

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192964 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.17

(22) Дата подачи заявки
2020.04.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

(31) 62/840,906

(32) 2019.04.30

(33) US

(86) PCT/US2020/030690

(87) WO 2020/223470 2020.11.05

(71) Заявитель:
МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
КЭНСЕР СЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:
Смит Эрик Л., Бренджес Ренье Дж.
(US)

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

(57) Изобретение относится к комбинированной терапии для лечения заболеваний или нарушений, например рака. В частности, настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение генетически модифицированных клеток и применение ионизирующего излучения.

До инфузии



202192964 A1

202192964

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 571673EA/050

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США с серийным № 62/840906, поданной 30 апреля 2019 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, и в отношении которой испрашивается приоритет.

2. СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который подан в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия файла в формате ASCII, созданная 29 апреля 2020 г., имеет название 072734_1037_ST25.txt и размер 12288 байт.

3. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для лечения заболеваний или нарушений, например, рака. В частности, настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение генетически модифицированных клеток и применение ионизирующего излучения.

4. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Радиотерапия (РТ) действует локально, повреждая ДНК опухолевых клеток, и может вызывать системный абскопальный эффект; то есть, она может обеспечивать опосредованный иммунной системой противоопухолевый ответ вне поля облучения. Этому ответу способствует высвобождение неоантигенов, которые вызывают и формируют системный TCR-опосредованный противоопухолевый иммунный ответ (Sridharan et al., Br J Cancer (2016);115:252-60; Tang et al., Cancer Immunol Res (2014);2:831-8). Блокада контрольных точек действует синергически с применяемой параллельно РТ, вероятно, вследствие этого повышенного воздействия на Т-клетки неоантигенов, Oncoimmunology (2014);3:e28780; Postow et al., N Engl J Med. (2012);366:925-31; Park et al., Cancer Immunol Res (2015);3:610-9; Victor et al., Nature (2015);520:373-7).

Существуют различные способы иммунотерапии и/или клеточной терапии для лечения заболеваний и состояний. Например, варианты адоптивной клеточной терапии (в том числе включающие введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, специфичные для интересующего заболевания или нарушения, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие варианты адоптивной иммунной клеточной и адоптивной Т-клеточной терапии) могут быть эффективны в лечении рака, а также других заболеваний и нарушений. Альтернативные способы необходимы, например, для обеспечения повышенной эффективности и/или уменьшения синдрома высвобождения цитокинов в определенных популяциях пациентов, и/или для лечения определенных заболеваний или

состояний. В число представленных вариантов осуществления изобретения входят способы и варианты применения, которые удовлетворяют такие потребности.

5. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены способы и композиции для лечения субъектов, имеющих, или предположительно имеющих, заболевание или состояние, такое как рак или другое пролиферативное заболевание. В некоторых вариантах осуществления способ включает (а) введение субъекту, имеющему заболевание или состояние, дозы клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который связывает антиген; и (b) воздействие на указанного субъекта ионизирующим излучением, где воздействие ионизирующим излучением начинают не позднее, чем через примерно две недели после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

В некоторых вариантах осуществления воздействие ионизирующим излучением начинают не позднее, чем через примерно одну неделю после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления воздействие ионизирующим излучением начинают через срок от примерно 5 дней до примерно 10 дней после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления у субъекта не было рецидива в процессе, или непосредственно перед началом, воздействия ионизирующим излучением.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак. Заболевание или состояние может быть выбрано из группы, состоящей из рака крови, В-клеточных злокачественных опухолей, рака толстой кишки, рака легких, рака печени, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичников, рака кожи, меланомы, рака костей, рака головного мозга, рака яичников, эпителиальных форм рака, почечно-клеточной карциномы, аденокарциномы поджелудочной железы, карциномы шейки матки, колоректального рака, глиобластомы, нейробластомы, саркомы Юинга, медуллобластомы, остеосаркомы, синовиальной саркомы, мезотелиомы и их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления рак крови выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, лимфомы из клеток мантийной зоны и медленно растущей В-клеточной лимфомы. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой множественную миелому.

Антиген может представлять собой опухолевый антиген или антиген патогена. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой опухолевый антиген. Опухолевый антиген может быть выбран из группы, состоящей из BCMA, GPRC5D, FcRL5, тирозинкиназного рецептора-сироты ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена вируса гепатита В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, 0EPHa2, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4, FBP, эмбрионального ацетихолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-

MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, KDR, легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-молекулы клеточной адгезии, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простатического специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, а также MAGE A3, CE7, антигена 1 опухоли Вильмса (WT-1), циклина и биотинилированных молекул. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой BCMA.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

CAR может содержать внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи. Внутриклеточный сигнальный домен может также содержать костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область может содержать сигнальный домен CD28 или его часть, сигнальный домен 4-1BB или его часть, сигнальный домен OX40 или его часть, сигнальный домен ICOS или его часть, сигнальный домен DAP-10 или его часть, или их сочетание. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен 4-1BB или его часть.

CAR может также содержать трансмембранный домен. Трансмембранный домен может содержать трансмембранный домен CD8 или его часть, или трансмембранный домен CD28 или его часть. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8 или его часть.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи («V_H»), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; CDR1 вариабельной области легкой цепи («V_L»), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки, опухоль-инфильтрирующего лимфоцита (ОИЛ) и Т-клетки - естественного киллера (NKT). Клетка может быть аутологичной или аллогенной для

субъекта.

В некоторых вариантах осуществления доза клеток включает клетки в количестве, достаточном для уменьшения тяжести заболевания или состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту последующей дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток после введения первой дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

Ионизирующее излучение может быть выбрано из группы, состоящей из внешнего ионизирующего излучения, радиофармацевтического средства, а также их сочетания. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение представляет собой внешнее ионизирующее излучение. В некоторых вариантах осуществления на очаг поражения у субъекта воздействуют общей дозой излучения по меньшей мере примерно 10 Гр. В некоторых вариантах осуществления на очаг поражения у субъекта воздействуют общей дозой излучения от примерно 10 Гр до примерно 30 Гр. В некоторых вариантах осуществления на очаг поражения у субъекта воздействуют общей дозой излучения примерно 20 Гр.

В некоторых вариантах осуществления воздействие ионизирующим излучением и введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток обеспечивают синергический абскопальный эффект. В некоторых вариантах осуществления воздействие ионизирующим излучением и введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток обеспечивают отсроченный или редуцированный СВЦ-подобный ответ. В некоторых вариантах осуществления воздействие ионизирующим излучением и введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток обеспечивают системное размножение нового клона Т-клеточного рецептора (TCR).

Настоящее изобретение также относится к ионизирующему излучению и клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, который связывает антиген, для применения в терапии, где воздействие ионизирующим излучением начинают не позднее, чем через примерно две недели после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

6. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигурах 1A-1F показано, что ВСМА-направленная CAR-T-клеточная терапия, с последующей радиотерапией (РТ), приводила к клиническому ответу, расширению клональности TCR и СВЦ-подобным результатам после РТ. Субъект получал режим кондиционирования с использованием циклофосфамида и флударабина, а затем CAR-T-клетки в день 0. Радиотерапию (РТ) применяли 10 разовыми дозами с дня 6 до дня 20 (рамка). На Фиг. 1A представлены результаты ПЭТ/КТ сканирования до начала лечения, показывающие обширное заболевание с повышенным внутрикостным и внекостным накоплением ФДГ, включая образования в мягких тканях и в плевральной полости. На Фиг. 1B показано снижение количества М-белка, начинающееся в процессе РТ. На Фиг. 1C представлены результаты ПЭТ/КТ через 8 недель после терапии, показывающие исчезновение очагов ММ. На Фиг. 1D показано продуцирование IL6 и CRP

(провоспалительных маркеров, связанных с активной CAR-T-клеточной функцией), достигающее пика после завершения РТ. На Фиг. 1Е представлена кривая максимальной дневной температуры, демонстрирующая лихорадочное состояние в момент пикового содержания IL6 и CRP. На Фиг. 1F представлены результаты анализа клональности TCR, показывающие увеличение количества новых клонов TCR. Показана подгруппа TCR, демонстрирующая расширенный спектр новых клонов с течением времени.

На Фиг. 2А и 2В показан ранний локальный ответ на радиотерапию. На Фиг. 2А представлены результаты МРТ до (слева) и через 4 недели после (справа) CAR-T-клеточной терапии (через 1 неделю после завершения радиотерапии). На Фиг. 2В показаны поля ионизирующего излучения. Обычным образом разделенную на дозы радиотерапию применяли к грудному отделу позвоночника (T1 - T8) в течение 5 дней, а затем ко всему головному мозгу до С2 в течение 5 дней. Общая доза составляла 2000 сГр в 5 разовых дозах на каждый участок.

На Фиг. 3А-3С показано, что содержание дополнительных маркеров воспаления повышено в ответ на CAR-T-клеточную терапию в сочетании с радиотерапией. На Фиг. 3А показаны результаты для ферритина. На Фиг. 3В показаны результаты для D-димера. На Фиг. 3С показаны результаты для IL-10.

На Фиг. 4 показано, что CAR-T-клетки размножались и сохранялись после начала снижения высокой дозы стероидов и в течение всего периода радиотерапии. Трансген CAR, обнаруженный методом ПЦР в периферической крови.

На Фиг. 5 показана персистенция CAR-T-клеток примерно во время расширения клональности TCR и СВЦ-подобных результатов после РТ. CAR-T-клетки в крови пациента оценивали через 5 недель после CAR-T-клеточной терапии методом проточной цитометрии с флуорофор-меченым антителом, узнающим суррогатный маркер трансдукции, который также экспрессируется вектором CAR. Дискриминационное окно при проведении проточной цитометрии мононуклеарных клеток периферической крови было установлено на жизнеспособные CD3⁺ клетки. Красной рамкой выделены клетки, положительные по маркеру трансдукции (9,3% циркулирующих Т-клеток). Примечательно, что эти персистентные генетически модифицированные Т-клетки преимущественно представляли собой CD8⁺ клетки.

На Фиг. 6 показан репертуар TCR в костном мозге, отражающий таковой в периферической крови. Оценивали репертуар TCR в костном мозге и мононуклеарных клетках периферической крови из одной и той же временной точки. Разнообразие TCR сравнивали с использованием индекса перекрытия Мориситы (C_D).

На Фиг. 7 показано, что добавление радиотерапии к CAR-T-клеточной терапии приводило к увеличению разнообразия репертуара TCR с течением времени. Тепловая карта индексов перекрытия Мориситы (C_D) показывает степень сходства с репертуаром TCR из образцов периферической крови с течением времени. Индекс находится в диапазоне от 0 (без перекрытия с клонотипами TCR) до 1 (все клонотипы TCR встречаются в одинаковых пропорциях в обоих образцах).

На Фиг. 8 показано, что экспрессированные на высоком уровне исходные клоны TCR не размножались после введения CAR-T-клеток и применения радиотерапии. Частота встречаемости подгруппы TCR, включающей клоны TCR с исходно $>2\%$ частотой встречаемости, показана с течением времени.

7. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение генетически модифицированных клеток и применение ионизирующего излучения для субъектов, имеющих заболевание или состояние. Клетки генетически модифицированы для экспрессии одного или более рекомбинантных рецепторов, например, химерных антигенных рецепторов (CAR).

Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены лишь для организационных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие описанное изобретение.

Для ясности изложения, и не в порядке ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы:

- 7.1. Определения;
- 7.2. Способы лечения с использованием генетически модифицированных клеток и ионизирующего излучения;
- 7.3. Рекомбинантные рецепторы, экспрессируемые клетками;
- 7.4. Генетически модифицированные клетки и способы получения клеток;
- 7.5. Композиции и препараты генетически модифицированных клеток;
- 7.6. Введение доз генетически модифицированных клеток;
- 7.7. Радиотерапия;
- 7.8. Применение радиотерапии;
- 7.9. Уменьшение тяжести заболевания, эффективность и выживаемость; и
- 7.10. Наборы.

7.1. Определения

Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в данной области.

Используемый в настоящем документе термин «примерно», или «приблизительно», означает «в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения», при определении специалистом в данной области, что будет частично зависеть от того, каким образом измеряют или определяют значение, то есть, от ограничений системы измерения. Например, «примерно» может означать «в пределах 3 или более 3 стандартных отклонений», согласно практике в данной области. Альтернативно, «примерно» может означать диапазон до 20%, например, до 10%, до 5% или до 1%, от заданного значения. Альтернативно, особенно в случае биологических систем или процессов, термин может означать «в пределах порядка величины», например, в пределах 5-кратного или 2-кратного значения.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится не только к интактным молекулам антитела, но также к фрагментам молекул антител, которые сохраняют способность к связыванию иммуногена. Такие фрагменты также хорошо известны в данной области и регулярно используются как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, используемый в настоящем документе термин «антитело» относится не только к интактным молекулам антитела, но также к хорошо известным активным фрагментам $F(ab')_2$ и Fab. Фрагменты $F(ab')_2$ и Fab, которые лишены фрагмента Fc интактного антитела, быстрее выводятся из циркуляции, и могут иметь меньшее неспецифическое связывание с тканями, чем интактное антитело (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Описанные в настоящем документе антитела включают цельные нативные антитела, биспецифические антитела; химерные антитела; Fab, Fab', одноцепочечные фрагменты V-области (scFv), слитые полипептиды и необычные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно называемой в настоящем документе V_H) и константной области (C_H) тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, $CH1$, $CH2$ и $CH3$. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно называемой в настоящем документе V_L) и константной области легкой цепи C_L . Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Используемый в настоящем документе термин «CDR» относится к аминокислотным последовательностям определяющей комплементарность области антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. См. например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Как правило, антитела содержат по три CDR, или области CDR, в переменных областях тяжелой цепи и легкой цепи. CDR обеспечивают большинство контактных остатков для связывания антитела с антигеном или эпитопом. В некоторых вариантах осуществления границы областей CDR определяют с использованием системы Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth

Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В некоторых вариантах осуществления границы областей CDR определяют с использованием системы нумерации Chothia (Chothia et al., J Mol Biol. (1987) 196:901-17). В некоторых вариантах осуществления границы областей CDR определяют с использованием системы нумерации AbM (Abhinandan et al., Mol. Immunol. 2008, 45, 3832-3839). В некоторых вариантах осуществления границы областей CDR определяют с использованием системы нумерации IMGT (доступной по сетевому адресу <http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/IMGTIGVLSuperfamily.html>, <http://www.imgt.org/IMGTindex/numbering.php>).

Используемый в настоящем документе термин «одноцепочечный переменный фрагмент», или «scFv», означает слитый белок из переменных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулина, ковалентно связанных в форме гетеродимера $V_H::V_L$. V_H и V_L либо связаны напрямую, либо соединены кодирующим пептид линкером (например, из 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L . Линкер, как правило, богат остатками глицина для гибкости, а также серина или треонина для растворимости.

Используемый в настоящем документе термин «линкер» означает функциональную группу (например, химическую или полипептидную), которая ковалентно связывает два или более полипептидов, или нуклеиновых кислот, соединяя их друг с другом. Используемый в настоящем документе термин «пептидный линкер» означает одну или более аминокислот, которые используют для связывания вместе двух белков (например, связывания доменов V_H и V_L). Несмотря на удаление константных областей и введение линкера, белки scFv сохраняют специфичность оригинального иммуноглобулина. Антитела, представляющие собой одноцепочечный полипептид Fv, могут быть экспрессированы с нуклеиновой кислоты, включающей кодирующие V_H и V_L последовательности, как описано в публикации Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988). Смотри также патенты США №№ 5091513, 5132405 и 4956778; а также патентные публикации США №№ 20050196754 и 20050196754. Описаны антагонистические scFv, обладающие ингибирующей активностью (смотри, например, Zhao et al., Hybridoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40). Описаны агонистические scFv, обладающие стимулирующей активностью (смотри, например, Peter et al., J Biochem 2003 25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66).

Используемый в настоящем документе термин «F(ab)» означает фрагмент структуры антитела, который связывает антиген, но является одновалентным и лишен Fc-фрагмента, например, при расщеплении антитела ферментом папаином образуются два

F(ab)-фрагмента и Fc-фрагмент (например, константная область тяжелой (H) цепи; Fc-область, которая не связывает антиген).

Используемый в настоящем документе термин «F(ab')₂» означает фрагмент антитела, образующийся при расщеплении пепсином целого IgG антитела, при этом данный фрагмент имеет две антигенсвязывающие (ab') области (двухвалентный), где каждая (ab') область содержит две отдельные аминокислотные цепи, часть H-цепи и легкую (L) цепь, связанные S-S связью, для связывания антигена, и где оставшиеся фрагменты H-цепи связаны вместе. Фрагмент «F(ab')₂» может быть расщеплен на два отдельных фрагмента Fab'.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» означает любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, вирус, вирион и так далее, который способен к репликации, будучи связан с надлежащими контрольными элементами, и который может переносить генные последовательности в клетки. Таким образом, термин охватывает клонирующие и экспрессионные векторы, а также вирусные векторы и плазмидные векторы. В некоторых вариантах осуществления «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную продвигать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор в виде структуры самореплицирующейся нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называют «экспрессионными векторами».

Используемый в настоящем документе термин «экспрессионный вектор» означает рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, то есть рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую нужную кодирующую последовательность и соответствующие нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Нуклеотидные последовательности, необходимые для экспрессии в прокариотах, как правило, включают промотор, оператор (необязательно) и сайт связывания рибосомы, часто наряду с другими последовательностями. В эукариотических клетках, как известно, используются промоторы, энхансеры, а также сигналы терминации и полиаденилирования.

Используемый в настоящем документе термин «аффинность» означает меру прочности связывания. Аффинность может зависеть от близости стереохимического соответствия между связывающими областями антитела и антигенными детерминантами, от размера площади контакта между ними и/или от распределения заряженных и гидрофобных групп. Используемый в настоящем документе термин «аффинность» также включает термин «авидность», который означает прочность связи антиген-антитело после образования обратимых комплексов. Методы расчета аффинности антитела для антигена известны в данной области, включая, но без ограничения, различные эксперименты по связыванию антигена, например, функциональные анализы (например, анализ методом

проточной цитометрии).

«По существу идентичные», или «по существу гомологичные», означает, что полипептид или молекула нуклеиновой кислоты демонстрирует по меньшей мере примерно 50% гомологию или идентичность с эталонной аминокислотной последовательностью (например, любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе) или нуклеотидной последовательностью (например, любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления такая последовательность является на по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 99% или по меньшей мере примерно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, используемой для сравнения.

Идентичность последовательностей можно количественно определять с использованием программ анализа последовательностей (например, пакета программ для анализа последовательностей от Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, программ BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX). Такая программа сопоставляет идентичные или сходные последовательности путем присвоения степеней гомологии различным заменам, делециям и/или другим модификациям. Консервативные замены, как правило, включают замены внутри следующих групп: глицин, аланин, валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин. В качестве иллюстративного подхода к определению степени идентичности можно использовать программу BLAST, с оценкой вероятности от e^{-3} до e^{-100} , указывающей на близкое родство последовательностей.

Используемый в настоящем документе термин «заболевание» означает любое состояние, заболевание или нарушение, которое нарушает, или препятствует нормальной функции клетки, ткани или органа, например, неоплазию и инфицирование клетки патогеном.

Используемый в настоящем документе термин «модулировать» означает положительно или отрицательно изменять. Иллюстративные модуляции включают изменение на примерно 1%, примерно 2%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 25%, примерно 50%, примерно 75% или примерно 100%.

Используемый в настоящем документе термин «увеличивать» означает положительно изменять на по меньшей мере примерно 5%. Изменение может составлять примерно 5%, примерно 10%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 50%, примерно 75%, примерно 100% или более.

Используемый в настоящем документе термин «уменьшать» означает отрицательно изменять на по меньшей мере примерно 5%. Изменение может составлять

примерно 5%, примерно 10%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 50%, примерно 75% или даже примерно 100%.

Термины «выделенный», «очищенный» или «биологически чистый» относятся к материалу, свободному в той или иной степени от компонентов, которые обычно сопутствуют ему в его естественном состоянии. Термин «выделять» относится к степени отделения от исходного источника или окружения. Термин «очищать» относится к степени отделения, которая выше, чем в случае выделения. «Очищенный» или «биологически чистый» белок является в достаточной степени свободным от других материалов, так что никакие примеси не оказывают существенного влияния на биологические свойства белка или не вызывают иные неблагоприятные последствия. То есть, нуклеиновая кислота или пептид являются очищенными, если они в значительной степени свободны от клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды, в случае получения методами рекомбинантных ДНК, либо химических предшественников или других химических реагентов, в случае химического синтеза. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют методами аналитической химии, например, методом электрофореза в полиакриламидном геле или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Термин «очищенные» может означать, что нуклеиновая кислота или белок образует практически одну полосу при электрофорезе в геле. В случае белка, который может быть подвергнут модификациям, например, фосфорилированию или гликозилированию, разные модификации могут приводить к разным выделенным белкам, которые могут быть очищены отдельно.

Используемый в настоящем документе термин «выделенная клетка» означает клетку, которая отделена от молекулярных и/или клеточных компонентов, которые естественным образом сопровождают клетку.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий домен» означает домен, способный специфически связывать конкретную антигенную детерминанту или группу антигенных детерминант, имеющихся на клетке.

Используемый в настоящем документе термин «новообразование» означает заболевание, характеризующееся патологической пролиферацией клетки или ткани, и ее последующей миграцией или инвазией в другие ткани или органы. Рост новообразования, как правило, является неконтролируемым и прогрессирующим, и происходит в условиях, которые не вызывают, или вызывают прекращение, размножения нормальных клеток. Новообразование может поражать различные типы клеток, тканей или органов, включая, но без ограничения, орган, выбранный из группы, состоящей из мочевого пузыря, кости, мозга, молочной железы, хряща, глии, пищевода, фаллопиевой трубы, желчного пузыря, сердца, кишечника, почки, печени, легкого, лимфатического узла, нервной ткани, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, скелетной мышцы, кожи, спинного мозга, селезенки, желудка, яичек, тимуса, щитовидной железы, трахеи, мочеполового тракта, мочеточников, уретры, матки и влагалища, либо ткани или клетки из них. Новообразования включают раковые заболевания, такие как саркомы, карциномы

или плазмацитомы (злокачественные опухоли из плазматических клеток).

Используемый в настоящем документе термин «узнавать» означает избирательно связывать мишень. Т-клетка, которая узнает опухоль, может экспрессировать CAR, который связывает опухолевый антиген.

Используемый в настоящем документе термин «специфически связывает» относится к полипептиду, или его фрагменту, который узнает и связывает интересующую биологическую молекулу (например, полипептид), но который практически не узнает и не связывает другие молекулы в образце, например, биологическом образце, который естественным образом содержит раскрытый в настоящем документе полипептид.

Используемый в настоящем документе термин «опухолевый антиген» охватывает опухоль-специфический антиген (ОСА), который присутствует только на опухолевых клетках и ни на каких других клетках, а также опухоль-ассоциированный антиген (ОАА), который присутствует на некоторых опухолевых клетках, а также некоторых нормальных клетках. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой ОСА. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген уникальным или отличающимся образом экспрессируется на опухолевой клетке, в сравнении с нормальной или не неопластической клеткой. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген включает любой полипептид, экспрессируемый опухолью, который способен активировать или индуцировать иммунный ответ через узнающий антиген рецептор (например, мезотелин), или способен подавлять иммунный ответ посредством связывания рецептор-лиганд (например, CD47, PD-L1/L2, B7,1/2).

Термины «содержит», «содержащий» должны иметь широкое значение, которое им приписывается в американском патентном законодательстве, и могут означать «включает», «включающий» и тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «лечащий») означает полное или частичное облегчение или ослабление заболевания или состояния, или нарушения, или симптома, неблагоприятного явления или исхода, или фенотипа, связанного с ним. Желательные эффекты лечения включают, но без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. Термины не подразумевают полного излечения заболевания или полного устранения какого-либо симптома, или влияния(й) на все симптомы или исходы.

Используемый в настоящем документе термин «задержка развития заболевания» означает отсрочку, затруднение, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или отдаление развития заболевания (например, рака). Эта задержка может иметь разную продолжительность в зависимости от истории болезни и/или от человека, получающего лечение. Как очевидно для специалиста в данной области, достаточная или

значительная задержка может, по сути, включать предотвращение, в случае которого у человека не развивается заболевание. Например, поздняя стадия рака, например, развитие метастазов, может быть отсрочена.

Используемый в настоящем документе термин «предотвращение» включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложенные клетки и композиции используют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

Используемый в настоящем документе термин «подавление» функции или активности означает снижение функции или активности в сравнении с аналогичными условиями, но без интересующего условия или параметра, или, альтернативно, в сравнении с другим условием. Например, клетки, подавляющие рост опухоли, снижают скорость роста опухоли в сравнении со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество» средства, например, фармацевтического препарата, клеток или композиции, в контексте введения, означает количество, эффективное, в необходимых дозах/количествах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

«Терапевтически эффективное количество» средства, например, фармацевтического препарата или клеток, означает количество, эффективное, в необходимых дозах/количествах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела субъекта, а также популяции введенных клеток. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

«Профилактически эффективное количество» означает количество, эффективное, в необходимых дозах/количествах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют для субъектов до начала развития, или на ранней стадии, заболевания, профилактически эффективное количество будет меньшим, чем терапевтически эффективное количество. В контексте меньшей опухолевой нагрузки профилактически эффективное количество в некоторых аспектах будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

«Индивидуум», или «субъект», по настоящему изобретению является позвоночным, таким как человек или не являющееся человеком животное, например, млекопитающее. Млекопитающие включают, но без ограничения, людей, приматов,

сельскохозяйственных животных, спортивных животных, грызунов и домашних животных. Неограничивающие примеры субъектов-животных, не являющихся людьми, включают грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; кроликов; собак; кошек; овец; свиней; коз; крупный рогатый скот; лошадей и приматов, таких как человекообразные и не человекообразные обезьяны. В некоторых вариантах осуществления примат представляет собой не человекообразную обезьяну или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной, и может быть любого подходящего возраста, включая младенца, ребенка, подростка, взрослого и пожилого субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является отличное от примата млекопитающее, такое как грызун.

При использовании в настоящем документе форма единственного числа терминов включает соответствующую форму множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, «один» означает «по меньшей мере один» или «один или более».

Используемый в настоящем документе термин «композиция» означает любую смесь из двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водную композицию, неводную композицию или любое их сочетание.

В тексте настоящей заявки различные аспекты заявленного изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено лишь для удобства и краткости, и не должно толковаться как негибкое ограничение объема заявленного изобретения. Соответственно, описание диапазона должно рассматриваться как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, если указан диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение от верхнего до нижнего предела этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне, входит в заявленное изобретение. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, и также входят в объем заявленного изобретения, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой один, или оба, из этих включенных пределов, также входят в объем заявленного изобретения. Это применимо независимо от ширины диапазона.

7.2. Способы лечения с использованием генетически модифицированных клеток и ионизирующего излучения

Описанное в настоящем документе изобретение основано на том открытии, что генетически модифицированные клетки (например, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клетки) могут быть использованы в сочетании с источником ионизирующего излучения, например, внешним источником излучения или радиоизотопом, таким как радиофармацевтическое средство, для обеспечения терапевтически эффективных противораковых эффектов.

Кроме того, неожиданный синергический эффект между генетически модифицированными клетками и ионизирующим излучением приводит к усиленному, или синергическому, терапевтическому эффекту, где комбинированный эффект превышает аддитивный эффект от применения клеток и ионизирующего излучения, в каждом случае в терапевтически эффективной дозе. Эти наблюдения подтверждают, что генетически модифицированные клетки (например, экспрессирующие химерный CAR T-клетки) могут быть использованы в сочетании с радиотерапией для лечения заболеваний или нарушений (например, рака).

Настоящее изобретение основано по меньшей мере на том факте, что сочетание первой лечебной процедуры, включающей введение эффективного количества генетически модифицированных клеток (например, CAR-экспрессирующих T-клеток), как описано в настоящем документе, и второй лечебной процедуры с использованием воздействия ионизирующим излучением, как описано в настоящем документе, для субъекта, который нуждается в этом, может обеспечивать а) синергический абскопальный эффект, терапевтически эффективные противораковые эффекты, отсроченный или ослабленный СВЦ-подобный ответ и/или системное размножение нового клона T-клеточного рецептора (TCR) (например, в периферической крови).

Предложены способы лечения заболеваний или состояний, включая различные виды рака и опухолей. В некоторых вариантах осуществления способ включает применение (а) ионизирующего излучения и (b) клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, спроектированные для узнавания и/или специфического связывания молекулы (например, антигена), связанной с заболеванием или состоянием, подлежащим лечению, и приводит к ответу, такому как иммунный ответ, против такой молекулы после связывания такой молекулы. Рекомбинантные рецепторы включают химерные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR), и другие трансгенные антигенные рецепторы, включая трансгенные T-клеточные рецепторы (TCR).

В некоторых вариантах осуществления способы обладают преимуществами при лечении субъектов, имеющих определенные заболевания или состояния, такие как рак (например, множественная миелома), за счет начала применения радиотерапии вскоре после получения субъектом клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (называемых «экспрессирующие рекомбинантный рецептор клетки»). Например, в некоторых вариантах осуществления способ включает начальное применение радиотерапии не позднее, чем через примерно две недели после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает начальное применение радиотерапии не позднее, чем через примерно одну неделю после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает начальное применение радиотерапии через срок от примерно 5 дней до примерно 10 дней после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает начальное применение радиотерапии через примерно 5

дней после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает начальное применение радиотерапии через 6 дней после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта не было рецидива в процессе, или непосредственно перед началом, применения радиотерапии.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток или композиции, содержащей клетки, в ткань или клетку субъекта, такого как субъект, страдающий от, имеющий риск развития, или предположительно страдающий от, заболевания, состояния или нарушения. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие рекомбинантный рецептор клетки или композицию, содержащую их, вводят субъекту, имеющему конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, например, путем адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие рекомбинантный рецептор клетки или композиция, содержащая их, введенные субъекту, такому как субъект, страдающий от, или имеющий риск развития, заболевания или состояния, облегчают один или более симптомов заболевания или состояния.

Заболевание или состояние, которое подвергают лечению, как правило, является таким, с которым, и/или с этиологией которого, ассоциирована экспрессия антигена-мишени, например, при котором антиген вызывает, усугубляет или иным образом влияет на, такое заболевание, состояние или нарушение, либо просто является маркером или избыточно экспрессируется, или уникальным образом экспрессируется на клетках, связанных с заболеванием или нарушением. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать, но без ограничения, заболевания или состояния, связанные со злокачественностью или трансформацией клеток (например, рак). Иллюстративные антигены, включающие антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, описаны выше. В некоторых вариантах осуществления CAR или TCR специфически связывает антиген, ассоциированный с заболеванием или состоянием.

В число заболеваний, состояний и нарушений входят опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные новообразования (например, различные виды рака крови) и меланомы, включая локализованные и метастатические опухоли. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет инфекционное заболевание, такое как инфекция, вызванная вирусом или другим патогеном, например, HIV, HCV, HBV, CMV, и паразитарное заболевание.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль, рак, злокачественную опухоль, новообразование, либо другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, но не ограничиваются ими, различные виды рака крови (включая, но без ограничения, лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ),

неходжскинскую лимфому (например, рефрактерную фолликулярную лимфому), макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому Ходжкина, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, лимфому из клеток мантийной зоны и медленно растущую В-клеточную лимфому), В-клеточные злокачественные новообразования, рак толстого кишечника, рак легкого, рак печени, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак кожи, меланому, рак костей, рак головного мозга, рак яичника, эпителиальные формы рака, почечноклеточный рак, аденокарциному поджелудочной железы, карциному шейки матки, колоректальный рак, глиобластому, нейробластому, саркому Юинга, медуллобластому, остеосаркому, синовиальную саркому и/или мезотелиому. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак крови. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, но без ограничения, вирусные, ретровирусные, бактериальные и вызываемые простейшими инфекции, иммунодефицит, инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), аденовирусом, вирусом ВК полиомы. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (РА), диабет I типа, системная красная волчанка (СКВ), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или состояние, связанное с трансплантацией.

В некоторых вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, выбран из группы, состоящей из BCMA, тирозинкиназного рецептора-сироты ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена вируса гепатита В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4, FBP, эмбрионального ацетилхолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, KDR, легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-молекулы клеточной адгезии, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простатического специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, а также MAGE A3, CE7, антигена 1 опухоли Вильмса (WT-1), циклина (например, циклина A1 (CCNA1)), биотинилированных молекул, молекул, экспрессируемых HIV, HCV, HBV и другими патогенами. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой BCMA.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы могут приводить к увеличению общей выживаемости субъектов в случае, когда субъекты имеют конкретный уровень тяжести заболевания в момент получения лечения, например, морфологическое

или минимальное заболевание.

7.3. Рекомбинантные рецепторы, экспрессируемые клетками

В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые в способах или вводимые в связи с предложенными способами, содержат или генетически модифицированы для содержания рекомбинантного рецептора (или генетически модифицированного рецептора), например, генетически модифицированного антигенного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). Также предложены популяции таких клеток, композиции, содержащие такие клетки и/или обогащенные такими клетками, например, в которых клетки определенного типа, такие как Т-клетки, или CD8⁺ или CD4⁺ клетки, обогащены или отобраны. В число композиций входят фармацевтические композиции и препараты для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. Также предложены терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам, например, пациентам, в соответствии с предложенными способами.

В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более нуклеиновых кислот, введенных методами генетической инженерии, и вследствие этого экспрессируют рекомбинантные или генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют, сначала стимулируя клетки, например, путем объединения их со стимулом, индуцирующим ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, например, что определяют на основе экспрессии цитокина или маркера активации, а затем проводя трансдукцию активированных клеток и размножение их в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

Клетки, как правило, экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как антигенные рецепторы, включая функциональные не-TCR антигенные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR), и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR).

7.3.1. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

В некоторых вариантах осуществления предложенных способов и вариантов применения рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, обеспечивающий специфичность для антигена (например, опухолевого антигена), и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть активирующего внутриклеточного домена, такого как Т-клеточный активирующий домен, обеспечивающую основной сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующую сигнальную область для облегчения эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные рецепторы, введенные методами генетической инженерии в иммунные

клетки, могут модулировать активность Т-клеток и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференциацию или гомеостаз Т-клеток, результатом являются генетически модифицированные клетки с усовершенствованной продолжительностью жизни, выживаемостью и/или персистенцией *in vivo*, например, для использования в способах адоптивной клеточной терапии.

Иллюстративные антигенные рецепторы, включая CAR, и способы генетической модификации и введения таких рецепторов в клетки включают те, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок с номерами WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентных заявок США с номерами US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, и Европейской патентной заявке с номером EP2537416, и/или те, которые описаны в публикациях Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные рецепторы включают CAR, описанный в патенте США № 7446190, и те, которые описаны в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, раскрытые в любой из вышеупомянутых публикаций, например, WO2014031687, US8339645, US7446179, US2013/0149337, патенте США № 7446190, патенте США № 8389282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701 и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Смотри также WO2014031687, US8339645, US7446179, US2013/0149337, патент США № 7446190 и патент США № 8389282.

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, как правило, содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как фрагмент молекулы антитела, как правило, переменную область тяжелой цепи (V_H) и/или переменную область легкой цепи (V_L) антитела. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. ScFv может представлять собой человеческий, мышинный или гуманизированный scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой человеческий scFv. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит Fab, который, необязательно, является сшитым. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит $F(ab)_2$. В некоторых вариантах осуществления любая из вышеуказанных молекул может содержаться в слитом белке с гетерологичной последовательностью, образуя внеклеточный антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления scFv идентифицируют путем скрининга библиотеки scFv в фаге с использованием слитого белка антиген-Fc. ScFv может быть получен от мыши, несущей человеческие гены V_L и/или V_H . ScFv также может быть заменен тяжелой цепью верблюдовых (например, VHH от верблюда, ламы и так далее) или частично природным лигандом для клеточного

поверхностного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления антиген, на который направлен рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген избирательно экспрессируется или избыточно экспрессируется на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, например, опухолевых или патогенных клетках, в сравнении с нормальными или не являющимися мишенью клетками или тканями. В некоторых вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на генетически модифицированных клетках. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой опухолевый антиген или антиген патогена.

В некоторых вариантах осуществления антигены, на которые направлены рецепторы, включают, но без ограничения, BCMA, рецептор, связанный с G-белками (например, семейства C группы 5 рецепторов, связанных с G-белками, член D (GPC5D)), подобный Fc-рецептору белок 5 (FcRL5), тирозинкиназный рецептор-сироту ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA, поверхностный антиген вируса гепатита В, антифолатный рецептор, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4, FBP, эмбриональный ацетихолиновый рецептор, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкую цепь каппа, Lewis Y, L1-молекулу клеточной адгезии, MAGE-A1, мезотелин, MUC1, MUC16, PSCA, лиганды NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), простатический специфический антиген, PSMA, Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, эфрин B2, CD123, c-Met, GD-2, а также MAGE A3, CE7, антиген 1 опухоли Вильмса (WT-1), циклин (например, циклин A1 (CCNA1)) и биотинилированные молекулы. В некоторых вариантах осуществления антигены, на которые направлены рецепторы, включают, но без ограничения, молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV и другими патогенами.

В некоторых вариантах осуществления CAR связывает патоген-специфический антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR является специфичным для вирусных антигенов (например, HIV, HCV, HBV и так далее), бактериальных антигенов и/или паразитарных антигенов.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор (например, CAR) направлен на BCMA (например, человеческий BCMA). В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению экспрессируют BCMA-направленный CAR, раскрытый в публикации международной патентной заявки № WO2016/090320, полное содержание которой включено посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетки по настоящему изобретению экспрессируют BCMA-направленный CAR, раскрытый в публикации Smith et al., *Molecular Therapy* (2018);26(6):1447-1456, полное содержание которой включено посредством ссылки. В некоторых вариантах

осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ВСМА-направленного CAR содержит антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), раскрытый в WO2016/090320 и WO2016/090327, полное содержание которых включено посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи («V_H»), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; CDR1 вариабельной области легкой цепи («V_L»), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации Kabat. SEQ ID No: 1-6 приведены ниже.

SYWIG [SEQ ID NO: 1]

IIYPGDS DTRYSPSFQG [SEQ ID NO: 2]

YSGSFDN [SEQ ID NO: 3]

SGTSSNIGSHSVN [SEQ ID NO: 4]

TNNQRPS [SEQ ID NO: 5]

AAWDGSLNGLV [SEQ ID NO: 6]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации Chothia. SEQ ID NO: 7 и 8 приведены ниже.

GYSFTSY [SEQ ID NO: 7]

YPGDS D [SEQ ID NO: 8]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9; V_H CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации AbM. SEQ ID No: 9 и 10 приведены ниже.

GYSFTSYWIG [SEQ ID NO: 9]

IIYPGDS DTR [SEQ ID NO: 10]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 81%, по меньшей мере примерно 82%, по меньшей мере примерно 83%, по меньшей мере примерно 84%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 86%, по меньшей мере примерно 87%, по меньшей мере примерно 88%, по меньшей мере примерно 89%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 91%, по меньшей мере примерно 92%, по меньшей мере примерно 93%, по меньшей мере примерно 94%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или по меньшей мере примерно 100% гомологична или идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11. SEQ ID NO: 11 приведена ниже.

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG
DSDTRYSPSFQGHVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARYSGSFDN WGQGT LVT
VSS [SEQ ID NO: 11]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 81%, по меньшей мере примерно 82%, по меньшей мере примерно 83%, по меньшей мере примерно 84%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 86%, по меньшей мере примерно 87%, по меньшей мере примерно 88%, по меньшей мере примерно 89%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 91%, по меньшей мере примерно 92%, по меньшей мере примерно 93%, по меньшей мере примерно 94%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или по меньшей мере примерно 100% гомологична или идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий

домен, содержащий V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. SEQ ID NO: 12 приведена ниже.

SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWKYQQLPGTAPKLLIYTNNQR
PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSNLGLVFGGGTKLTVLG
[SEQ ID NO: 12]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации Kabat. SEQ ID No: 13-18 приведены ниже.

DYYVY [SEQ ID NO: 13]

WINPNSGGTNYAQKFQG [SEQ ID NO: 14]

SQRDGYMDY [SEQ ID NO: 15]

TGTSSDVG [SEQ ID NO: 16]

EDSKRPS [SEQ ID NO: 17]

SSNTRSSTLV [SEQ ID NO: 18]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации Chothia. SEQ ID No: 19 и 20 приведены ниже.

GYTFIDY [SEQ ID NO: 19]

NPNSGG [SEQ ID NO: 20]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:

17; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации AbM. SEQ ID No: 21 и 22 приведены ниже.

GYTFIDYYVY [SEQ ID NO: 21]

WINPNSGGTN [SEQ ID NO: 22]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_H, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 81%, по меньшей мере примерно 82%, по меньшей мере примерно 83%, по меньшей мере примерно 84%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 86%, по меньшей мере примерно 87%, по меньшей мере примерно 88%, по меньшей мере примерно 89%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 91%, по меньшей мере примерно 92%, по меньшей мере примерно 93%, по меньшей мере примерно 94%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или по меньшей мере примерно 100% гомологична или идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23. SEQ ID NO: 23 приведена ниже.

EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCASGYTFIDYYVYWMRQAPGQGLESMDGWINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLSDDTAMYYCARQRDGYMDYWGG
GTLVTVSS [SEQ ID NO: 23]

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_L, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 81%, по меньшей мере примерно 82%, по меньшей мере примерно 83%, по меньшей мере примерно 84%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 86%, по меньшей мере примерно 87%, по меньшей мере примерно 88%, по меньшей мере примерно 89%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 91%, по меньшей мере примерно 92%, по меньшей мере примерно 93%, по меньшей мере примерно 94%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или по меньшей мере примерно 100% гомологична или идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24. SEQ ID NO: 24 приведена ниже.

QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAPKLMIYEDSKRPSGVS
NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG [SEQ ID NO:

24]

В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела из рекомбинантного рецептора, например, CAR, дополнительно содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, и/или CH1/CL и/или Fc-область. В некоторых вариантах осуществления константная область, или ее часть, происходит из человеческого IgG, такого как IgG4 или IgG1. В некоторых вариантах осуществления часть константной области служит в качестве спейсерной области между узнающим антиген компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, обеспечивающую повышенную реактивность клетки после связывания антигена, в сравнении с отсутствием спейсера. Иллюстративные спейсеры включают, но без ограничения, те, которые описаны в публикации Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, публикации международной патентной заявки с номером WO2014031687, патенте США № 8822647 или публикации патентной заявки № US2014/0271635.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен связан непосредственно или опосредованно с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен, связывающий внеклеточный антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. Например, в некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связан с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, например, сигнальными компонентами, которые имитируют активацию через комплекс антигена с рецептором, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой клеточный поверхностный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбран, или модифицирован путем аминокислотной замены, так, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же самых, или иных, поверхностных мембранных белков, с целью сведения к минимуму взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получен либо из естественного, либо из синтетического источника. В некоторых вариантах осуществления, если источник является естественным, домен получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают те, которые получены из (то есть, содержат по меньшей мере трансмембранную область(и)) альфа, бета или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим. В некоторых вариантах осуществления синтетический трансмембранный домен содержит

преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых вариантах осуществления триплет из фенилаланина, триптофана и валина находится на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляется за счет линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(доменов). В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный фрагмент CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранный фрагмент CD8.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен могут быть связаны непосредственно или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны при помощи спейсера, такого как любой спейсер, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор (например, CAR) содержит внеклеточный фрагмент молекулы, из которой получен трансмембранный домен, например, внеклеточный фрагмент CD28 или внеклеточный фрагмент CD8.

В число внутриклеточных сигнальных доменов входят те, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через естественный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором, и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления имеется короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий остатки глицина и серина, например, дублет глицин-серин, который образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

В некоторых вариантах осуществления Т-клеточная активация описана как опосредованная цитоплазматическими сигнальными последовательностями двух видов: теми, которые инициируют антиген-зависимую основную активацию через TCR (основные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют независимо от антигена образом, обеспечивая вторичный, или костимулирующий, сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или оба из таких сигнальных компонентов.

Рекомбинантный рецептор, например, CAR, как правило, содержит по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит основную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует основную активацию комплекса TCR. Основные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы, или ITAM. Примеры ITAM-содержащих основных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают

те, которые получены из дзета-цепи CD3, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внутриклеточный компонент комплекса TCR, например, CD3-цепь TCR, который опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, дзета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связан с одним или более клеточными сигнальными модулями. В некоторых вариантах осуществления клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточный сигнальный домен CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, например, CAR, также содержит часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых вариантах осуществления CAR или другой химерный рецептор содержит химерную молекулу из CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc-рецептора γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления после связывания CAR или другого рекомбинантного рецептора цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления CAR индуцирует такую функцию Т-клетки, как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, например, секрецию цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления укороченный фрагмент внутриклеточного сигнального домена компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если он передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен, или домены, содержит цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых вариантах осуществления также цитоплазматические последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с такими рецепторами, инициируя передачу сигнала после связывания антигенного рецептора.

В контексте естественного TCR для полной активации, как правило, требуется не только сигнализация через TCR, но также и костимулирующий сигнал. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для стимуляции полной активации в CAR также включен компонент для генерирования вторичного или костимулирующего сигнала. В некоторых вариантах осуществления CAR не содержит компонент для генерирования костимулирующего сигнала. В некоторых вариантах осуществления дополнительный CAR экспрессируется в той же самой клетке и обеспечивает компонент для генерирования вторичного или костимулирующего сигнала.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит как активирующий, так и костимулирующий компоненты. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы, или его часть. Неограничивающие примеры костимулирующих молекул включают CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула представляет собой CD28. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула представляет собой 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления активирующий домен содержится в одном CAR, при этом костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, узнающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR включают активирующий или стимулирующий CAR и костимулирующий CAR, оба из которых экспрессируются на одной и той же клетке (смотри WO2014/055668). В некоторых вариантах осуществления клетки содержат один или более стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующий CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки также содержат ингибирующий CAR («iCAR», смотри Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine* (2013);5:215) в качестве CAR, узнающего антиген, отличный от антигена, ассоциированного, и/или специфического для заболевания или состояния, при этом активирующий сигнал, доставляемый через направленный на заболевание CAR, уменьшается или ингибируется при связывании ингибирующего CAR с его лигандом, например, для снижения нецелевых эффектов.

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

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит один или более, например, два или более, костимулирующих доменов и активирующий домен, например, основной активирующий домен, в цитоплазматической части. Иллюстративный CAR содержит внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор также содержит маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой антигенный рецептор, также содержат суррогатный маркер, такой как клеточный поверхностный маркер, который может быть использован для подтверждения трансдукции или генетической модификации клетки для экспрессии рецептора. В некоторых вариантах осуществления маркер включает весь, или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR или рецептора

эпидермального фактора роста, например, укороченный вариант такого клеточного поверхностного рецептора (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим последовательность линкера, например, последовательность расщепляемого линкера, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, последовательность линкера, могут быть такими, как описано в опубликованной патентной заявке № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (EGFRt), который, необязательно, связан с последовательностью линкера, такой как последовательность расщепляемого линкера T2A.

В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, клеточный поверхностный белок, не присутствующий естественным образом на Т-клетках или не присутствующий естественным образом на поверхности Т-клеток, или его часть. В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой не собственную молекулу, например, не собственный белок, то есть, белок, который не узнается как «собственный» иммунной системой хозяина, в организм которого клетки будут адоптивно перенесены.

В некоторых вариантах осуществления маркер не выполняет никакой терапевтической функции и/или не оказывает никакого влияния, а лишь используется в качестве маркера генетической модификации, например, для отбора клеток, успешно генетически модифицированных. В других вариантах осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, оказывающую иное желаемое воздействие, например, лиганд, с которым клетка будет взаимодействовать *in vivo*, например, костимулирующую молекулу или молекулу иммунных контрольных точек для усиления и/или подавления ответов клеток после адоптивного переноса и взаимодействия с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления CAR называют CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR первого поколения представляет собой CAR, обеспечивающий только индуцированный цепью CD3 сигнал после связывания антигена, например, он не содержит костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает основной сигнал и костимулирующий сигнал, например, CAR, содержащий костимулирующую сигнальную область, например, внутриклеточный сигнальный домен, или его часть, из костимулирующей молекулы, такой как CD28 или 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления CAR третьего поколения представляет собой CAR, который содержит несколько костимулирующих областей, например, внутриклеточные сигнальные домены из разных костимулирующих молекул (например, CD28 и 4-1BB).

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой, или включает, трансмембранный фрагмент CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный

сигнальный домен, содержащий сигнальный фрагмент CD28 или его функциональный вариант и сигнальный фрагмент CD3-дзета или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой, или включает, трансмембранный фрагмент CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный фрагмент 4-1BB или его функциональный вариант и сигнальный фрагмент CD3-дзета или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой, или включает, трансмембранный фрагмент CD8 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный фрагмент 4-1BB или его функциональный вариант и сигнальный фрагмент CD3-дзета или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления рецептор дополнительно содержит спейсер, содержащий часть молекулы Ig, например, молекулы Ig человека, например, шарнир Ig, например, шарнир IgG4, например, спейсер только из шарнира.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, в том числе scFv, спейсер, например, спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область и/или одна или более константных областей молекулы тяжелой цепи, например, содержащий шарнир Ig спейсер, трансмембранный домен, содержащий весь, или фрагмент трансмембранного домена из CD28, внутриклеточный сигнальный домен из CD28 и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело или его фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из содержащих шарнир Ig спейсеров, трансмембранный домен из CD28, внутриклеточный сигнальный домен из 4-1BB и сигнальный домен из CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело или его фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из содержащих шарнир Ig спейсеров, трансмембранный домен из CD8, внутриклеточный сигнальный домен из 4-1BB и сигнальный домен из CD3-дзета.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая такую конструкцию CAR, дополнительно содержит последовательность, кодирующую элемент проскока рибосомы T2A и/или последовательность tEGFR, например, после последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR), также могут быть генетически модифицированы для экспрессии укороченного EGFR (EGFRt) в качестве не иммуногенного селективного эпитопа (например, за счет введения конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные элементом переключения рибосомы T2A, для экспрессии двух белков с одной и той же конструкции), который затем может быть использован в качестве маркера для обнаружения таких клеток (смотри, например, патент США № 8802374).

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками,

введенными субъекту, как правило, узнают или специфически связывают молекулу, которая экспрессируется при заболевании, ассоциирована, и/или является специфической для подвергаемого лечению заболевания или состояния, или связанных с ним клеток. После специфического связывания молекулы, например, антигена, рецептор, как правило, передает иммуностимулирующий сигнал, например, ITAM-передаваемый сигнал, в клетку, тем самым стимулируя иммунный ответ, направленный на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют CAR, который специфически связывает антиген, экспрессируемый пораженной болезнью или ассоциированной с заболеванием или состоянием клеткой или тканью.

7.3.2. TCR

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные рецепторы включают рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный клон с высокой аффинностью для антигена-мишени (например, антигена рака) идентифицируют, выделяют из организма пациента и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для антигена-мишени был получен в трансгенных мышах, генетически модифицированных генами иммунной системы человека (например, системы человеческого лейкоцитарного антигена, или HLA). См. например, опухолевые антигены (смотри, например, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 и Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808). В некоторых вариантах осуществления используют дисплей в фаге для выделения TCR против антигена-мишени (смотри, например, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 и Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354).

В некоторых вариантах осуществления после получения Т-клеточного клона альфа- и бета-цепи TCR выделяют и клонируют в генный экспрессионный вектор. В некоторых вариантах осуществления гены альфа и бета TCR связаны последовательностью пептида проскока хромосомы пикорнавируса 2А, так что обе цепи экспрессируются совместно. В некоторых вариантах осуществления генетический перенос TCR осуществляют при помощи ретровирусных или лентивирусных векторов, или при помощи транспозонов (смотри, например, Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757; an Hackett et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683).

7.4. Генетически модифицированные клетки и способы получения клеток

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение субъекту, имеющему заболевание или состояние, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. Различные способы введения генетически модифицированных компонентов, например, рекомбинантных рецепторов, например, CAR или TCR, хорошо известны и могут быть использованы с предложенными способами и композициями. Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе путем вирусной, например, ретровирусной или лентивирусной,

трансдукции, при помощи транспозонов и методом электропорации.

В число клеток, экспрессирующих рецепторы и вводимых предложенными способами, входят генетически модифицированные клетки. Генетическая модификация, как правило, включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или генетически модифицированный компонент, в композицию, содержащую клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

7.4.1. Векторы и способы генной инженерии

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

В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса мышинных эмбриональных стволовых клеток (MESV), вируса мышинных стволовых клеток (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV) или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов получены из мышинных ретровирусов. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают те, которые получены из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы, как правило, являются амфотропными, это означает, что они способны инфицировать клетки хозяев нескольких биологических видов, включая человека. В одном варианте осуществления ген, который будет экспрессирован, заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5219740; 6207453; 5219740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

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

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки методом электропорации (смотри, например, Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). В

некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки методом транспозиции (смотри, например, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию с фосфатом кальция (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, трансфекцию, опосредованную катионными липосомами; бомбардировку микрочастицами вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

Другими подходами и векторами для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, являются те, которые описаны, например, в публикации международной патентной заявки № WO2014055668 и патенте США № 7446190.

В некоторых вариантах осуществления клетки (например, Т-клетки) могут быть трансфицированы либо в процессе, либо после размножения, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена нужного рецептора можно выполнять при помощи любого подходящего ретровирусного вектора, например. Затем популяцию генетически модифицированных клеток можно освобождать от исходного стимула (CD3/CD28 стимула, например), а затем стимулировать стимулом второго типа, например, через *de novo* введенный рецептор. Такой стимул второго типа может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/МНС, узнаваемого (перекрестно связывающегося) лиганда рецептора, введенного методами генной инженерии (например, естественного лиганда CAR), или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в каркасе нового рецептора (например, за счет узнавания константных областей в составе рецептора). Смотри, например, Cheadle et al., «Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy» *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).*

В некоторых случаях может быть использован вектор, который не нуждается в том, чтобы клетки (например, Т-клетки) были активированы. В некоторых таких случаях клетки могут быть отобраны и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть генетически модифицированы до, или после, культивирования клеток, и в некоторых случаях одновременно с культивированием или на протяжении по меньшей мере части культивирования.

В число дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов для введения, входят те, которые повышают эффективность терапии, например, путем повышения жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены, обеспечивающие генетический маркер для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки *in vivo* выживания или локализации; гены для повышения безопасности, например, придающие клеткам восприимчивость к отрицательному отбору *in vivo*, как описано в публикации Lupton S. D. et al., *Mol. u Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-

338 (1992); смотри также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 авторов Lupton et al., в которых описано применение бифункциональных селективных слитых генов, полученных в результате слияния доминантно положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером. Смотри, например, Riddell et al., патент США № 6040177, в колонках 14-17.

7.4.2. Клетки и подготовка клеток для генетической модификации

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, то есть, обычно не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученными из другого организма или клетки, например, обычно не встречающимися в клетке, подвергаемой генетической модификации, и/или в организме, из которого такая клетка была получена. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не имеют естественного происхождения, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе, включая нуклеиновую кислоту, которая содержит химерные сочетания нуклеиновых кислот, кодирующих разные домены из клеток нескольких разных видов.

Клетки, как правило, представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и, как правило, представляют собой человеческие клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки получены из крови, костного мозга, лимфы, или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки или клетку миелоидной линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетка лимфоидной линии дифференцировки выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, клетки - естественного киллера (NK), стволовой клетки, из которой могут дифференцироваться лимфоидные клетки. Стволовые клетки могут представлять собой мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку. Клетки, как правило, представляют собой первичные клетки, например, те, которые получены непосредственно от субъекта и/или получены от субъекта и заморожены. В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более подгрупп Т-клеток или клеток других типов, например, суммарные Т-клеточные популяции, $CD4^+$ клетки, $CD8^+$ клетки, и их субпопуляции, например, определяемые функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для дифференциации, способностью к экспансии, рециркуляции, локализации и/или персистенции, антигенной специфичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в определенном органе или компартменте, профилем секреции маркеров или цитокинов и/или степенью дифференциации. Применительно к субъекту, которого предстоит лечить,

клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В число способов входят стандартные способы. В некоторых вариантах осуществления, например, в случае стандартных технологий, клетки представляют собой плюрипотентные и/или мультипотентные, например, стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК). В некоторых вариантах осуществления способы включают получение клеток от субъекта, их подготовку, обработку, культивирование и/или генетическую модификацию и повторное введение тому же самому субъекту, до или после криоконсервирования.

В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой Т-клетки. Неограничивающие примеры подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или $CD4^+$, и/или $CD8^+$ Т-клеток включают необученные Т-клетки (T_N), Т-клетки - естественные киллеры, эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}), окончательно дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, мукоза-ассоциированные инвариантные Т-клетки (MAIT), регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки (например, TH1 клетки, TH2 клетки, TH3 клетки, TH17 клетки, TH9 клетки, TH22 клетки и фолликулярные хелперные Т-клетки), альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки - естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки миелоидной линии дифференцировки. Неограничивающие примеры клеток миелоидной линии дифференцировки включают моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, тучные клетки, эритроциты, тромбоциты и стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку).

В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более молекул нуклеиновой кислоты, введенных методами генетической инженерии, и вследствие этого, экспрессируют рекомбинантные или генетически модифицированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты являются гетерологичными, то есть, обычно не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученными из другого организма или клетки, например, обычно не встречающимися в клетке, подвергаемой генетической модификации, и/или в организме, из которого такая клетка была получена. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты не имеют естественного

происхождения, например, молекула нуклеиновой кислоты не встречается в природе, включая молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит химерные сочетания молекул нуклеиновых кислот, кодирующих разные домены из клеток нескольких разных видов.

В некоторых вариантах осуществления подготовка генетически модифицированных клеток включает один или более этапов культивирования и/или подготовки. Клетки, предназначенные для введения в них молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, образец, полученный или извлеченный из субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект, от которого получают клетки, является субъектом, который имеет заболевание или состояние, или нуждается в клеточной терапии, или который будет получать клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком, который нуждается в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или генетически модифицируют.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки, например, первичные человеческие клетки. Образцы включают ткани, жидкости и другие образцы, полученные непосредственно от субъекта, а также образцы, полученные после одного или более этапов обработки, такой как разделение, центрифугирование, генетическая модификация (например, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубация. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который был обработан. Биологические образцы включают, но без ограничения, биологические жидкости, такие как кровь, плазма, сыворотка, цереброспинальная жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

В некоторых аспектах образец, из которого клетки получают или выделяют, представляет собой кровь или полученный из крови образец, или представляет собой продукт, или получен путем, афереза или лейкофереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсийный образец ткани, опухоль, клетки лейкоза, лимфомы, лимфатический узел, кишечную лимфоидную ткань, мукозную лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другие органы и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления клетки получают из клеточных линий, например, Т-клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления клетки получают из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата или свиньи.

В некоторых вариантах осуществления выделение клеток включает один или более

этапов подготовки и/или не аффинного разделения клеток. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения по желательным компонентам, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, адгерентность, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам.

В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкоафереза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые клетки крови, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления клетки крови, полученные от субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и для переноса клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления промывочный раствор не содержит кальций и/или магний, и/или многие, или все, из двухвалентных катионов. В некоторых аспектах этап промывания проводят с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах этап промывания проводят методом проточной фильтрации вдоль потока (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывания, таких как, например, не содержащий $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS. В некоторых вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в среде для культивирования.

В некоторых вариантах осуществления методы включают методы разделения на основе плотности, например, получение белых клеток крови из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования через градиент плотности перколла или фиколла.

В некоторых вариантах осуществления методы выделения включают разделение клеток разных типов на основе экспрессии или наличия в клетке одной или более конкретных молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой известный метод разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммунной аффинности. Например, в некоторых аспектах выделение включает разделение клеток и клеточных популяций на основе клеточной экспрессии, или уровня экспрессии, одного или более маркеров, как правило, клеточных поверхностных маркеров, например, путем инкубации с антителом или

связывающим партнером, специфически связывающим такие маркеры, за которой, как правило, следуют этапы промывания и отделения клеток, связанных с антителом или связывающим партнером, от клеток, не связанных с антителом или связывающим партнером.

Такие этапы разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связавшиеся с реагентами, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняют клетки, не связавшиеся с антителом или связывающим партнером. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. В некоторых аспектах может быть особенно полезной отрицательная селекция, когда отсутствует антитело, специфически узнающее тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желательной популяции.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретных клеточных популяций или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение для клеток конкретного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, означает увеличение числа или процентной доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, означает уменьшение числа или процентной доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько раундов этапов разделения, при этом положительно или отрицательно отобранную фракцию из одного этапа подвергают этапу разделения, например, последующей положительной или отрицательной селекции. В некоторых примерах один этап разделения может приводить к одновременному истощению клеток, экспрессирующих несколько маркеров, например, путем инкубации клеток с несколькими антителами или связывающими партнерами, каждый из которых специфичен для маркера, являющегося мишенью для отрицательной селекции. Аналогично, клетки нескольких типов могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с несколькими антителами или связывающими партнерами, специфичными для маркеров, экспрессируемых на клетках разных типов.

Например, в некоторых аспектах конкретные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки, имеющие или экспрессирующие на высоких уровнях один или более поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют методами положительной и отрицательной селекции.

Например, CD3⁺, CD28⁺ Т-клетки можно положительно отбирать с использованием конъюгированных с анти-CD3/анти-CD28 магнитных гранул (например, DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления выделение проводят путем обогащения по

конкретной клеточной популяции методом положительной селекции, или истощения конкретной клеточной популяции методом отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления положительную или отрицательную селекцию проводят путем инкубации клеток с одним или более антителами или другими связывающими веществами, которые специфически связывают один или более поверхностных маркеров, экспрессируемых (маркер⁺), или экспрессируемых на относительно высоком уровне (маркер^{high}), на положительно или отрицательно отбираемых клетках, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из образца МКПК путем отрицательной селекции на маркеры, экспрессируемые на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие белые клетки крови, такие как CD14 клетки. В некоторых аспектах этап селекции на CD4⁺ или CD8⁺ используют для разделения CD4⁺ хелперов и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие CD4⁺ и CD8⁺ популяции можно дополнительно сортировать на субпопуляции методом положительной или отрицательной селекции на маркеры, экспрессируемые, или экспрессируемые в относительно высокой степени, на клетках одной или более субпопуляций необученных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки дополнительно обогащают или истощают по необученным клеткам, центральным клеткам памяти, эффекторным клеткам памяти и/или центральным стволовым клеткам памяти, например, путем положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение по центральным Т-клеткам памяти (Т_{СМ}) проводят для повышения эффективности, например, для повышения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах является особенно сильным в таких субпопуляциях. Смотри Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления объединение Т_{СМ}-обогащенных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют в обоих CD62L⁺ и CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. МКПК можно обогащать или истощать по CD62L⁻CD8⁺ и/или CD62L⁺CD8⁺ фракциям, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления обогащение по центральным Т-клеткам памяти (Т_{СМ}) основано на наличии, или высокой поверхностной экспрессии, CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых вариантах осуществления оно основано на отрицательной селекции на клетки, экспрессирующие, или в высокой степени экспрессирующие, CD45RA и/или гранзим В. В некоторых вариантах осуществления выделение CD8⁺ популяции, обогащенной по Т_{СМ} клеткам, проводят путем истощения по клеткам, экспрессирующим CD4, CD14, CD45RA, и положительной селекции, или обогащения, по клеткам, экспрессирующим CD62L. В одном аспекте обогащение по

центральным Т-клеткам памяти (Т_{СМ}) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительной селекции на основе CD62L. В некоторых вариантах осуществления такие виды селекции проводят одновременно, и в других аспектах проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления тот же этап селекции на основе экспрессии CD4, который используют для получения популяции или субпопуляции CD8⁺ клеток, также используют для получения популяции или субпопуляции CD4⁺ клеток, так что как положительную, так и отрицательную, фракции, полученные при разделении на основе CD4, сохраняют и используют в последующих этапах способов, необязательно, после одного или более дополнительных этапов положительной или отрицательной селекции.

В некоторых вариантах осуществления образец МКПК или другой образец белых клеток крови подвергают селекции на CD4⁺ клетки, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную, фракции. Отрицательную фракцию затем подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительной селекции на основе маркера, характерного для центральных Т-клеток памяти, такого как CD62L или CCR7, при этом положительную и отрицательную селекции проводят в любом порядке.

Хелперные CD4⁺ Т-клетки сортируют на необученные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, имеющих клеточные поверхностные антигены. CD4⁺ лимфоциты можно получать стандартными методами. В некоторых вариантах осуществления необученные CD4⁺ Т лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления центральные CD4⁺ клетки памяти представляют собой CD62L⁺ и CD45RO⁺ клетки. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4⁺ клетки представляют собой CD62L⁻ и CD45RO⁻ клетки.

В некоторых вариантах осуществления для обогащения по CD4⁺ клеткам методом отрицательной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело или связывающий партнер связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитная гранула или парамагнитная гранула, что позволяет разделять клетки для положительной и/или отрицательной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием иммуно-магнитных (или аффино-магнитных) методов разделения (обзор приведен в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In vitro and In vivo*, p 17-25 под редакцией: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых вариантах осуществления способы получения включают этапы замораживания, например, криоконсервирования, клеток, либо до, либо после, выделения, инкубации и/или генетической модификации. В некоторых вариантах осуществления

замораживание, с последующим этапом размораживания, позволяет удалять гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты в клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после этапа промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой из различных известных растворов для замораживания и параметров. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), или другой подходящей среды для замораживания клеток. Затем суспензию разбавляют 1:1 средой так, что конечные концентрации ДМСО и ЧСА составляют 10% и 4%, соответственно. Затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в резервуаре-хранилище в паровой фазе жидкого азота.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют и/или культивируют до проведения, или одновременно с проведением, генетической модификации. Этапы инкубации могут включать культивирование, культивацию, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или генетическую модификацию можно проводить в емкости для культивирования, такой как блок, камера, лунка, колонка, трубка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, мешок или другой контейнер для культивирования, или культивации, клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, предназначенные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для примирования клеток для генетической модификации, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать одно или более из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, периода времени, средств, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, связывающие партнеры, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы, а также любые другие средства, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или средства включают одно или более средств, например, лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах средство запускает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие средства могут включать антитела, например, те, которые специфичны для компонента TCR и/или костимулирующего рецептора, например, анти-CD3 антитела, анти-CD28 антитела, например, связанные с твердой подложкой, такой как гранула, и/или один или более цитокинов. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать этап добавления анти-CD3 и/или анти-CD28 антитела в среду для культивирования (например, в концентрации по меньшей мере примерно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие средства включают IL-2 и/или IL-

15, например, концентрация IL-2 составляет по меньшей мере примерно 10 Единиц/мл.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят методами, такими как те, которые описаны в патенте США № 6040177, выданном Riddell et al., публикациях Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки размножают путем добавления к иницирующей культуре композиции питающих клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), (например, таким образом, что полученная популяция клеток содержит по меньшей мере примерно 5, 10, 20 или 40, или более, питающих клеток МКПК на каждый Т-лимфоцит в начальной популяции, которая будет размножена); и инкубации культуры (например, в течение периода времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления неделящиеся питающие клетки могут представлять собой гамма-облученные питающие клетки МКПК. В некоторых вариантах осуществления МКПК облучают гамма-лучами в диапазоне доз примерно 3000-3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых вариантах осуществления питающие клетки добавляют в среду для культивирования до добавления популяций Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере примерно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере примерно 30 градусов, и как правило, точно, или примерно, 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL могут быть облучены гамма-излучением в диапазоне примерно 6000-10000 рад. В некоторых вариантах осуществления питающие клетки LCL предоставляют в любом подходящем количестве так, что соотношение питающих клеток LCL и исходных Т-лимфоцитов составляет по меньшей мере примерно 10:1.

В вариантах осуществления антиген-специфические Т-клетки, такие как антиген-специфические CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают путем стимуляции антигеном необученных или антиген-специфических Т-лимфоцитов. Например, антиген-специфические Т-клеточные линии или клоны могут быть получены к антигенам цитомегаловируса путем получения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном.

7.5. Композиции и препараты генетически модифицированных клеток

В некоторых вариантах осуществления клетки, генетически модифицированные рекомбинантным рецептором, например, CAR или TCR, предоставляют в виде композиции или препарата, например, фармацевтической композиции или препарата. Такие композиции могут быть использованы совместно с предложенными способами, например, для предотвращения или лечения заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

Термин «фармацевтический препарат» означает препарат, находящийся в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в препарате, и которая не содержит какие-либо дополнительные компоненты, являющиеся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введен препарат.

«Фармацевтически приемлемый носитель» означает ингредиент в фармацевтическом препарате, отличный от активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых вариантах осуществления выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или средством и/или способом введения. Соответственно, существуют различные подходящие препараты. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и бензалкония хлорид. В некоторых вариантах осуществления используют смесь двух или более консервантов. Консерванты, или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% по массе от общей массы композиции. Носители описаны, например, в сборнике Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е издание, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и включают, но без ограничения, буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид; гексаметэтония хлорид; бензалкония хлорид; бензэтония хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные сурфактанты, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В некоторых вариантах осуществления в композиции включены буферные средства. Подходящие буферные средства включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия, а также разные другие кислоты и соли. В некоторых вариантах осуществления используют смесь двух или более буферных средств. Буферные средства, или их смеси, как правило, присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% по массе от общей массы композиции. Способы получения вводимых фармацевтических композиций известны. Иллюстративные способы

описаны более подробно, например, в сборнике Remington: Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21-е издание (1 мая 2005 г.).

Препарат или композиция также может содержать более одного активного ингредиента, полезного для предотвращения или лечения конкретного нарушения, заболевания или состояния с помощью клеток или средств, если соответствующие активности не оказывают взаимного негативного влияния. Такие активные ингредиенты предпочтительно присутствуют в сочетании в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически активные средства или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и так далее. В некоторых вариантах осуществления средства или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают те, которые получены из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, а также органических кислот, таких как виннокаменная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, *p*-толуолсульфоновая кислота.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокapsулы) или в макроэмульсии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция сформулирована в виде комплекса включения, такого как циклодекстриновый комплекс включения, или в виде липосом. Липосомы могут служить для нацеливания средства или клеток-хозяев (например, Т-клеток или НК-клеток) на конкретную ткань. Известно множество способов получения липосом, например, таких как те, которые описаны, например, в публикации Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467 (1980) и патентах США 4235871, 4501728, 4837028 и 5019369.

В некоторых вариантах осуществления для фармацевтической композиции могут быть использованы системы с продленным высвобождением, отсроченным высвобождением и замедленным высвобождением, так что доставка композиции происходит заранее и в течение достаточного времени для сенсibilизации участка, подлежащего лечению. Доступны и известны многие виды систем с модифицированным высвобождением. Такие системы позволяют избегать повторных введений композиции, что является более удобным для субъекта и врача.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит средства или клетки в количествах, эффективных для лечения, или предотвращения, заболевания или состояния, например, в терапевтически эффективных или

профилактически эффективных количествах. В некоторых вариантах осуществления терапевтическую или профилактическую эффективность контролируют путем периодической оценки получающих лечение субъектов. В случае повторных введений в течение нескольких дней, или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до наступления желаемого подавления симптомов заболевания. Однако и другие схемы дозирования могут быть полезны и могут быть определены. Нужные дозы можно доставлять однократным болюсным введением композиции, несколькими болюсными введениями композиции или путем непрерывной инфузии композиции.

Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в сочетании с предложенными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2003/0170238, авторов Gruenberg et al.; патенте США № 4690915, выданном Rosenberg; публикации Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Смотри, например, Themeli et al., (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara et al., (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al., (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, которому предстоит получать клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетки получают от субъекта, например, пациента, который нуждается в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, иного, чем субъект, которому предстоит получать, или который в итоге получает, клеточную терапию, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, относящемуся к тому же биологическому виду. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты имеют генетическое сходство. В некоторых вариантах осуществления у второго субъекта экспрессируются молекулы того же класса или супертипа HLA, что и у первого субъекта.

Средства или клетки можно вводить любым подходящим способом, например, болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, окологлазной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной

инъекцией, перибульбарной инъекцией или задним окологлазничным введением. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентеральным, внутрилегочным и интраназальным путем введения и, если это необходимо для локального лечения, внутриочаговым путем введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный или подкожный пути введения. В некоторых вариантах осуществления конкретную дозу вводят однократным болюсным введением клеток или средства. В некоторых вариантах осуществления ее вводят путем многократного болюсного введения клеток или средства, например, в течение не более 3 дней, или введение клеток или средства осуществляют путем непрерывной инфузии.

Для предотвращения или лечения заболевания соответствующая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое предстоит лечить, типа средства или средств, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли средство или клетки с профилактической или терапевтической целью, от предыдущей терапии, клинической истории субъекта и его ответа на средство или клетки, а также от решения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции предпочтительно вводят субъекту однократно или в серии процедур.

Клетки или средства можно вводить с использованием стандартных способов введения, препаратов и/или устройств. Предложены препараты и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Введение клеток может быть аутологичным или гетерологичным. Например, клетки или клетки-предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же самому субъекту или другому, совместимому, субъекту. Полученные из периферической крови клетки или их потомство (например, полученное *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить локализованной инъекцией, в том числе введением через катетер, системной инъекцией, локализованной инъекцией, внутривенной инъекцией или парентеральным введением. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированную клетку или средство, которая лечит или уменьшает симптомы нейротоксичности), она, как правило, будет сформулирована в стандартной инъекционной лекарственной форме (такой как раствор, суспензия, эмульсия).

Препараты включают препараты для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, чрескожного, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, подязычного или суппозиторного введения. В некоторых вариантах осуществления средство или клеточные популяции вводят парентерально. Используемый в настоящем документе термин «парентеральное» введение включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления средство или клеточные популяции вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления предложены композиции в виде

стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены до выбранного значения pH. Жидкие препараты, как правило, готовить легче, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее для введения, особенно путем инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть сформулированы в пределах подходящего диапазона вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, включающие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль), а также их соответствующие смеси.

Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем включения средства или клеток в растворитель, например, в виде смеси с соответствующим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или тому подобное. Композиции также могут быть лиофилизированными. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие, диспергирующие или эмульгирующие средства (например, метилцеллюлоза), поддерживающие pH буферные средства, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы, красители, и тому подобное, в зависимости от пути введения и желаемого препарата. В некоторых аспектах можно обращаться к стандартным руководствам для приготовления соответствующих препаратов.

Можно добавлять различные добавки, повышающие стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатообразующие средства и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать за счет различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и тому подобного. Пролонгированной абсорбции инъекционной фармацевтической формы можно добиваться за счет использования средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Можно готовить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, при этом матрицы имеют форму профилированных изделий, например, пленок или микрокапсул.

Препараты, используемые для *in vivo* введения, как правило, являются стерильными. Стерильности можно добиваться, например, путем фильтрования через мембраны для стерилизации фильтрованием.

7.6. Введение доз генетически модифицированных клеток

В некоторых вариантах осуществления размер или время введения доз генетически модифицированных клеток определяют в зависимости от конкретного заболевания или

состояния субъекта. Квалифицированный специалист способен эмпирически определять размер или время введения доз для конкретного заболевания с учетом предоставленного описания. Для предотвращения или лечения заболевания соответствующая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое предстоит лечить, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли клетки с профилактической или терапевтической целью, от предыдущей терапии, клинической истории субъекта и его ответа на клетки, а также от решения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции и клетки предпочтительно вводят субъекту однократно или в серии процедур.

В контексте адоптивной клеточной терапии введение конкретной «дозы», применительно к клеткам, включает введение конкретного количества или числа клеток в виде одной композиции и/или путем однократного непрерывного введения, например, одной инъекцией или непрерывной инфузией, и также включает введение конкретного количества или числа клеток в виде разделенной дозы, предоставленной в нескольких отдельных композициях или инфузиях в течение определенного периода времени, который составляет не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах первая или последующая доза представляет собой однократное или последующее введение определенного числа клеток, проводимое или начатое в один момент времени. Однако в некоторых контекстах первую или последующую дозу вводят путем нескольких инъекций или инфузий в течение не более трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или путем нескольких инфузий в течение одного дня.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетки первой дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления клетки последующей дозы вводят в одной фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления клетки первой дозы вводят в нескольких композициях, суммарно содержащих клетки первой дозы. В некоторых вариантах осуществления клетки последующей дозы вводят в нескольких композициях, суммарно содержащих клетки последующей дозы. В некоторых вариантах осуществления дополнительные последующие дозы можно вводить в нескольких композициях в течение не более 3 дней.

Количество вводимых клеток будет варьироваться для субъектов, получающих лечение. В некоторых вариантах осуществления от примерно 1×10^4 до примерно 1×10^{10} , от примерно 1×10^5 до примерно 1×10^9 или от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^8 генетически модифицированных клеток (экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток) вводят субъекту (например, субъекту-человеку). Более эффективные клетки можно вводить в еще меньшем количестве. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере примерно 1×10^6 , по меньшей мере примерно 1×10^7 , по меньшей мере примерно 1×10^8 (например, примерно 2×10^8 , примерно 3×10^8 , примерно 4×10^8 или примерно 5×10^8) генетически модифицированных клеток (экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток) вводят субъекту (например, субъекту-человеку).

Точное определение того, что будет считаться эффективной дозой, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого субъекта, включая размер, возраст, пол, массу тела и состояние здоровья конкретного субъекта. Дозировки могут быть легко определены специалистами в данной области на основе настоящего описания и знаний в данной области.

В некоторых вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток означают количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток. В некоторых вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток означают количество или концентрацию вводимых всех клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (МКПК).

В некоторых вариантах осуществления размер дозы определяют на основе одного или более критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например, химиотерапию, тяжесть заболевания у субъекта, например, опухолевая нагрузка, объем, размер, степень тяжести, распространенность или тип метастазов, стадия, и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических последствий, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа организма на вводимые клетки и/или рекомбинантные рецепторы.

В некоторых вариантах осуществления размер дозы определяют на основе степени тяжести заболевания или состояния у субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления количество вводимых клеток определяют на основе опухолевой нагрузки, которая имеется у субъекта непосредственно перед введением дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления размер дозы обратно коррелирует с тяжестью заболевания. В некоторых вариантах осуществления, например, в контексте высокой степени тяжести заболевания, субъекту вводят низкое количество клеток.

Что касается количества клеток, в некоторых вариантах осуществления такие значения относятся к количествам экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток; в других вариантах осуществления они относятся к количеству Т-клеток или МКПК, или всех вводимых клеток.

В некоторых вариантах осуществления можно вводить одну или более дополнительных последующих доз. В некоторых вариантах осуществления количество вводимых клеток в последующей дозе является таким же, или аналогичным количеству клеток, вводимому в первой дозе, в любом из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления конкретный режим введения доз выбирают для уменьшения или минимизации токсичности у субъекта после введения клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2016/064929, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления при желании, или необходимости, в случае конкретного заболевания или контекста, предложенные способы включают последующую дозу с большим количеством вводимых клеток и, следовательно, более высокую дозу, чем

первая доза клеток. В некоторых вариантах осуществления способы с начальным введением низкой дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток могут приводить к уменьшению тяжести заболевания у субъектов, например, от статуса морфологического заболевания до минимального заболевания, так что последующее введение более высокой дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток субъектам с меньшей вероятностью вызовет токсические последствия у большинства получающих лечение субъектов.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта можно оценивать опухолевую нагрузку после введения первой дозы и перед введением последующей дозы для подтверждения того, что опухолевая нагрузка уменьшена в сравнении с опухолевой нагрузкой до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, если оценка состояния субъекта свидетельствует о том, что опухолевая нагрузка уменьшена и/или у субъекта имеет место не морфологическое заболевание, например, определяемое на молекулярном уровне заболевание и/или минимальное заболевание, предложенные способы включают введение последующей дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток, которая является такой же как, или меньшей чем, первая или начальная доза. В некоторых вариантах осуществления, если оценка состояния субъекта свидетельствует о том, что опухолевая нагрузка не уменьшена и/или у субъекта имеет место морфологическое заболевание, предложенные способы включают введение последующей дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток, которая превышает первую или начальную дозу.

В некоторых вариантах осуществления последующую дозу экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток вводят субъекту в такой момент времени после введения первой или начальной дозы клеток, в котором есть вероятность, что опухолевая нагрузка у субъекта уменьшена за счет первой дозы. В некоторых вариантах осуществления не требуется, чтобы опухолевая нагрузка фактически была уменьшена у всех субъектов перед введением последующей дозы, однако опухолевая нагрузка должна быть уменьшена в среднем у получающих лечение субъектов, например, на основе клинических данных, согласно которым у большинства субъектов, получавших такую первую дозу, наблюдается уменьшение опухолевой нагрузки, например, у по меньшей мере примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95% или большего количества субъектов, получавших первую или начальную дозу, имеет место уменьшение опухолевой нагрузки. Как правило, в момент времени после того, как тяжесть заболевания уменьшилась за счет первой дозы, или вероятно уменьшилась после первой дозы, субъекту вводят последующую дозу, тем самым способствуя дальнейшему уменьшению и/или устранению заболевания или симптома, или улучшению исхода, или предотвращению распространения или прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах

осуществления контекст уменьшения тяжести заболевания в момент последующего введения снижает вероятность истощения перенесенных клеток, за счет чего повышается эффективность. Последующая доза может быть такой же, более низкой или более высокой дозой в сравнении с первой дозой. В некоторых вариантах осуществления после первой дозы вводят несколько последующих доз.

В некоторых вариантах осуществления последующая вводимая доза экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток является более высокой, чем первая доза, так что в последующей дозе субъекту вводят большее количество экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток. В некоторых вариантах осуществления более высокая доза экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих) клеток представляет собой дозу, которая может стимулировать повышенный ответ или эффективность, например, повышенное или большее снижение опухолевой нагрузки и/или повышенную или большую общую выживаемость субъекта в сравнении с тем, что достигается при введении более низкой дозы или меньшего количества клеток. В некоторых вариантах осуществления, поскольку введение первой дозы клеток может приводить к снижению опухолевой нагрузки у субъекта, введение последующей дозы с большим количеством клеток может способствовать избеганию или минимизации СВЦ и/или нейротоксичности у субъекта после введения последующей дозы, что в противном случае может происходить у субъектов с морфологическим заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления последующая доза превышает первую дозу. Например, в некоторых вариантах осуществления последующая доза содержит более примерно 1×10^6 клеток (например, примерно, или по меньшей мере примерно, 2×10^6 , примерно 3×10^6 , примерно 5×10^6 , примерно 1×10^7 , примерно 1×10^8 или примерно 1×10^9) экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток. В некоторых вариантах осуществления количество или размер последующей дозы является достаточным для уменьшения тяжести заболевания или его признака, и/или одного или более симптомов заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления доза имеет размер, эффективный для улучшения показателей выживаемости у субъекта, например, выживаемости, выживаемости без рецидивов или выживаемости без событий, у субъекта в течение по меньшей мере 6 месяцев или по меньшей мере примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4 или примерно 5 лет. В некоторых вариантах осуществления количество вводимых экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток (например, CAR-экспрессирующих Т-клеток) и/или количество таких клеток, вводимых в расчете на массу тела субъекта, в последующей дозе по меньшей мере примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 5 раз, примерно в 10 раз больше, чем количество, вводимое в первой дозе. В некоторых вариантах осуществления тяжесть заболевания, размер опухоли, объем опухоли, масса опухоли и/или опухолевая нагрузка или бремя, уменьшается после последующей дозы на по меньшей мере примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% или примерно 90%, или более, в

сравнении с этими показателями сразу после введения первой дозы или последующей дозы.

В некоторых вариантах осуществления количество клеток, вводимое в последующей дозе, меньше, чем количество клеток, вводимое в первой дозе.

В некоторых вариантах осуществления несколько последующих доз вводят после первой дозы, например, дополнительную дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. В некоторых вариантах осуществления количество клеток, вводимое субъекту в дополнительной дозе или дозах (то есть, третьей, четвертой, пятой и так далее) является таким же, или аналогичным, в сравнении с первой дозой и/или последующей дозой. В некоторых вариантах осуществления дополнительная доза или дозы превышают предшествующие дозы.

В некоторых вариантах осуществления время введения последующей дозы(доз) относительно первой и/или одной из других доз планируют для уменьшения риска нежелательных токсических исходов и достижения максимальной эффективности. В некоторых вариантах осуществления последующую дозу, например, такую же, более низкую или более высокую последующую дозу, вводят в такой момент времени, когда тяжесть заболевания остается сниженной у субъекта, или сниженной у субъектов в среднем, например, на основе клинических данных, но при этом риск СВЦ и/или нейротоксичности остается низким. В некоторых вариантах осуществления последующую дозу, как правило, вводят в такой момент времени относительно первой или предыдущей дозы, когда риск токсического исхода или симптом, или его биохимический показатель, такой как СВЦ или нейротоксичность, синдром активации макрофагов или синдром лизиса опухоли, находится на приемлемом уровне или ниже. Например, последующую дозу можно вводить после того, как токсический исход достиг своего пика и снижается, или снизился ниже приемлемого уровня после начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления подходящее время определяют путем мониторинга и/или оценки наличия одного или более симптомов или исходов, связанных с токсическим событием, и доставляют последующую дозу после определения того, что симптом или исход находится на приемлемом или более низком уровне.

После введения клеток субъекту (например, человеку) биологическую активность генетически модифицированных клеток можно определять множеством известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание генетически модифицированных или природных Т-клеток, или других иммунных клеток с антигеном *in vivo*, например, путем визуализации, или *ex vivo*, например, методом ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления способность генетически модифицированных клеток к разрушению клеток-мишеней можно определять с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, например, анализа цитотоксичности, описанного, например, в публикациях Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009) и Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток также

можно определять путем анализа экспрессии и/или секреции некоторых цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В некоторых вариантах осуществления биологическую активность определяют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение опухолевой нагрузки или тяжести заболевания. В некоторых вариантах осуществления оценивают токсические исходы, персистенцию и/или размножение клеток, и/или наличие или отсутствие иммунного ответа у хозяина.

7.7. Радиотерапия

Варианты радиотерапии, подходящие для использования в сочетании с вариантами лечения, описанными в настоящем документе, включают, но без ограничения, внешнюю радиотерапию, радиофармацевтическое средство, содержащее испускающий ионизирующее излучение радиоизотоп, внутреннюю радиотерапию, радионуклидную терапию и радиационную хирургию.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе комбинированные способы включают использование внешней радиотерапии. При внешней радиотерапии используют источник ионизирующего излучения (радиации), который является внешним по отношению к субъекту (например, к участку в организме субъекта, где находится очаг поражения), обычно или радиоизотоп, такой как ^{60}Co , ^{137}Cs , или источник высокоэнергетического рентгеновского излучения, например, линейный ускоритель. В некоторых вариантах осуществления внешняя радиотерапия включает использование ортовольтовых (то есть, поверхностных) пучков ионизирующего излучения для лечения и/или уничтожения очага поражения на коже. В некоторых вариантах осуществления внешняя радиотерапия включает использование мегавольтовых, например, глубоких, пучков ионизирующего излучения для лечения внутренних очагов поражения, например, очагов поражения мочевого пузыря, кишечника, предстательной железы, легкого или головного мозга. В некоторых вариантах осуществления внешняя радиотерапия включает доставку к очагам поражения рентгеновского излучения, гамма-излучения, пучков электронов, пучков протонов или пучков ионизированных ядер. В некоторых вариантах осуществления внешнюю радиотерапию проводят с использованием линейного ускорителя, коллиматора, кобальтового аппарата, аппарата поверхностной радиотерапии (SRT), ортовольного рентгеновского аппарата.

Внешний источник производит коллимируемый луч, направленный в тело пациента на очаг поражения (например, опухоль). Неблагоприятный эффект облучения здоровых тканей может быть уменьшен при сохранении заданной дозы радиации в опухолевой ткани за счет проецирования пучка внешнего излучения на пациента под различными углами «гентри», при этом пучки сходятся на очаге поражения (например, опухоли). Конкретные объемные элементы здоровой ткани на пути пучка излучения изменяются, уменьшая суммарную дозу на каждый такой элемент здоровой ткани в течение всего курса лечения. Облучение здоровых тканей также может быть уменьшено за счет жесткой коллимации пучка излучения на общее поперечное сечение опухоли, взятое перпендикулярно оси пучка излучения. Для создания такой окружной коллимации

существует множество систем, в некоторых из которых используется несколько скользящих затворов, которые фрагментарно могут создавать непроницаемую для излучения маскировку произвольных очертаний.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе комбинированные способы включают введение субъекту радиофармацевтического средства. Используемый в настоящем документе термин «радиофармацевтическое средство» означает фармацевтическое средство, содержащее по меньшей мере один испускающий ионизирующее излучение радиоизотоп. Радиофармацевтические средства регулярно используют в ядерной медицине для диагностики и/или терапии различных заболеваний. Радиоактивно меченное фармацевтическое средство, например, радиоактивно меченное антитело, содержит радиоизотоп (РИ), который служит источником ионизирующего излучения.

Используемый в настоящем документе термин «радиоизотоп» охватывает металлические и неметаллические радиоизотопы. Радиоизотоп выбирают, исходя из медицинского применения радиоактивно меченных фармацевтических средств. Если радиоизотоп представляет собой металлический радиоизотоп, как правило, используют хелатообразующее средство для связывания металлического радиоизотопа с остальной частью молекулы. Если радиоизотоп представляет собой неметаллический радиоизотоп, неметаллический радиоизотоп, как правило, связывают непосредственно, или через линкер, с остальной частью молекулы.

Используемый в настоящем документе термин «металлический радиоизотоп» означает любой подходящий металлический радиоизотоп, полезный для терапевтической или диагностической процедуры *in vivo* или *in vitro*. Подходящие металлические радиоизотопы включают, но без ограничения: актиний-225, сурьму-124, сурьму-125, мышьяк-74, барий-103, барий-140, бериллий-7, висмут-206, висмут-207, висмут-212, висмут-213, кадмий-109, кадмий-115m, кальций-45, церий-139, церий-141, церий-144, цезий-137, хром-51, кобальт-55, кобальт-56, кобальт-57, кобальт-58, кобальт-60, кобальт-64, медь-60, медь-62, медь-64, медь-67, эрбий-169, европий-152, галлий-64, галлий-67, галлий-68, гадолиний-153, гадолиний-157 золото-195, золото-199, гафний-175, гафний-175-181, гольмий-166, индий-110, индий-111, иридий-192, железо-55, железо-59, криптон-85, свинец-203, свинец-210, лютеций-177, марганец-54, ртуть-197, ртуть-203, молибден-99, неодим-147, нептуний-237, никель-63, ниобий-95, осмий-185+191, палладий-103, палладий-109, платину-195m, празеодим-143, прометий-147, прометий-149, протактиний-233, радий-226, рений-186, рений-188, рубидий-86, рутений-97, рутений-103, рутений-105, рутений-106, самарий-153, скандий-44, скандий-46, скандий-47, селен-75, серебро-110m, серебро-111, натрий-22, стронций-85, стронций-89, стронций-90, серу-35, тантал-182, технеций-99m, теллур-125, теллур-132, таллий-204, торий-228, торий-232, таллий-170, олово-133, олово-114, олово-117m, титан-44, вольфрам-185, ванадий-48, ванадий-49, иттербий-169, иттрий-86, иттрий-88, иттрий-90, иттрий-91, цинк-65, цирконий-89, цирконий-95 и диспрозий-165.

Используемый в настоящем документе термин «неметаллический радиоизотоп» означает любой подходящий неметаллический радиоизотоп, полезный для терапевтической или диагностической процедуры *in vivo* или *in vitro*. Подходящие неметаллические радиоизотопы включают, но без ограничения: иод-131, иод-125, иод-123, фосфор-32, астатин-211, фтор-18, углерод-11, кислород-15, бром-76 и азот-13.

Специалист в данной области может выбирать определенную биологическую молекулу для использования в таргетировании конкретного новообразования с целью лечения радиоактивным изотопом, исходя из клеточных поверхностных молекул, присутствующих на данном новообразовании.

Определение наиболее подходящего изотопа для радиотерапии требует взвешенного рассмотрения различных факторов. К ним относятся поглощение и удержание опухолью, клиренс крови, скорость доставки ионизирующего излучения, время полураспада и удельная активность радиоизотопа, а также возможность крупномасштабного производства радиоизотопа экономичным способом. Ключевым моментом для терапевтического радиофармацевтического средства является доставка необходимого количества дозы ионизирующего излучения в опухолевые клетки и достижение цитотоксического или туморицидного эффекта, при этом без не поддающихся контролю побочных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления физический период полураспада терапевтического радиоизотопа аналогичен биологическому периоду полураспада радиофармацевтического средства в очаге поражения (например, опухоли). Например, если период полураспада радиоизотопа слишком короткий, большая часть распада может произойти до того, как радиофармацевтическое средство достигнет максимального соотношения мишень/фон. С другой стороны, слишком длинный период полураспада может приводить к ненужным дозам ионизирующего излучения в нормальных тканях. В идеале радиоизотоп должен иметь достаточно большой период полураспада для достижения минимальной мощности дозы и облучения всех клеток во время наиболее чувствительных к ионизирующему излучению фаз клеточного цикла. Кроме того, период полураспада радиоизотопа должен быть достаточно длительным для обеспечения достаточного времени для производства, выпуска и транспортировки.

Другими практическими соображениями при выборе радиоизотопа для конкретного применения в терапии опухолей являются доступность и качество. Чистота должна быть достаточной и воспроизводимой, поскольку следовые количества примесей могут повлиять на радиоактивное мечение и радиохимическую чистоту радиофармацевтического средства.

Сайты рецептора-мишени в опухолях, как правило, ограничены в количестве. Как следствие, в некоторых вариантах осуществления радиоизотоп имеет высокую удельную активность. Удельная активность зависит в основном от способа производства. Следовые металлические примеси должны быть сведены к минимуму, поскольку они часто конкурируют с радиоизотопом за хелатообразующее средство, и их металлические

комплексы конкурируют за связывание рецептора с радиоактивно меченным хелатированным средством.

В некоторых вариантах осуществления лечение ионизирующим излучением, используемое в комбинированных способах по настоящему изобретению, представляет собой использование сочетания внешнего ионизирующего излучения и радиоизотопа, например, радиофармацевтического средства.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе комбинированные способы включают использование внутренней радиотерапии, например, брахитерапии. В некоторых вариантах осуществления брахитерапия включает использование источников излучения в области очага поражения, или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления брахитерапия включает интерстициальное облучение, при котором источник излучения содержится в небольших гранулах, зернах, проводах, трубках и/или контейнерах, и его помещают непосредственно в очаг поражения, или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления брахитерапия включает внутрисполостное облучение, при котором контейнер с радиоактивным материалом помещают в полость тела, например, в грудную клетку или толстую кишку. В некоторых вариантах осуществления для помощи в размещении радиоактивного источника используют ультразвук, рентгеновские лучи и/или КТ сканирование.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе комбинированные способы включают использование постоянной брахитерапии, которая включает помещение в очаг поражения небольших контейнеров, например, контейнеров размером примерно с рисовое зерно. В некоторых вариантах осуществления контейнеры испускают излучение в течение нескольких недель или месяцев, и остаются на месте после того, как излучение использовано.

В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящем документе комбинированные способы включают использование временной брахитерапии, которая включает размещение в области, подлежащей лечению, цилиндров, полых игл, трубок (катетеров) и/или наполненных жидкостью баллонов, которые после лечения удаляют. В некоторых вариантах осуществления радиоактивные материалы размещают в этих контейнерах на короткое время, а затем удаляют. В некоторых вариантах осуществления временная брахитерапия может представлять собой брахитерапию с высокой мощностью дозы (ВМД), при которой источник ионизирующего излучения помещают на несколько минут на очаг поражения, или рядом с ним, а затем удаляют. Эту процедуру можно повторять дважды в день в течение недели или один раз в неделю в течение нескольких недель. В некоторых вариантах осуществления временная брахитерапия представляет собой брахитерапию с низкой мощностью дозы (НМД), при которой источник ионизирующего излучения оставляют на месте на срок вплоть до 7 дней, а затем удаляют.

Тип ионизирующего излучения, которое подходит для использования в комбинированных способах, раскрытых в настоящем документе, может варьироваться. Например, ионизирующее излучение по своей природе может быть электромагнитным

или представлять собой излучение частиц. Электромагнитное ионизирующее излучение, полезное при осуществлении на практике раскрытых в настоящем документе комбинированных способов, включает, но без ограничения, рентгеновские лучи и гамма-лучи. Излучение частиц, полезное при осуществлении на практике раскрытых в настоящем документе комбинированных способов, включает, но не ограничивается ими, пучки электронов (бета-частицы), пучки протонов, пучки нейтронов, альфа-частицы и отрицательные пи-мезоны.

Ионизирующее излучение можно доставлять с использованием общепринятых приборов и методов радиологического лечения, а также с использованием интраоперационных и стереотаксических методов. Дополнительную информацию, относящуюся к применению ионизирующего излучения, подходящего для осуществления на практике раскрытых в настоящем документе комбинированных способов, можно найти в публикации Steven A. Leibel et al., Textbook of Radiation Oncology (1998) ;(издат. W. B. Saunders Company) и, в частности, в главах 13 и 14. Ионизирующее излучение также можно доставлять другими методами, например, путем направленной доставки, например, при помощи радиоактивных «зерен», или путем системной доставки направленных радиоактивных конъюгатов. J.; Padawer et al., Combined Treatment with Radioestradiol lucanthone in Mouse C3HBA Mammary Adenocarcinoma and with Estradiol lucanthone in an Estrogen Bioassay, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7: 347-357 (1981).

Для лечения опухолей были исследованы излучатели как α -, так и β -частиц. Альфа-частицы являются особенно хорошими цитотоксическими средствами, поскольку они рассеивают большое количество энергии в пределах одного или двух диаметров клетки. Излучатели β -частиц имеют относительно большую дальность проникновения (2-12 мм в ткани) в зависимости от уровня энергии. Проникновение на большие расстояния является особенно важным в случае солидных опухолей, которые отличаются гетерогенным кровотоком и/или экспрессией рецепторов. Излучатели β -частиц обеспечивают более однородное распределение дозы, даже когда они гетерогенно распределены в ткани-мишени.

7.8. Применение радиотерапии

Комбинированные способы по настоящему изобретению включают введение субъекту эффективной дозы ионизирующего излучения. Ионизирующее излучение можно доставлять направленной доставкой. Ионизирующее излучение также можно доставлять системной доставкой (например, системной доставкой направленных радиоактивных конъюгатов, например, радиоактивно меченного антитела).

7.8.1. Применение внешнего ионизирующего излучения

В случае применения внешнего ионизирующего излучения количество может составлять по меньшей мере разовые дозы примерно 1 Грей (Гр) по меньшей мере раз в два дня в объем лечения в зоне очага поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах по меньшей мере примерно 2 Грей (Гр) по меньшей мере один раз в день (ежедневно) в объем лечения в зоне очага

поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах по меньшей мере примерно 4 Грей (Гр) по меньшей мере один раз в день (ежедневно) в объем лечения в зоне очага поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах по меньшей мере примерно 2 Грей (Гр) по меньшей мере один раз в день в объем лечения в течение пяти последовательных дней в неделю в зоне очага поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах по меньшей мере примерно 4 Грей (Гр) по меньшей мере один раз в день в объем лечения в течение пяти последовательных дней в неделю в зоне очага поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах по меньшей мере примерно 4 Грей (Гр) ежедневно в течение пяти дней в зоне очага поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах по меньшей мере примерно 4 Грей (Гр) один раз в день в течение пяти последовательных дней в зоне очага поражения. В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение применяют в разовых дозах 10 Гр через день, три раза в неделю в объем лечения в зоне очага поражения.

В некоторых вариантах осуществления общей дозой по меньшей мере от примерно 5 Гр до примерно 40 Гр (например, от примерно 5 Гр до примерно 30 Гр, от примерно 10 Гр до примерно 30 Гр, от примерно 5 Гр до примерно 20 Гр, от примерно 10 Гр до примерно 20 Гр или от примерно 10 Гр до примерно 30 Гр) воздействуют на очаг поражения у субъекта, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления общей дозой по меньшей мере примерно 10 Гр воздействуют на очаг поражения у субъекта, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления общей дозой по меньшей мере примерно 20 Гр воздействуют на очаг поражения у субъекта, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления дозой по меньшей мере примерно 30 Гр воздействуют на очаг поражения у субъекта, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления дозой по меньшей мере примерно 40 Гр воздействуют на очаг поражения у субъекта, который нуждается в этом. В некоторых вариантах осуществления общей дозой примерно 20 Гр воздействуют на очаг поражения у субъекта, который нуждается в этом.

Как правило, субъект получает лечение внешним ионизирующим излучением четыре или пять раз в неделю. Весь курс лечения обычно длится от одной до семи недель в зависимости от типа рака и цели лечения. Например, субъект может получать дозу 2 Гр/день в течение 30 дней.

7.8.2. Введение радиофармацевтического средства

Существует ряд способов введения радиофармацевтического средства. Например, радиофармацевтическое средство можно вводить путем направленной доставки или путем системной доставки направленных радиоактивных конъюгатов, например, с использованием радиоактивно меченного антитела, радиоактивно меченного пептида и липосомной системы доставки.

В некоторых вариантах осуществления направленной доставки радиоактивно меченное фармацевтическое средство может представлять собой радиоактивно меченное антитело. Смотри, например, Ballangrud A. M., et al. Cancer Res., 2001; 61: 2008-2014 и Goldenber, D. M. J. Nucl. Med., 2002; 43 (5): 693-713, содержание публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления направленной доставки радиофармацевтического средства можно вводить в форме липосомных систем доставки, таких как мелкие однослойные везикулы, крупные однослойные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть образованы из различных фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины. Смотри, например, публикацию Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G. An analytical dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. J Nucl Med 2001; 42: 499-504, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления направленной доставки радиоактивно меченное фармацевтическое средство может представлять собой радиоактивно меченный пептид. Смотри, например, публикацию Weiner RE, Thakur ML. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. Appl Radiat Isot 2002 Nov; 57 (5): 749-63, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Помимо направленной доставки для доставки радиофармацевтического средства в целевой участок можно использовать брахитерапию. Брахитерапия представляет собой метод, при котором источники ионизирующего излучения помещают как можно ближе к зоне очага поражения (например, опухоли). Часто источник вводят непосредственно в очаг поражения (например, опухоль). Источники ионизирующего излучения могут иметь форму проволоки, зерен или стержней. Как правило, используют цезий, иридий или иод.

Необходимое количество ионизирующего излучения может определять специалист в данной области на основе известных доз для конкретного типа заболевания или нарушения (например, рака). В некоторых вариантах осуществления ионизирующее излучение можно применять в количестве, эффективном для вызывания остановки прогрессирования или для регрессии рака, когда ионизирующее излучение применяют с генетически модифицированными клетками для достижения неожиданного синергического эффекта, например, синергического абскопального ответа. Ингибитор HDAC.

7.9. Уменьшение тяжести заболевания, эффективность и выживаемость

Введение в соответствии с раскрытыми в настоящем документе способами, как правило, приводит к уменьшению или предотвращению распространения, или тяжести, заболевания или состояния у субъекта. Например, если заболевание или состояние представляет собой опухоль, способы, как правило, приводят к уменьшению размера, массы, метастазирования опухоли, процентного содержания бластов в костном мозге или молекулярных индикаторов рака и/или к улучшению прогноза или выживаемости, или другого симптома, связанного с опухолевой нагрузкой.

Тяжесть заболевания может включать общее количество пораженных болезнью клеток у субъекта или в органе, ткани или биологической жидкости субъекта, например, органе или ткани с опухолью, или в другом участке тела, например, в случае метастазов. Например, в контексте некоторых гематологических злокачественных новообразований опухолевые клетки можно обнаруживать и/или количественно определять в крови или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления тяжесть заболевания включает массу опухоли, число или степень распространенности метастазов и/или процентное содержание бластов в костном мозге.

В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от рака крови. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает от множественной миеломы («ММ»). Степень тяжести заболевания можно определять путем оценки остаточной ММ в крови или костном мозге, например, на основе критериев Международной рабочей группы по изучению миеломы (IMWG) для диагностирования ММ. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет морфологическое заболевание, если обнаружен моноклональный парабелок (М-белок) (например, методом электрофореза белков сыворотки (SPEP)). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет морфологическое заболевание, если степень инфильтрации костного мозга моноклональными злокачественными плазматическими клетками (ПК) составляет примерно 5% или более. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет морфологическое заболевание, если обнаружены костные и/или внекостные очаги ММ. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет полную или клиническую ремиссию, если М-белок не обнаружен, степень инфильтрации костного мозга моноклональными злокачественными плазматическими клетками (ПК) составляет менее примерно 5% и/или отсутствуют костные и/или внекостные очаги ММ.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние сохраняется после введения первой дозы, и/или введение первой дозы является недостаточным для устранения заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления введение последующей дозы приводит к уменьшению тяжести заболевания в сравнении с тяжестью заболевания в момент времени непосредственно перед введением первой дозы, или в момент времени непосредственно перед введением последующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, например, в контексте рецидива, введение последующей дозы приводит к уменьшению тяжести заболевания в сравнении с пиковым уровнем тяжести заболевания после введения первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления способ приводит к уменьшению тяжести заболевания или состояния, например, количества опухолевых клеток, размера опухоли, к выживанию, или выживанию без событий, пациента, в большей степени и/или в течение более длительного периода времени в сравнении с уменьшением, которое наблюдалось бы при использовании сопоставимого способа с альтернативным режимом дозирования, например, режимом, включающим введение генетически модифицированных клеток без

радиотерапии.

В некоторых вариантах осуществления тяжесть заболевания или состояния у субъекта определяют, оценивают или измеряют. В некоторых вариантах осуществления тяжесть заболевания можно определять путем определения общего количества пораженных заболеванием или связанных с заболеванием клеток, например, опухолевых клеток, у субъекта или в органе, ткани или биологической жидкости субъекта, такой как кровь или сыворотка. В некоторых вариантах осуществления тяжесть заболевания, например, опухолевую нагрузку, оценивают путем измерения массы солидной опухоли и/или количества или распространенности метастазов. В некоторых вариантах осуществления оценивают выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, наличие или продолжительность выживаемости без событий или без симптомов, или выживаемости без рецидивов. В некоторых вариантах осуществления оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления конкретно указывают степень тяжести заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления показатель выживаемости без событий или показатель общей выживаемости субъекта улучшается за счет использования данных способов, в сравнении с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления показатель выживаемости без событий, или вероятность, для субъектов, получавших лечение данными способами, через примерно пять недель, примерно шесть недель, примерно семь недель, примерно восемь недель, примерно три месяца, примерно четыре месяца, примерно пять месяцев, примерно шесть месяцев после первой дозы превышает примерно 40%, превышает примерно 50%, превышает примерно 60%, превышает примерно 70%, превышает примерно 80%, превышает примерно 90% или превышает примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления общая выживаемость превышает примерно 40%, превышает примерно 50%, превышает примерно 60%, превышает примерно 70%, превышает примерно 80%, превышает примерно 90% или превышает примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, получавшего лечение данными способами, наблюдается выживаемость без событий, выживаемость без рецидивов или выживаемость в течение по меньшей мере примерно пяти недель, примерно шести недель, примерно семи недель, примерно восьми недель, примерно трех месяцев, примерно четырех месяцев, примерно пяти месяцев, примерно шести месяцев, по меньшей мере примерно 1 года, примерно 2 лет, примерно 3 лет, примерно 4 лет, примерно 5 лет, примерно 6 лет, примерно 7 лет, примерно 8 лет, примерно 9 лет или примерно 10 лет. В некоторых вариантах осуществления улучшается показатель времени до прогрессирования, например, время до прогрессирования превышает примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 1 год, примерно 2 года, примерно 3 года, примерно 4 года, примерно 5 лет, примерно 6 лет, примерно 7 лет, примерно 8 лет, примерно 9 лет или примерно 10 лет после первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления после лечения способом вероятность

рецидива снижается в сравнении с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления вероятность рецидива через примерно пять недель, примерно шесть недель, примерно семь недель, примерно восемь недель, примерно три месяца, примерно четыре месяца, примерно пять месяцев, примерно шесть месяцев после первой дозы составляет менее примерно 80%, менее примерно 70%, менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20% или менее примерно 10% в сравнении с другими способами, например, способом, включающим введение генетически модифицированных клеток без радиотерапии.

7.10. Наборы

Также предложены изделия, такие как наборы, включающие одну или более доз клеток по любому из описанных вариантов осуществления, например, в любом из описанных препаратов или композиций (которые могут находиться в одном или более контейнерах, таких как мешки или флаконы, с клетками в достаточных количествах или концентрациях для введения отдельной дозы или ее части) и инструкции и/или упаковочные материалы, или литературу с инструкциями по введению в соответствии с способом, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в инструкции приведены предостережения или указаны противопоказания любого из описанных вариантов осуществления.

8. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены исключительно для иллюстративных целей и не должны ограничивать объем настоящего изобретения.

Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые приведены, например, для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и идей, изложенных в настоящем документе. Такие модификации могут быть осуществлены на практике без отклонения от истинного объема и сущности изобретения, и должны входить в объем настоящего изобретения.

Пример 1 - ВСМА-направленная CAR-T-клеточная терапия плюс радиотерапия для лечения рефрактерной миеломы проявляют потенциальную синергию

Краткое изложение

В данном примере представлен случай пациента с многократно рецидивирующей, рефрактерной миеломой, клиническое течение которой показало синергический абскопальный ответ на CAR-T-клеточную терапию и локализованную радиотерапию (РТ). Вскоре после получения направленной на антиген созревания В-клеток (BCMA) CAR-T-клеточной терапии пациенту срочно потребовалась высокая доза стероидов и РТ в связи со сдавливанием спинного мозга. Несмотря на стероиды, у пациента наблюдался стойкий системный ответ, который не мог быть результатом только РТ. Результаты после РТ в данном исследовании включали вторую волну лихорадки и повышение уровня CRP и IL6,

с началом через 21 день после введения CAR-T-клеток, что поздно для синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ) вследствие только CAR-T-клеточной терапии. Учитывая этот ответ, который напоминал СВЦ, сразу после РТ были изучены изменения в репертуаре Т-клеточных рецепторов (TCR) пациента в 10 последовательных временных точках. При сравнении Т-клеточного разнообразия с использованием индексов перекрытия Мориситы (C_D) было обнаружено, что, хотя разнообразие исходно было стабильным после CAR-T-клеточной терапии в сравнении с исходным состоянием ($C_D=0,89-0,97$, исходное состояние против показателей в 4 временных точках после введения CAR-T-клеток), Т-клеточное разнообразие изменилось после завершения РТ, с $>30\%$ новыми размноженными TCR ($C_D=0,56-0,69$, исходное состояние против показателей в 4 временных точках после РТ). Эти результаты свидетельствуют о потенциальной синергии между ионизирующим излучением и CAR-T-клеточной терапией, которая приводит к абскопальному ответу.

Материалы и методы

Клинический протокол. Пациент получал лечение в исследовании, в котором были оценены аутологичные BCMA-направленные CAR-T-клетки (регистрационный № испытания NCT03070327; испытание было проведено в соответствии с общими правилами проведения испытаний в США; от пациентов было получено информированное согласие). Генетическую модификацию выполняли с использованием ретровируса, кодирующего CAR, состоящий из анти-BCMA scFv человека, трансмембранного домена CD8, сигнальных доменов 4-1BB и CD3 ζ , слитых с «саморасщепляемым» элементом P2A, и отдельный ген, кодирующий суррогатный маркер трансдукции (Smith et al., Mol Ther. (2018 Jun 6);26(6):1447-1456). В соответствии с протоколом испытания пациенты были подвергнуты лейкаферезу, и мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) были заморожены. В соответствующее время МКПК были разморожены, подвергнуты селекции, активированы CD3/CD28 гранулами и размножены в присутствии IL2. Пациенту было назначено введение циклофосфида и флударабина (300 мг/м^2 и 30 мг/м^2 , соответственно, $\times 3$ последовательных дня) для лимфодеплеции перед введением CAR-T-клеток. Это было исследование с эскалацией дозы 3×3 , и представляемый пациент получал лечение с уровнем дозы 3, запланированной дозой 450×10^6 жизнеспособных CAR $^+$ Т-клеток.

Радиотерапия. Была проведена внешняя радиотерапия с использованием 6 МВ фотонов при помощи линейного ускорителя (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA). Целевые области включали тела позвонков T1-T8 с правосторонней параспинальной опухолевой массой и весь мозг до тела позвонка C2. Были использованы обычные противоположные поля (AP/PA для грудной клетки и противоположные латерали для полей всего мозга). Общая доза составляла 2000 сГр в 5 ежедневных разовых дозах на каждый участок.

Измерение цитокинов. IL-1 β , IL6, IL-10 и TNF α в периферической сыворотке определяли 4-плексным микрофлюидным сэндвич-иммуноанализом, проведенным на Ella

(Protein Simple; San Jose, CA). CRP определяли с помощью автоматизированного иммунотурбидиметрического анализа, проводимого на анализаторе Abbott Architect Chemistry Analyzer (Abbott Laboratories; Chicago, IL). Ферритин определяли с помощью автоматизированного двухсайтового иммуноферментного анализа на Tosoh AIA 2000 (Tosoh Bioscience; Japan). D-димер определяли с помощью автоматизированного иммунотурбидиметрического анализа на анализаторе Stago STA-R Max analyzer (Stago; France).

Проточная цитометрия. Для окрашивания на CAR-T-клетки использовали анти-CD3 антитело клона 7D-6 (Thermo-Fisher; Waltham, MA), анти-CD8 антитело клона 3B5 (Thermo-Fisher; Waltham, MA) и цетуксимаб (Eli Lilly, Indianapolis, IN), конъюгированные при помощи набора для мечения Lightning-Link™ (Innova Biosciences, Cambridge, UK). Жизнеспособность клеток определяли при помощи теста с исключением 7AAD (Thermo-Fisher; Waltham, MA). Проточную цитометрию проводили на BD LSR II (BD biosciences; San Jose, CA), и результаты анализировали с использованием FlowJo (FlowJo LLC; Ashland, Oregon).

Отслеживание клонов TCR. ДНК экстрагировали с использованием набора QIAmp Blood DNA mini kit (Qiagen; Hilden, GR) из МКПК или моноклеарных клеток костного мозга. Клонотипы контролировали путем секвенирования TCR V β CDR3 в анализе immunoSEQ (Adaptive Biotechnologies; Seattle, WA).

Результаты

Клиническая оценка

63-летней чернокожей американке был поставлен диагноз IgA λ множественной миеломы (ММ) с цитогенетикой высокого риска (амплификация 1q21) в 2010 г. Она получала 8 линий терапии, в том числе сочетания леналидомида, бортезомиба, помалидомида, карфилзомиба, даратумумаба и аутологичного трансплантата стволовых клеток, в каждом случае с прогрессированием заболевания. Совсем недавно ее заболевание было рефрактерным к лечению дексаметазоном, циклофосфамидом, этопозидом и цисплатином (DCEP). Она была включена в клиническое исследование с применением терапии Т-клетками с ВСМА-направленным CAR, содержащим костимулирующий домен 4-1BB (Smith et al., Mol Ther. (2018 Jun 6);26(6):1447-1456) (NCT03070327). Ее клинический курс представлен на Фиг. 1A-1F. Исходные данные указывают на распространенное заболевание, в том числе наличие моноклонального парабелка (М-белка) в концентрации 2,26 г/дл, исходная биопсия костного мозга показала 95% инфильтрацию плазматических клеток, и ПЭТ/КТ сканирование показало широкое распространение костных и внекостных очагов ММ, в том числе обширные образования в мягких тканях и в плевральной полости (смотри Фиг. 1A).

Пациентка получала химиотерапию циклофосфамидом/флударабином для лимфодеплеции, с последующей одной инфузией CAR-T-клеток. Вскоре после этого у нее появились признаки слабости нижних конечностей и спутанности сознания. Пациентка оставалась в сознании и была бодра, однако изменения психического статуса в

дополнение к спутанности сознания проявлялись в виде периодической афазии, снижения кратковременной памяти (могла вспомнить 0/3 объектов) и внимания/обдумывания (не могла произнести по буквам СЛОВО в обратном порядке). Для анализа этих неврологических показателей была проведена МРТ позвоночника и головного мозга, результаты которой выявили сдавливание спинного мозга и множественные эпидуральные образования, вызывающие смещение средней линии головного мозга (Фиг. 2А). В день 5 после введения CAR-T-клеток содержание М-белка увеличилось от исходного значения до 2,83 г/дл. Хотя к этому моменту неврологические симптомы пациентки разрешились, учитывая наличие при визуализации очага поражения, сдавливающего грудной отдел спинного мозга, и увеличение содержания серологических маркеров ММ, возникло опасение по поводу прогрессирования сдавливания спинного мозга. Вследствие этого пациентка получила высокую дозу стероидов (дексаметазон с постепенным уменьшением дозы, начиная с 10 мг, каждые 12 часов всего в течение 13 дней) и паллиативную РТ грудного отдела позвоночника (T1-T8), а затем всего мозга до C2; применяемую в дни 6-20 после введения CAR-T-клеток (2000 сГр в 5 разовых дозах на каждый участок, последовательно) (смотри Фиг. 1А-1F и 2В). Ее МРТ через 4 недели показала почти полное разрешение заболевания в участках применения радиотерапии (смотри Фиг. 2А).

Помимо такого ответа в участке применения радиотерапии впоследствии наблюдался благоприятный системный ответ. Через семь недель после введения CAR-T-клеток М-белок у пациентки не поддавался обнаружению (Фиг. 1В). ПЭТ/КТ сканирование через 8 недель после введения CAR-T-клеток показало полное рентгенографическое разрешение заболевания, включая бесчисленное количество участков за пределами поля ионизирующего излучения (Фиг. 1С). Клинический ответ у пациентки сохранялся в течение 9 месяцев после терапии.

Воспалительный ответ

В соответствии с планом контролировали изменения содержания сывороточных маркеров воспаления CRP, ферритина и D-димера, а также цитокинов IL-6, IL-10, TNF α и IL-1 β . Содержание маркеров воспаления, ассоциированных с активностью CAR-T-клеток (Davila et al., Sci Transl Med (2014);6:224ra25), увеличилось вскоре после завершения радиотерапии. В их числе были маркеры, характерные для опосредованного CAR-T-клетками синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ) (17): IL-6 (до 333 пг/мл от 32 пг/мл) (смотри Фиг. 1D) и CRP (до 22,11 мг/дл от 6,43 мг/дл) (смотри Фиг. 1D), а также более общие маркеры воспаления, содержание которых часто повышено при СВЦ: ферритин (до 13,197 нг/мл от 2,921 нг/мл (смотри Фиг. 3А) и D-димер (до 915 нг/мл от <150 нг/мл) (смотри Фиг. 3В). В случае сывороточного IL-10 наблюдали бимодальный пик. Первый пик имел место вскоре после введения CAR-T-клеток, что соответствовало по времени пику сывороточных концентраций IL-10 после введения CAR-T-клеток, о котором сообщали другие исследователи (Kochenderfer et al., J Clin Oncol (2017);35:1803-13), и времени проявления СВЦ, который наблюдали у других пациентов в данном исследовании (Mailankody et al., American Society of Hematology (2018);132:959-959).

Более поздний второй пик имел место во время радиотерапии (смотри Фиг. 3С). Содержание $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ оставалось стабильным и в пределах нормы на протяжении всего клинического курса (смотри Фиг. 3С). Примерно в конце проведения радиотерапии у пациентки развилась лихорадка с температурой до $>39^\circ\text{C}$ без клинических или лабораторных признаков инфекции (смотри Фиг. 1Е). В это время у нее появилась тахикардия до 110 ударов/мин (от недавнего исходного уровня 60 ударов/мин) и АД снизилось до 90 мм рт.ст. (от недавнего исходного уровня 110-130 мм рт.ст.); ЧСС и АД вернулись к исходному уровню после 3 дней тахикардии и относительной гипотензии. Ей не требовались вазопрессоры или дополнительный кислород, таким образом, это можно было считать СВЦ 1 степени. Отложенный СВЦ-подобный ответ наблюдали только у этой пациентки, но не у других пациентов в данном исследовании ($n=13$). Несмотря на 13 дней системного применения стероидов, CAR-T-клетки размножились и сохранились (смотри Фиг. 4), составляя 9,3% $\text{CD}3^+$ клеток в крови при определении методом проточной цитометрии примерно во время воспалительного ответа (смотри Фиг. 5). Учитывая временную особенность появления этих СВЦ-подобных симптомов сразу после радиотерапии, определяли время появления изменений в репертуаре ее Т-клеточных рецепторов (TCR), используя сохраняемые образцы.

Серийный анализ клонотипов TCR

Поскольку явления после применения ионизирующего излучения напоминали клинические и лабораторные результаты, часто коррелирующие с синдромом высвобождения цитокинов (СВЦ), определяли время появления изменений в репертуаре Т-клеточных рецепторов (TCR) пациентки, используя сохраняемые образцы. Было установлено, что исходное разнообразие TCR в периферической крови пациентки отражало таковое в ее костном мозге (смотри Фиг. 6; сравнение разнообразия TCR при помощи индекса перекрытия Мориситы; $C_D=0,97$). С учетом такой высокой степени совпадения между периферической кровью и костным мозгом был сделан вывод о том, что периферическая кровь может быть подходящим суррогатом для изучения изменений в разнообразии TCR с течением времени у этой пациентки с внутри- и внекостной ММ. Серийный анализ репертуара TCR в периферической крови пациентки показал, что разнообразие TCR было стабильным в четырех временных точках в течение первой недели после инфузии CAR-T-клеток. Значения C_D в сравнении с исходными составляли 0,89-0,97 на протяжении всего этого времени (смотри Фиг. 7). Всплеск размножения новых клонов TCR был отмечен при первоначальной оценке, на восьмой день после завершения радиотерапии ($C_D=0,56-0,69$, 4-19 после CAR-T-клеточной терапии против исходных значений). Эти заново размноженные клоны составляли вплоть до $>30\%$ Т-клеточного репертуара через 4 недели. Многие из них сохранялись в течение по меньшей мере 19 недель после инфузии CAR-T-клеток, последняя оцененная временная точка (смотри Фиг. 1F). Отсутствовало размножение каких-либо клонов TCR, уровень экспрессии которых исходно был высоким (смотри Фиг. 8).

Обсуждение

В данном примере сообщено о пациентке, получающей CAR-T-клеточную терапию в связи с рефрактерной ММ, которая срочно получила высокую дозу стероидов и паллиативную РТ на весь мозг и грудной отдел позвоночника в последующие дни. Результаты показывают, как ВСМА-направленная CAR-T-клеточная терапия может способствовать устранению высокой опухолевой нагрузки ММ (включая значительное внекостное заболевание), несмотря на раннее и продолжающееся введение высоких доз стероидов. Более того, время появления СВЦ-подобных клинических признаков и маркеров воспаления совпадало с размножением новых клонов TCR после радиотерапии, свидетельствуя в пользу синергического эффекта между РТ и CAR-T-клеточной терапией. Клиническое течение болезни пациентки предполагает, что локальная РТ в сочетании с CAR-T-клеточной терапией может приводить к усилению системного противоопухолевого эффекта.

Для частой серийной оценки клональности TCR использовали моноклеарные клетки периферической крови. Несмотря на то, что ММ представляет собой злокачественное новообразование костного мозга, и при том, что костный мозг доступен, его нельзя отбирать для анализа так часто, как периферическую кровь. При оценке в одной и той же временной точке было установлено, что моноклеарные клетки костного мозга и МКПК пациентки имели высокую степень совпадения репертуаров TCR ($C_D=0,97$). Таким образом, был сделан вывод, что клональность TCR в периферической крови информативна для этой пациентки с широко распространенной ММ.

Серийный анализ репертуаров TCR показал размножение новых клонов TCR, совпадающее с клиническими и лабораторными признаками СВЦ. Совпадение этих событий вскоре после радиотерапии у этой ранее получавшей CAR-T-клетки пациентки указывает на вероятность синергии между ионизирующим излучением и CAR-T-клеточной терапией.

Одним из ограничений данного исследования является то, что количество сохраненного материала было недостаточным для определения антигенов-мишеней, стимулирующих размножение конкретных клонов TCR. Однако заново размноженные клоны TCR составляли $>30\%$ популяции Т-клеток после РТ в момент времени, когда CAR⁺ Т-клетки составляли $\sim 10\%$ CD3 клеток, это указывало на то, что по меньшей мере частично за размножение Т-клеток отвечали не модифицированные CAR-T-клетки.

Известно, что радиотерапия, отдельно или в сочетании с блокадой иммунных контрольных точек, «формирует» репертуар TCR размноженных клонов (Sridharan Br J Cancer (2016);115:252-60; Twyman-Saint et al., Nature (2015);520:373-7). Однако, учитывая, что CAR приводят к HLA-независимой Т-клеточной активации, не всегда интуитивно понятно, что локальная радиотерапия будет стимулировать системные ответы за счет CAR-T-клеток так, как она может стимулировать за счет блокады контрольных точек, то есть, за счет увеличения воздействия неоантигенов вследствие абскопального эффекта (Postow et al., N Engl J Med. (2012);366:925-31).

Синергия CAR-T-клеток и радиотерапии может осуществляться по нескольким

возможным механизмам: (1) Синергия может быть объяснена цитокинами, секретируемыми CAR-T-клетками, с увеличением вероятности того, что эндогенные Т-клетки вызовут абскопальный ответ. (2) Как было установлено в доклинических испытаниях, радиотерапия может приводить к усилению эффекторных функций и миграции CAR-T-клеток (Weiss et al., Clin Cancer Res (2018);24:882-95; DeSelm et al., Mol Ther (2018);26:2542-52). (3) Усиление сигнализации через TCR CAR-T-клеток может приводить к повышенному клональному размножению CAR-T-клеток. Сочетания этих механизмов или неизвестные механизмы также являются возможными объяснениями.

Аналогичное явление, возможно, имело место у получающего CAR-T-клеточную терапию пациента с лимфомой ЦНС, у которого после рецидива биопсия образования ускорила клиническую ремиссию (Abramson et al., N Engl J Med (2017);377:783-4). Эти наблюдения свидетельствуют в пользу дальнейшего изучения CAR-T-клеточной терапии в сочетании с радиотерапией.

Варианты осуществления настоящего изобретения

Из приведенного выше описания будет очевидно, что могут быть использованы вариации и модификации раскрытого в настоящем документе изобретения для приспособления его к различным вариантам применения и условиям. Такие варианты осуществления также входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Перечисление списка элементов в любом определении переменной в настоящем документе включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) перечисленных элементов. Перечисление вариантов осуществления в настоящем документе включает такие варианты осуществления в качестве отдельных вариантов осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления, или их частью.

Все патенты и публикации, упомянутые в настоящей спецификации, включены посредством ссылки в такой же степени, как если было бы указано, что каждый отдельный патент или публикация специально и индивидуально включены посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, включающий:

(a) введение субъекту, имеющему заболевание или состояние, дозы клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который связывает антиген; и

(b) воздействие на указанного субъекта ионизирующим излучением, где воздействие ионизирующим излучением начинают не позднее, чем через примерно две недели после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

2. Способ по п. 1, где воздействие ионизирующим излучением начинают не позднее, чем через примерно одну неделю после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

3. Способ по п. 1, где воздействие ионизирующим излучением начинают через срок от примерно 5 дней до примерно 10 дней после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

4. Способ по любому из пунктов 1-3, где у субъекта не было рецидива в процессе, или непосредственно перед началом, воздействия ионизирующим излучением.

5. Способ по любому из пунктов 1-4, где заболевание или состояние представляет собой опухоль или рак.

6. Способ по любому из пунктов 1-5, где заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из рака крови, В-клеточных злокачественных новообразований, рака толстого кишечника, рака легкого, рака печени, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака яичника, рака кожи, меланомы, рака костей, рака головного мозга, рака яичника, эпителиальных форм рака, почечноклеточного рака, аденокарциномы поджелудочной железы, карциномы шейки матки, колоректального рака, глиобластомы, нейробластомы, саркомы Юинга, медуллобластомы, остеосаркомы, синовиальной саркомы, мезотелиомы, а также их сочетаний.

7. Способ по п. 6, где рак крови выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, лимфомы из клеток мантийной зоны и медленно растущей В-клеточной лимфомы.

8. Способ по любому из пунктов 1-7, где заболевание или состояние представляет собой множественную миелому.

9. Способ по любому из пунктов 1-8, где антиген представляет собой опухолевый антиген.

10. Способ по п. 9, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из BCMA, GPRC5D, FcRL5, тирозинкиназного рецептора-сироты ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена вируса гепатита В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, Erb-B2, Erb-B3, Erb-B4, FBP, эмбрионального ацетихолинового рецептора, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, KDR, легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-

молекулы клеточной адгезии, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, MUC16, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простатического специфического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, а также MAGE A3, CE7, антигена 1 опухоли Вильмса (WT-1), циклина и биотинилированных молекул.

11. Способ по любому из пунктов 1-10, где опухолевый антиген представляет собой BCMA.

12. Способ по любому из пунктов 1-11, где рекомбинантный рецептор представляет собой Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

13. Способ по любому из пунктов 1-11, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

14. Способ по п. 13, где CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывает антиген, и внутриклеточный сигнальный домен.

15. Способ по п. 14, где внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи.

16. Способ по п. 14 или 15, где внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

17. Способ по п. 16, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен CD28 или его часть, сигнальный домен 4-1BB или его часть, сигнальный домен OX40 или его часть, сигнальный домен ICOS или его часть, сигнальный домен DAP-10 или его часть, или их сочетание.

18. Способ по п. 17, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен 4-1BB или его часть.

19. Способ по любому из пунктов 10-18, где CAR дополнительно содержит трансмембранный домен.

20. Способ по п. 19, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8 или его часть, или трансмембранный домен CD28 или его часть.

21. Способ по п. 19 или 20, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен CD8 или его часть.

22. Способ по любому из пунктов 14-21, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv.

23. Способ по любому из пунктов 14-22, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи («V_H»), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1; V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3; CDR1 вариабельной области легкой цепи («V_L»), содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4; V_L CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

24. Способ по любому из пунктов 1-23, где клетка представляет собой Т-клетку.

25. Способ по п. 24, где Т-клетка выбрана из группы, состоящей из цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки, опухолеинфильтрирующего лимфоцита (ОИЛ) и Т-клетки - естественного киллера (NKT).

26. Способ по любому из пунктов 1-25, где клетка является аутологичной или аллогенной для субъекта.

27. Способ по любому из пунктов 1-26, где доза клеток включает клетки в количестве, достаточном для уменьшения тяжести заболевания или состояния у субъекта.

28. Способ по любому из пунктов 1-27, включающий введение субъекту последующей дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток после введения первой дозы экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

29. Способ по любому из пунктов 1-28, где ионизирующее излучение выбрано из группы, состоящей из внешнего ионизирующего излучения, радиофармацевтического средства и их сочетания.

30. Способ по любому из пунктов 1-29, где ионизирующее излучение представляет собой внешнее ионизирующее излучение.

31. Способ по любому из пунктов 1-30, где общей дозой по меньшей мере примерно 10 Гр ионизирующего излучения воздействуют на зону очага поражения у субъекта.

32. Способ по любому из пунктов 1-31, где общей дозой от примерно 10 Гр до примерно 30 Гр ионизирующего излучения воздействуют на зону очага поражения у субъекта.

33. Способ по любому из пунктов 1-32, где общей дозой примерно 20 Гр ионизирующего излучения воздействуют на зону очага поражения у субъекта.

34. Способ по любому из пунктов 1-33, где воздействие ионизирующим излучением и введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток обеспечивают синергический абскопальный эффект.

35. Способ по любому из пунктов 1-34, где воздействие ионизирующим излучением и введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток обеспечивают отсроченный или редуцированный СВЦ-подобный ответ.

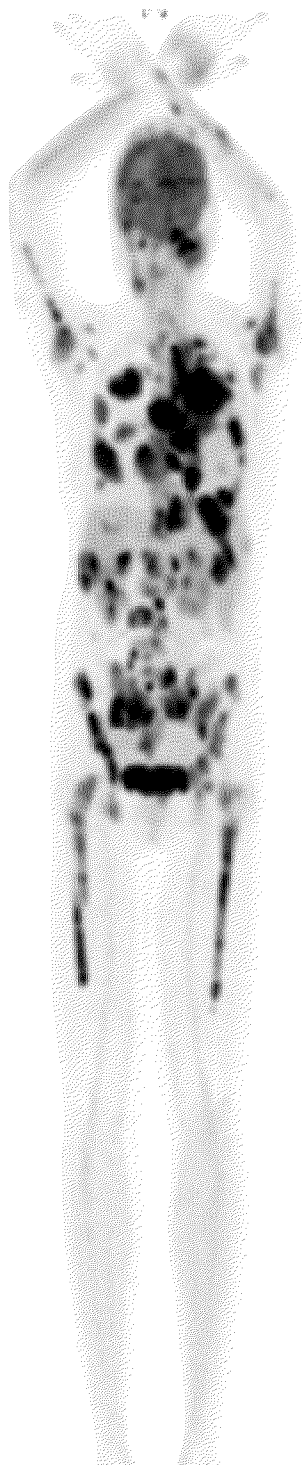
36. Способ по любому из пунктов 1-34, где воздействие ионизирующим излучением и введение экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток обеспечивают системное размножение новых клонов Т-клеточных рецепторов (TCR).

37. Ионизирующее излучение и клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, который связывает антиген, для применения в терапии, где воздействие ионизирующим излучением начинают не позднее, чем через примерно две недели после введения экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток.

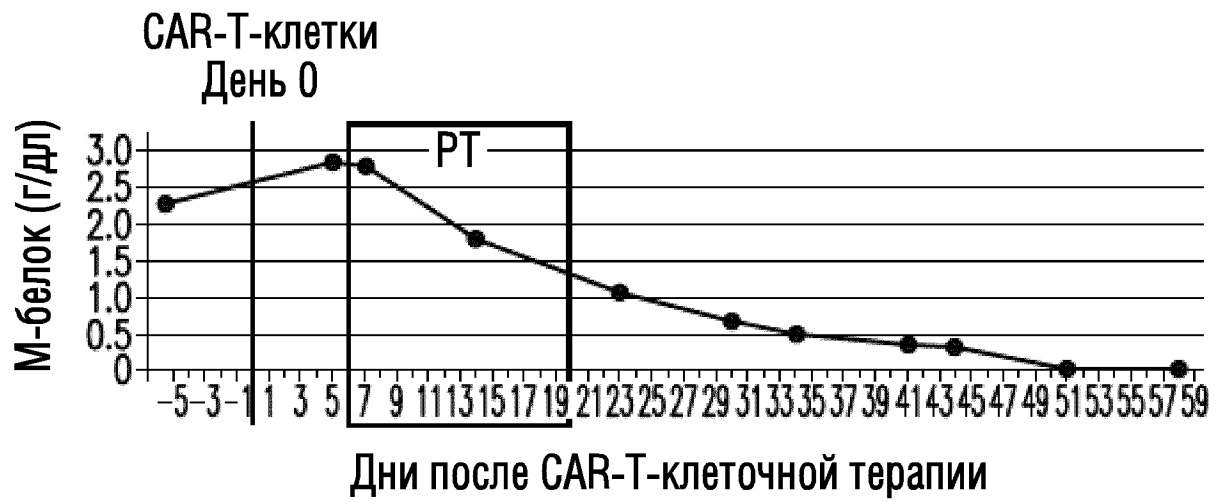
По доверенности

ФИГ.1А

До инфузии



ФИГ.1В

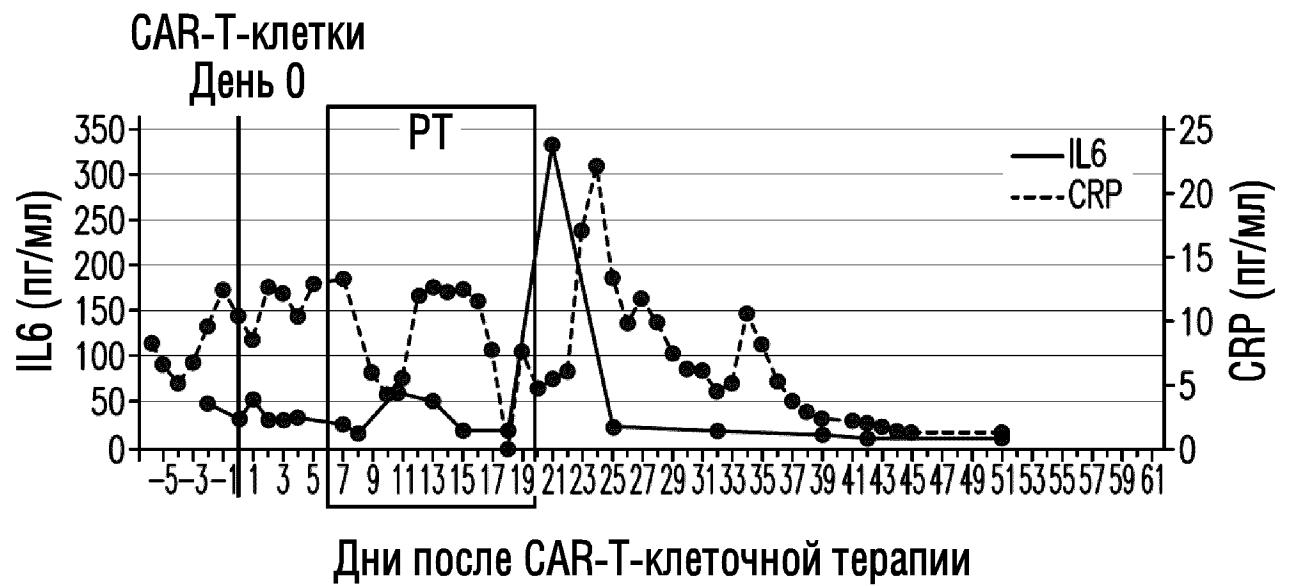


ФИГ.1С

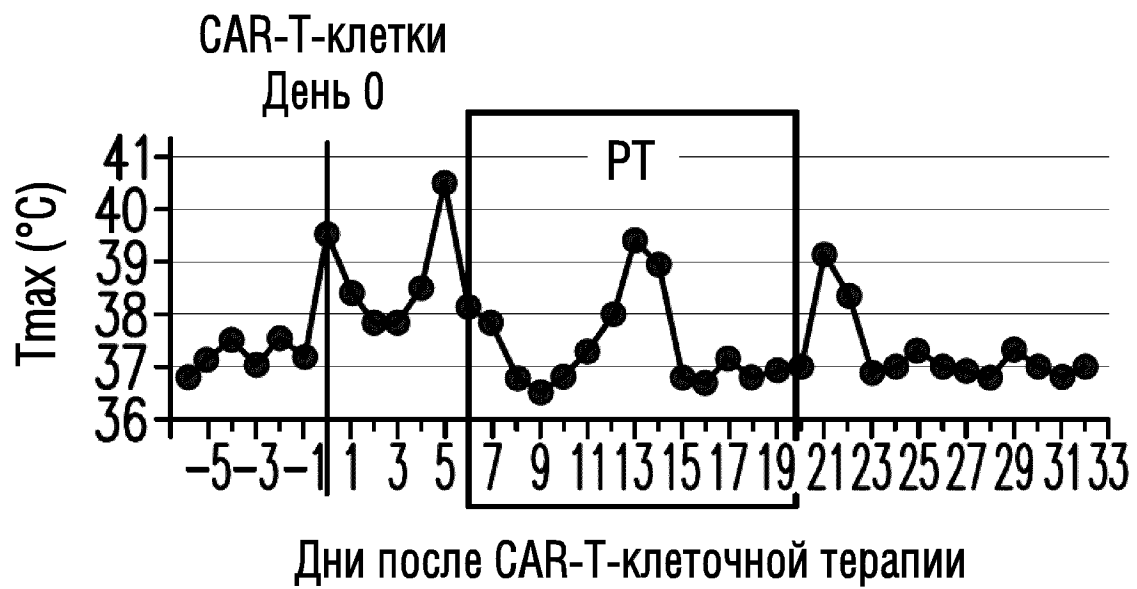
Через 8 недель



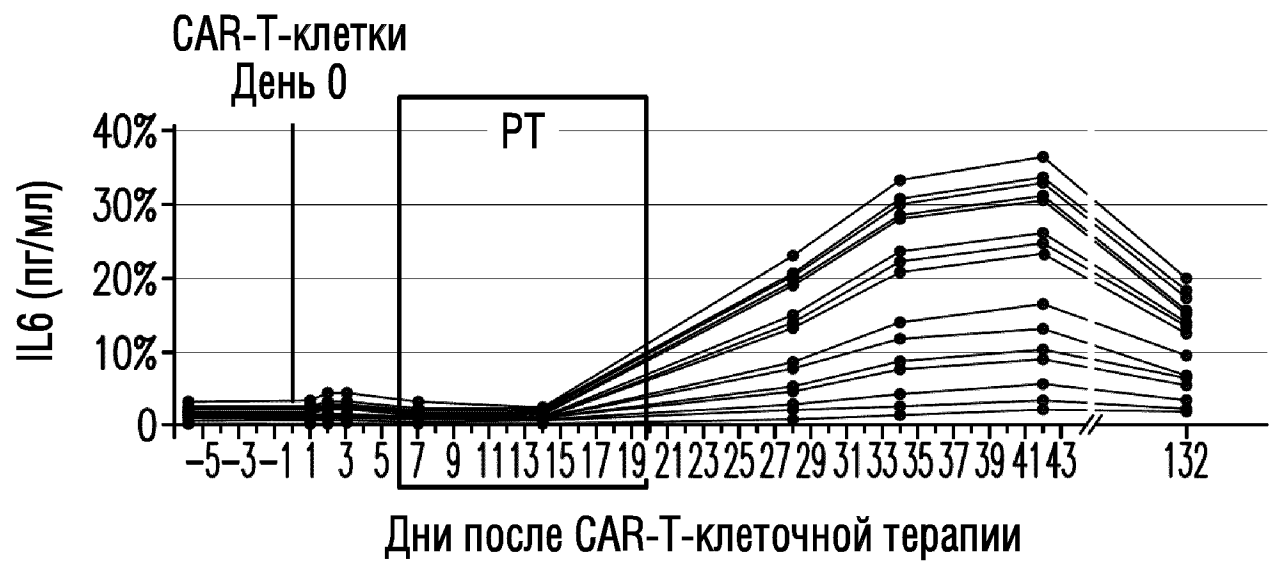
ФИГ.1D



ФИГ.1Е

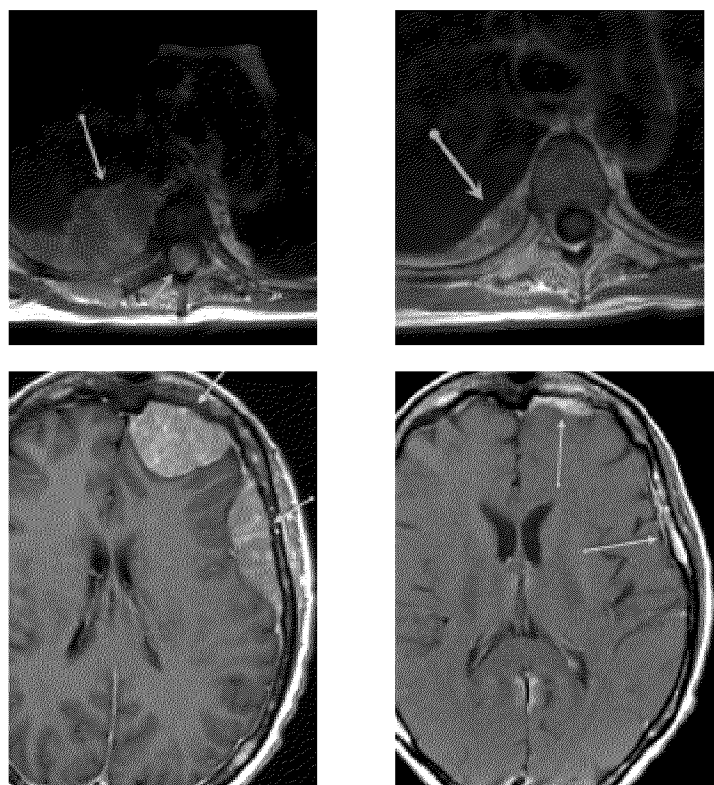


ФИГ.1F

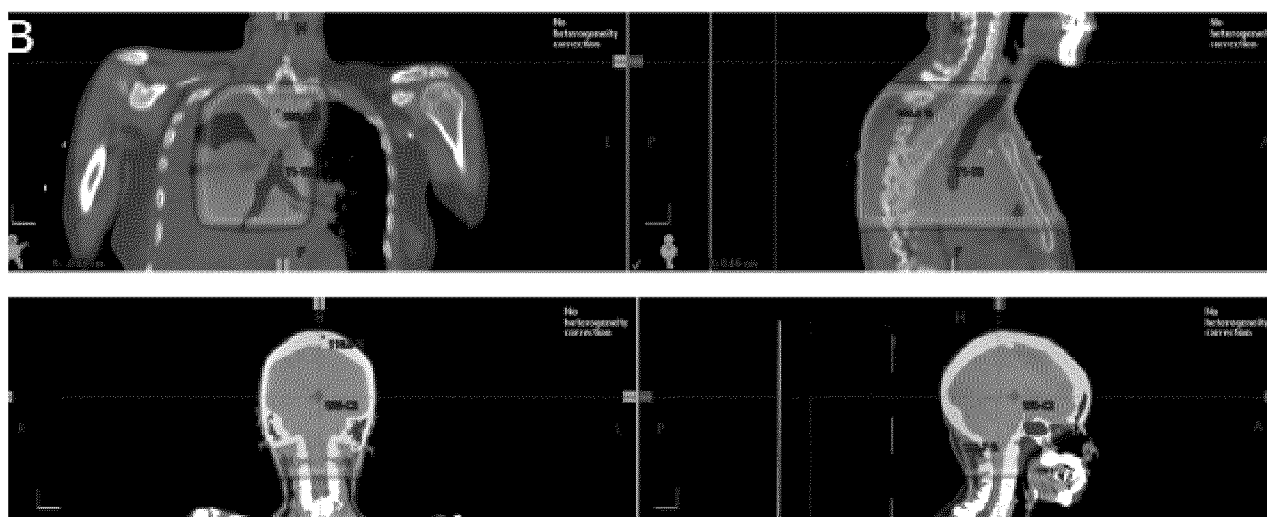


ФИГ.2А-2В

A



B



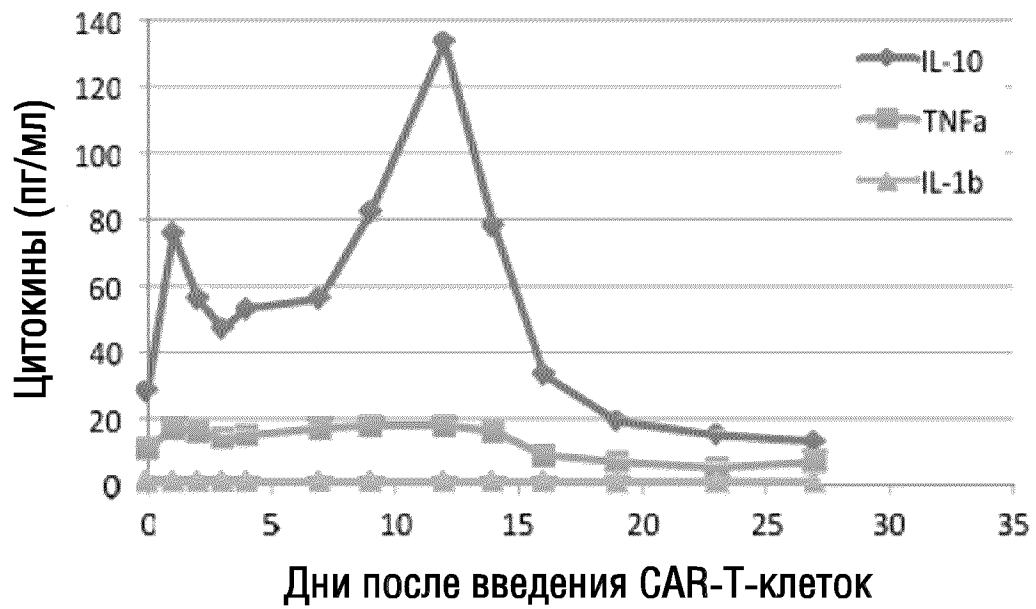
ФИГ.3А



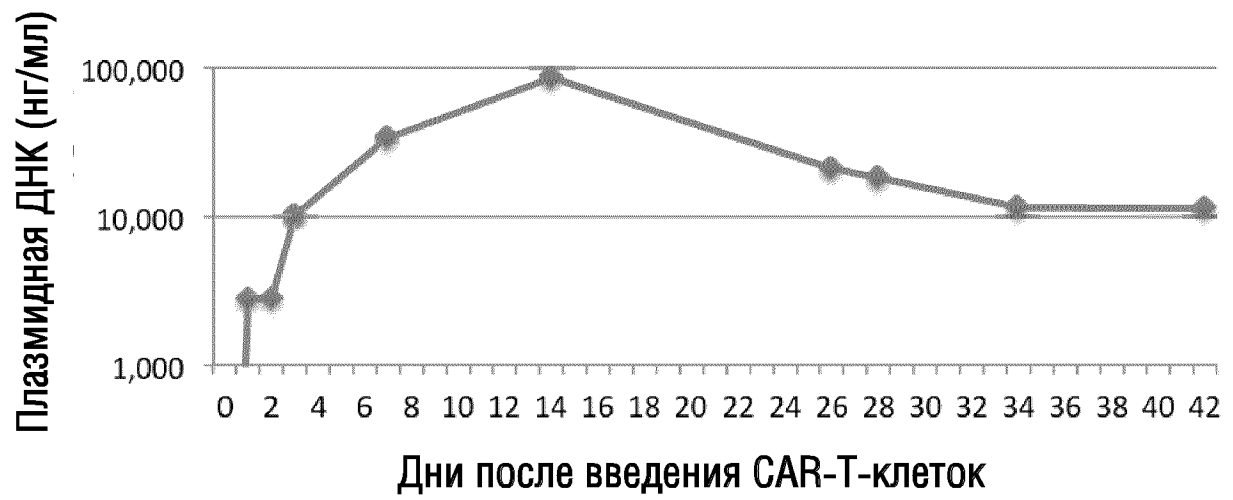
ФИГ.3В



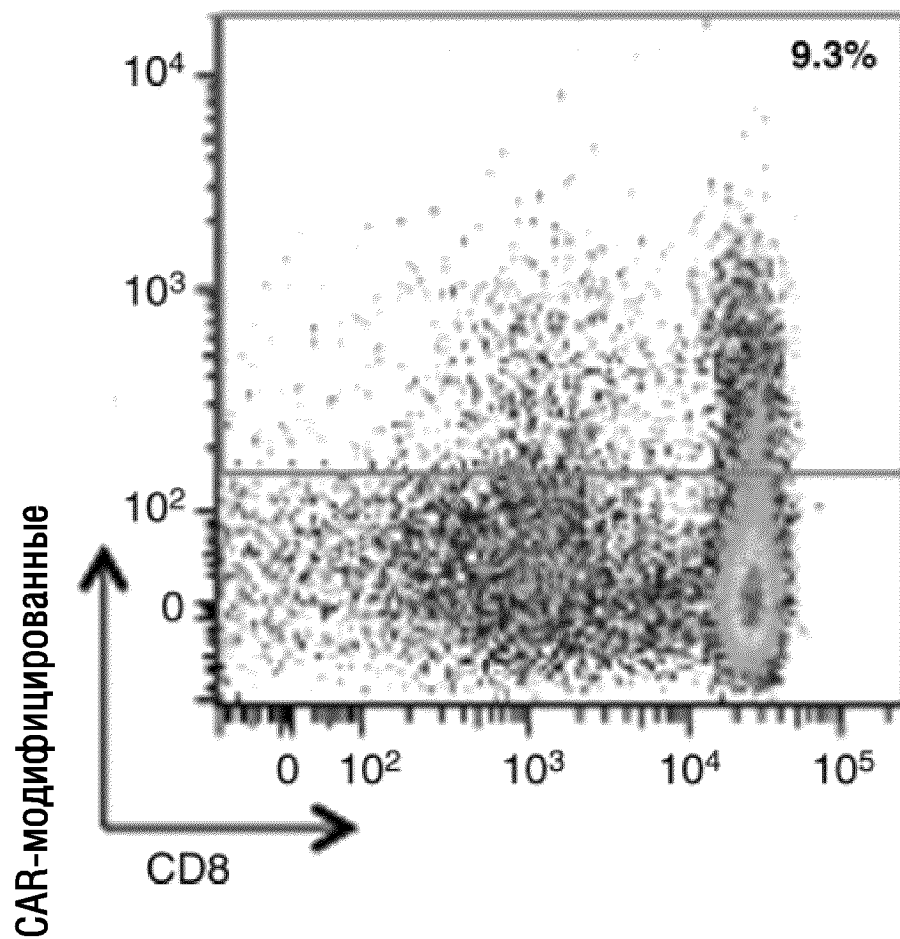
ФИГ.3С



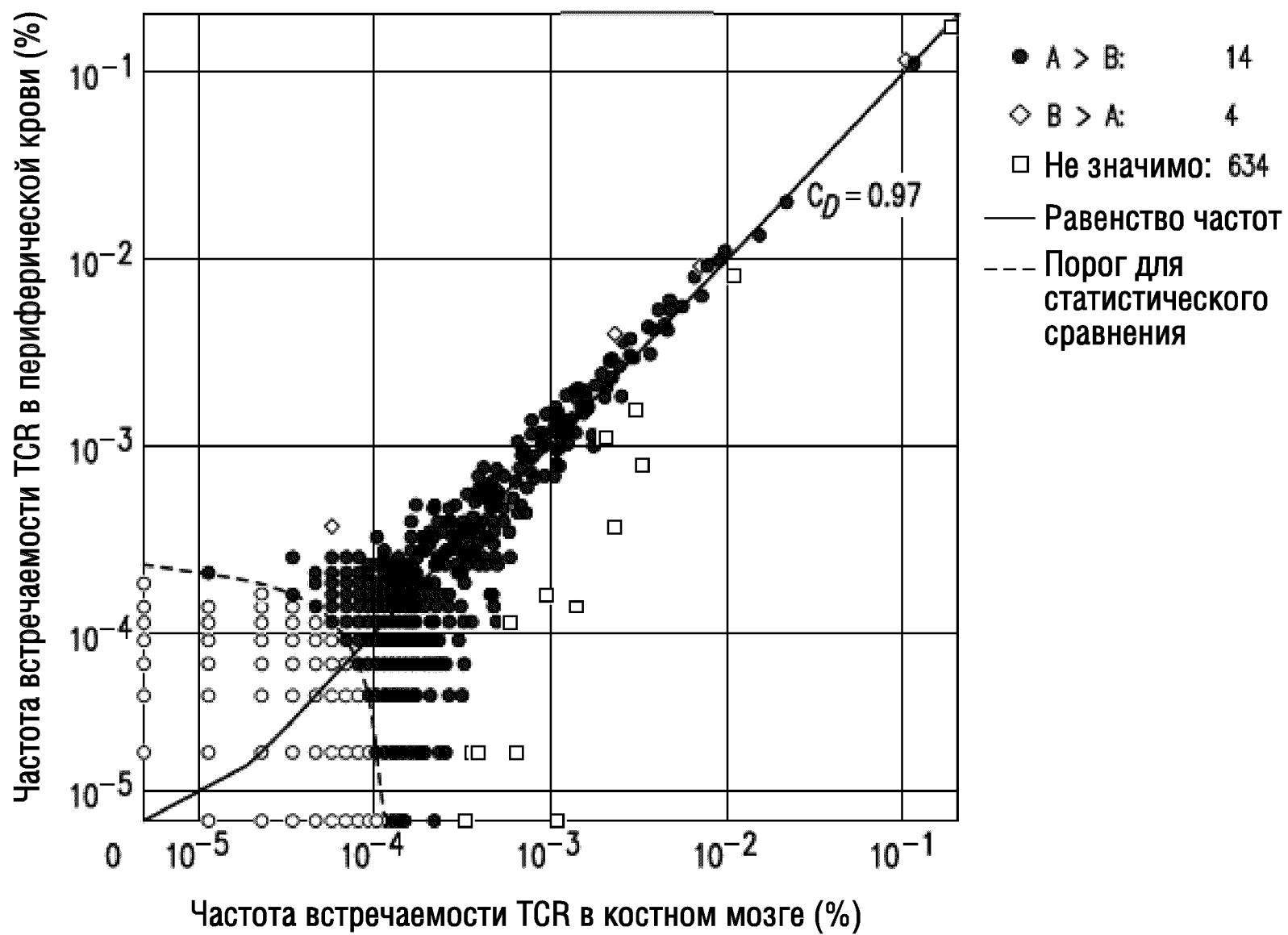
ФИГ.4



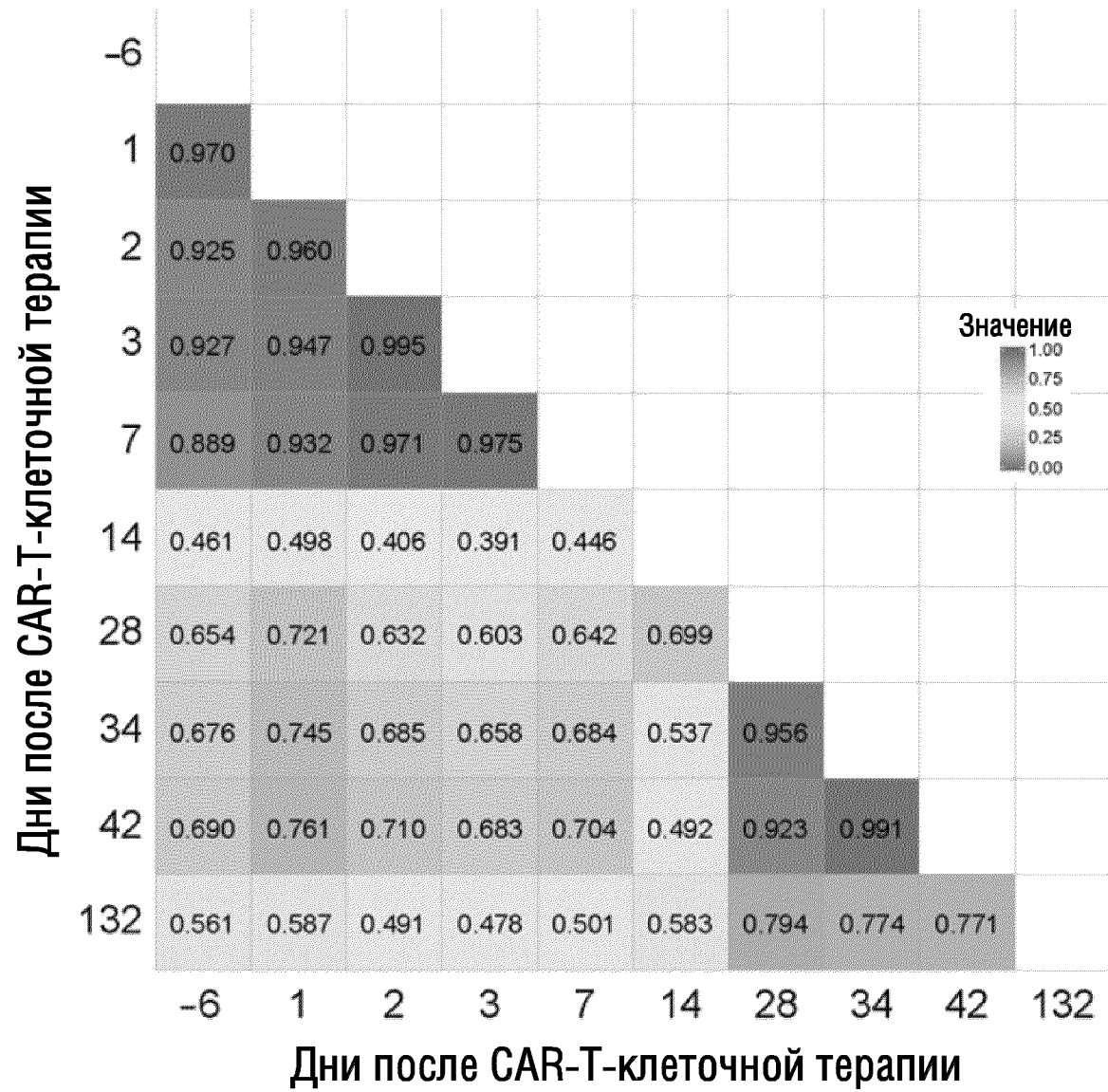
ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8

