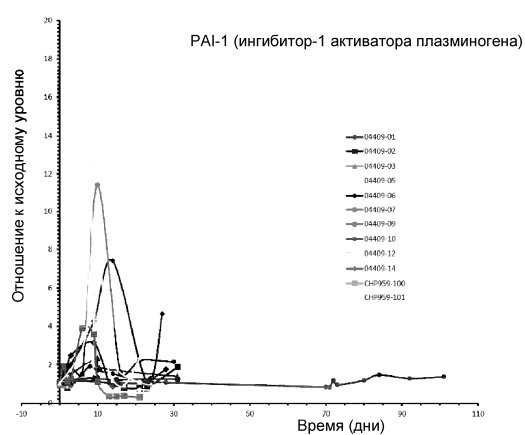
Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

