

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291371** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.08.24

(22) Дата подачи заявки
2020.11.04

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) **ВСМА-НАЦЕЛЕННАЯ CAR-T-КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ
МИЕЛОМЫ**

(31) **62/931,065; 62/943,627**

(32) **2019.11.05; 2019.12.04**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/058788**

(87) **WO 2021/091945 2021.05.14**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Судайре Убани Энрике (US)

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В данном документе представлен способ лечения субъекта, имеющего онкологическое заболевание. Указанному субъекту вводят по меньшей мере одну дозу CAR-T-клеток - клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий полипептид. Указанный пептид содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен с по меньшей мере двумя ВСМА-связывающими фрагментами, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Доза CAR-T-клеток, вводимых указанному субъекту, составляет от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного субъекта. В качестве альтернативы, указанная доза содержит от 1×10^6 до 1×10^8 указанных CAR-T-клеток.

A1

202291371

202291371

A1

ВСМА-НАЦЕЛЕННАЯ CAR-T-КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

5

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 62/931065, поданной 05 ноября 2019 года, и предварительной заявки на патент США № 62/943627, поданной 04 декабря 2019 года, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и настоящим включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 30 октября 2020 года, называется «253505_000091_SL.txt» и имеет размер 9516 байт.

20

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Множественная миелома представляет собой агрессивное неопластическое нарушение, связанное с плазматическими клетками. Множественная миелома считается В-клеточным неопластическим нарушением, при котором В-клетки пролиферируют неконтролируемым образом в костном мозге. Симптомы включают в себя одну или большее число из следующего: гиперкальцемию, почечную недостаточность, анемию, костные нарушения, бактериальные инфекции, повышенная вязкость и амилоидоз. Множественная миелома все еще является неизлечимым заболеванием, несмотря на новые виды терапии, которые включают в себя ингибиторы протеасом, иммуномодулирующие лекарственные средства и моноклональные антитела, с которыми связаны более благоприятные исходы для пациентов. Поскольку для большинства пациентов характерны либо рецидив данного заболевания, либо

30

приобретенная рефрактерность к лечению, существует постоянная потребность в новых видах терапии множественной миеломы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5

[0004] В данном документе представлены улучшенные виды терапии для лечения множественной миеломы.

10 **[0005]** В одном аспекте данного изобретения представлен способ лечения субъекта, который имеет онкологическое заболевание, при этом указанный способ включает в себя введение указанному субъекту по меньшей мере одной дозы клеток, содержащих полипептид химерного антигенного рецептора (CAR), содержащий:

а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый связывающий фрагмент антитела против ВСМА и второй ВСМА-связывающий фрагмент;

15 б) трансмембранный домен; и

с) внутриклеточный сигнальный домен.

20 **[0006]** В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки размножают *in vitro* перед инфузии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки представляют собой Т-клетки, НК-клетки, iPSC-NK клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки представляют собой CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки представляют собой NKT-клетки, iPSC-Т-клетки или гамма-дельта Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки являются гетерологичными или аутологичными.

25 **[0007]** В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доза содержит от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ CAR-Т-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доза содержит от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных CAR-Т-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доза содержит от $4,0 \times 10^5$ до $6,0 \times 10^5$ CAR-Т-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления дозы содержится от $5,0 \times 10^5$ до $7,0 \times 10^5$ CAR-Т-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доза

30

вариантах осуществления данного изобретения доза содержит около $5,1 \times 10^7$, около $5,2 \times 10^7$, около $5,25 \times 10^7$, около $5,3 \times 10^7$, около $5,4 \times 10^7$, около $5,5 \times 10^7$, около $5,6 \times 10^7$, около $5,7 \times 10^7$, около $5,8 \times 10^7$ или около $5,9 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения доза содержит около $5,25 \times 10^7$ CAR-T-клеток.

- 5 **[0009]** В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В
- 10 некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $4,0 \times 10^5$ до $6,0 \times 10^5$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $5,0 \times 10^5$ до $7,0 \times 10^5$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых
- 15 вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $5,5 \times 10^5$ до $6,0 \times 10^5$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $6,0 \times 10^5$ до $8,0 \times 10^5$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления
- 20 данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $7,0 \times 10^5$ до $9,0 \times 10^5$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $8,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $5,0 \times 10^5$, около $6,0 \times 10^5$, около $7,0 \times 10^5$, около $8,0 \times 10^5$, около $9,0 \times 10^5$ или около $1,0 \times 10^6$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $7,1 \times 10^5$, около $7,2 \times 10^5$, около $7,3 \times 10^5$, около $7,4 \times 10^5$, около $7,5 \times 10^6$, около $7,6 \times 10^6$,
- 25 около $7,7 \times 10^6$, около $7,8 \times 10^6$ или около $7,9 \times 10^6$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта. В одном варианте осуществления данного изобретения клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $7,5 \times 10^5$ CAR-T-клеток на килограмм массы тела субъекта.
- 30

[0011] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения дозу CAR-T-клеток вводят только один раз во время курса лечения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения дозу CAR-T-клеток вводят внутривенно. В различных вариантах осуществления данного изобретения онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множественная миелома представляет собой рефрактерную множественную миелому или рецидивирующую множественную миелому.

[0012] В различных вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,0.

[0013] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 20% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 25% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 30% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 35% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

- эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 40% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 3% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 5% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 6% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 10% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 15% от общего количества CAR+ Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток.
- 5
- 10
- 15 **[0014]** В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 3,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 2,0. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 1,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 0,8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 0,6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 0,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-Т-клеток при Smax и CD8+ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 0,3.
- 20
- 25
- 30 **[0015]** В различных вариантах осуществления вышеуказанного представленный способ дополнительно включает в себя анализ количества CD4+ CAR-Т-клеток и (или) CD8+ CAR-Т-клеток у субъекта.

[0016] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 75% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 80% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 85% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 90% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы.

[0017] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя анализ соотношения количества центральных CAR+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ Т-клеток у субъекта после введения дозы.

[0018] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 2% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 3% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 5% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 8% от общего количества CAR+ Т-клеток после введения дозы.

[0019] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя анализ соотношения количества эффекторных CAR+ Т-клеток и общего количества CAR+ Т-клеток у субъекта после введения дозы.

[0020] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 30% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки

памяти составляют по меньшей мере 50% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 70% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax
5 после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 80% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

[0021] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества
10 центральных CAR+ CD8+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы.

[0022] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 2% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения
15 эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 5% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 8% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти
20 составляют по меньшей мере 10% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

[0023] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества эффекторных CAR+ CD8+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы.

[0024] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 5% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки
25 памяти составляют по меньшей мере 8% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по
30 меньшей мере 10% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax

после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 15% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы.

5 [0025] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества центральных CAR+ CD4+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы.

10 [0026] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества эффекторных CAR+ CD4+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы, при этом указанные эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 70% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 75% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 80% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 90% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют 70-80%, 70-85%, 71-86%, 72-87%, 73-88%, 74-89%, 75-90%, 76-91%, 77-92%, 78-93%, 80-90%, 82-92%, 84-94%, 86-96%, 88-98% или 90-100% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

25 [0027] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества эффекторных CAR+ CD4+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы.

30 [0028] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент и (или) второй ВСМА-связывающий фрагмент представляют собой однодоменное антитело (одАт, англ. «sdAb») против ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой первое одАт против ВСМА, и второй ВСМА-связывающий

фрагмент представляет собой второе одАт против ВСМА. В определенных вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент содержит следующую

аминокислотную последовательность:

QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDIS

5 TSYADSVKGRFTISRDNAAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления данного

изобретения указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент содержит полипептид, кодируемый

следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

10 CAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTG
CGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCTGGT
TTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGGCTGGAGGG

ACATCTCCACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGA

CAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACAC

CGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCTCTGG

15 GGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 2).

[0029] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент содержит следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYY

20 AESVKGRFTISRDNANKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ
VTVSS (SEQ ID NO: 3). В определенных вариантах осуществления данного

изобретения указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент содержит полипептид,

кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGGAGGCTCTCTG

25 AGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACAATGGGCTGGTTTAGGCAG
GCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTG

GCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCCGCGATAACGCCA

AGAATACAGTGGTGCTGCAGATGAACTCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGT

ACTATTGTGCCCGCCGATCGGAAGAGCGTGATGAGCATTAGACCAGACTATTGGGG

30 GCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 4).

[0030] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент и указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент связаны друг с другом с помощью пептидного линкера. В определенных вариантах

осуществления данного изобретения указанный пептидный линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GGGGS (SEQ ID NO: 5).

[0031] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид CAR дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце указанного полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный пептид получен из CD8 α . В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный пептид содержит следующую аминокислотную последовательность: MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 6). В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный пептид содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты: ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCT (SEQ ID NO: 7).

[0032] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный трансмембранный домен содержит следующую аминокислотную последовательность: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8).

[0033] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный трансмембранный домен содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты: ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGC (SEQ ID NO: 9).

[0034] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен эффекторной иммунокомпетентной клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит один или большее число костимулирующих сигнальных доменов. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит следующую аминокислотную последовательность: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (SEQ ID NO: 10).

[0035] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный
внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, кодируемый следующей
5 последовательностью нуклеиновой кислоты:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAAC
CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG
10 TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
CTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 11). В определенных вариантах осуществления

данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит
следующую аминокислотную последовательность:

15 KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12). В

определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный
внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, кодируемый следующей
последовательностью нуклеиновой кислоты:

20 AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA
GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA
GAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 13).

[0036] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный
полипептид CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между
25 С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного
домена. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный
шарнирный домен содержит следующую аминокислотную последовательность:

TTTTAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 15). В

определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный шарнирный
домен содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью
30 нуклеиновой кислоты:

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGAC
ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 14).

[0037] В различных вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки представляют собой аутологичные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки представляют собой аллогенные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект представляет собой человека.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0038] На **фиг. 1** показана экспрессия антигена ВСМА на поверхности клеток герминального центра (ГЦ), клеток памяти и плазмбластов в лимфатическом узле, долгоживущих плазматических клеток в костном мозге из лимфатического узла (ЛЮ) и лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), и на клетках множественной миеломы. Антиген BAFF-R не экспрессируется на клетках-плазмбластах, долгоживущих плазматических клетках или на клетках множественной миеломы. TACI экспрессируется на клетках памяти и клетках-плазмбластах, долгоживущих плазматических клетках и на клетках множественной миеломы. CD138 экспрессируется только на долгоживущих плазматических клетках и на клетках множественной миеломы.

[0039] На **фиг. 2A** показана конструкция LCAR-B38M CAR. LCAR-B38M содержит два домена VHH, соединенные с помощью линкера, в отличие от одного домена VL и одного домена VH, обнаруживаемых на различных других CAR. LCAR-B38M содержит внутриклеточные домены CD137 и CD3 ζ человека. На **фиг. 2B** представлена схема получения вируса, кодирующего LCAR-B38M CAR, трансдукции указанного вируса в Т-клетку, полученную из организма пациента, а затем получения CAR-Т-клеток, экспрессирующих LCAR-B38M.

[0040] На **фиг. 3** представлена схема плана исследования MY2001 для CAR-Т-клеток LCAR-B38M (LCAR-B38M). Популяция пациентов включает в себя группы с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой, с 3 предшествующими линиями лечения или дважды рефрактерной к ингибиторам протеасом (ИП) / иммуномодулирующим лекарственным препаратам (IMiD) и с предшествующим воздействием ИП, IMiD, α CD38. Первичной целью является исследование безопасности и определение рекомендованной дозы для фазы II (RP2D), например, изучение частоты и тяжести нежелательных явлений (фаза 1b). Другой первичной целью является исследование эффективности: определение общей частоты клинического ответа (ORR)

– частичного клинического ответа (PR) или более благоприятного клинического ответа, как определено Международной группой по изучению множественной миеломы (IMWG) (фаза 2). Ниже приведены вторичные цели: определение частоты и тяжести нежелательных явлений (фаза 2), оценка иммуногенности, оценка результата лечения на основании опроса пациентов (PRO) после лечения и оценка качества жизни, связанного с состоянием здоровья (HRQoL), определение характеристик фармакокинетики (ФК) и фармакодинамики (ФД), и определение любых дополнительных характеристик эффективности.

5
10 [0041] На **фиг. 4** обобщенно представлен клинический ответ в исследовании ММУ2001, описанном на **фиг. 3**. На графике показаны результаты пациентов данного исследования по отдельности, а также показаны интервалы лечения и явления.

15 [0042] На **фиг. 5А** и **фиг. 5В** обобщенно представлен предварительный статус относительно минимального остаточного заболевания (MRD) для каждого пациента из данного исследования на 28-е, 56-е, 184-е и 365-е сутки. Записи, выделенные жирным шрифтом, отображают отрицательный статус MRD, записи, выделенные рамкой, отображают положительный статус MRD, и «неопред.» означает неопределенный статус MRD. СНП (англ. «NGS») означает секвенирование нового поколения по технологии ClonoSeq, а П (англ. «F») означает анализ методом проточной цитометрии.

20 [0043] На **фиг. 6** обобщенно представлены результаты трансляционного исследования для CAR-T-клеточной терапии в исследовании ММУ2001.

[0044] На **фиг. 7** обобщенно представлены анализы различных биомаркеров, проведенные в исследовании ММУ2001.

25 [0045] **Фиг. 8А** представляет собой график, показывающий результаты анализа кПЦР в отношении числа копий трансгена на микрограмм гДНК для каждого пациента в исследовании ММУ2001. Из данного графика можно определить S_{max} и время достижения максимального пика (T_{max}). S_{max} имеет высокую вариабельность среди пациентов, тогда как показатель T_{max} является постоянным среди пациентов. Пустые точки указывают на то, что число CAR+ Т-клеток у 11 из 16 пациентов, которые прошли по меньшей мере восемь недель последующего наблюдения, меньше нижнего
30 предела количественного определения (НПКО, англ. «LLOQ») (5 клеток/мкл; диапазон 2 - 7).

[0046] **Фиг. 8В** представляет собой график, показывающий результаты анализа методом проточной цитометрии в отношении процентного содержания CD3+ CAR+ Т-клеток в общей фракции Т-клеток для каждого пациента в исследовании ММУ2001. Из данного графика можно определить S_{max} и время достижения максимального пика (T_{max}). S_{max} имеет высокую вариабельность среди пациентов, тогда как T_{max} является постоянным среди пациентов. Пустые точки указывают на то, что число CAR+ Т-клеток у 11 из 16 пациентов, которые прошли по меньшей мере восемь недель последующего наблюдения, составляет меньше чем 5 клеток/мкл; диапазон 2 - 7).

[0047] **Фиг. 8С** представляет собой график, показывающий результаты анализа методом проточной цитометрии в отношении числа CAR+ CD3 Т-клеток на микролитр для каждого пациента в исследовании ММУ2001. Из данного графика можно определить S_{max} и время достижения максимального пика (T_{max}). S_{max} имеет высокую вариабельность среди пациентов, тогда как T_{max} является постоянным среди пациентов. Пустые точки указывают на то, что число CAR+ Т-клеток у 11 из 16 пациентов, которые прошли по меньшей мере восемь недель последующего наблюдения, составляет меньше чем 5 клеток/мкл; диапазон 2 - 7).

[0048] На **фиг. 9А** показаны результаты анализа, указывающие на то, что увеличение числа и персистенция bb2121 CAR-Т являются дозозависимыми. При концентрации $5,0 \times 10^7$ клетки не персистировали выше НПКО через 2 месяца. Более высокое персистенция наблюдалось при концентрациях $1,50 \times 10^8$ - $8,00 \times 10^8$ клеток.

[0049] На **фиг. 9В** показаны результаты анализа персистенция LCAR-B38М при концентрации $5,25 \times 10^7$ клеток, что соответствует $0,75 \times 10^6$ CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток/кг. Персистенция аналогично таковому, наблюдающемуся при концентрации $5,0 \times 10^7$ клеток в анализе bb2121, представленному на **фиг. 9А**.

[0050] **Фиг. 10А** и **фиг. 10В** представляют собой графики, показывающие персистенция по сравнению с показателем увеличения числа CAR-Т-клеток. Ось X графика, представленного на **фиг. 10А**, отображает S_{max} из анализа CAR+ Т-клеток в процентах от Т-клеток. Ось X графика, представленного на **фиг. 10В**, отображает S_{max} из анализа числа копий трансгена на микрограмм гДНК. Степень увеличения числа CAR-Т-клеток не прогнозирует их персистенция.

[0051] **Фиг. 11А** представляет собой график, на котором показаны значения S_{max} (как определено на основании числа копий векторного трансгена на микрограмм геномной ДНК) для пациентов, отвечающих на терапию bb2121 CAR-T-клетками, и для пациентов, не отвечающих на данную терапию. Можно видеть взаимосвязь между S_{max} и ответом на bb2121.

[0052] На **фиг. 11В** представлены графики, на которых показаны значения S_{max} (на основании определения как методом кПЦР, так и с помощью анализа методом проточной цитометрии) для различных классов пациентов, отвечающих на терапию LCAR-B38M CAR-T-клетками (стабильное заболевание (SD); PR, VGPR, CR и sCR). В отличие от bb2121, отсутствует корреляция между клиническим ответом и как S_{max} , так и персистенцией.

[0053] На **фиг. 11С** представлены графики, на которых показано соотношение дважды положительных (ДП) CD4/CD8 по сравнению с числом копий/микрограмм ДНК. **Фиг. 11D** представляет собой график процентного содержания CD3 при S_{max} по сравнению с соотношением ДП CD4/CD8. Соотношение ДП CD4/CD8 не коррелировало с увеличением числа клеток.

[0054] На **фиг. 12** представлены графики, на которых показано процентное содержание CD3 при S_{max} по сравнению с опухолевой нагрузкой. Данные результаты показывают, что опухолевая нагрузка не коррелирует с увеличением числа LCAR-B38M (S_{max}).

[0055] На **фиг. 13А** представлены графики, на которых показана концентрация клеток CD3 на микролитр при S_{max} по сравнению с опухолевой нагрузкой. Данные результаты показывают, что опухолевая нагрузка не коррелирует с увеличением числа LCAR-B38M (S_{max}).

[0056] На **фиг. 13В** представлены графики, на которых показано число копий трансгена на микрограмм гДНК при S_{max} по сравнению с опухолевой нагрузкой. Данные результаты показывают, что опухолевая нагрузка не коррелирует с увеличением числа LCAR-B38M, на что указывает S_{max} .

[0057] **Фиг. 14А** представляет собой график, на котором показано соотношение CD4:CD8 при пиковом увеличении числа CAR T-клеток (ось Y) по сравнению с соотношением CD4:CD8 в конечном клеточном продукте bb2121 (ось X). Конечный CAR-T-клеточный продукт bb2121 состоял из вариабельной доли CAR+ CD4 и CD8 T-

клеток, с медианой в 85% (диапазон от 42 до 98) CAR+ CD4+ T-клеток и с 13% (диапазон от 2 до 47) CAR+ CD8+ T-клеток. Соотношение CD4:CD8 в ДП клетках составляет 6,54. Наблюдали корреляцию между соотношением CAR+ CD4:CD8 T-клеток в конечном продукте и соотношением, наблюдаемым при пиковом увеличении числа клеток.

[0058] Фиг. 14В представляет собой график, на котором показано соотношение CD4:CD8 при пиковом увеличении числа CAR T-клеток (ось Y) по сравнению с соотношением CD4:CD8 в лекарственном продукте (ЛП) CART+ (ось X). Медиана соотношения CD4:CD8 в ДП клетках составляет 1,54. Медиана соотношения CD4:CD8 в указанных клетках при Smax составляет 0,35.

[0059] Фиг. 15 представляет собой график, на котором показано соотношение CD4:CD8 для LCAR-B38M у различных пациентов в исследовании MMY2001 в определенные сутки до и после инфузии (нулевые сутки). У большинства пациентов соотношение CD4:CD8 составляло меньше чем 1 на пике увеличения числа клеток.

[0060] На фиг. 16А - 16С показано, что LCAR-B38M обогащается в CD8 CAR+ T-клетках на пике увеличения числа клеток в костном мозге. **Фиг. 16А** представляет собой график, на котором показано соотношение CD4/CD8 в периферической крови при Smax CART по сравнению с соотношением CD4/CD8 в ЛП CART+. **Фиг. 16В** представляет собой график, на котором показано соотношение CD4/CD8 в костном мозге соотношение CD4/CD8 при Smax CART по сравнению с соотношением CD4/CD8 в ЛП CART+. **Фиг. 16С** представляет собой график, на котором показана корреляция между соотношением CD4/CD8 в периферической крови и данным соотношением в костном мозге на 28-е сутки (пик увеличения числа клеток).

[0061] На фиг. 17 показаны изменения фенотипа при различных стадиях дифференцировки T-клеток: наивные клетки, стволовые клетки памяти (Tscm), центральные клетки памяти (Tcm), эффекторные клетки памяти (Tem), эффекторные клетки (Teff) и эффекторные RA-клетки памяти (Temra). Активация и дифференцировка T-клеток коррелировали с повышенной зависимостью от гликолиза и повышенным митохондриальным мембранным потенциалом, причем оба указанных показателя могут опосредовать эффекторную функцию T-клеток в ответ на онкологическое заболевание. Изображение предоставлено Kiston, R.J. et al., Cell Metabolism, 2017, 26 (1): 94 - 109.

[0062] На **фиг. 18** показаны фенотипические маркеры для каждого из подмножеств Т-клеток в LCAR-B38M CAR-T. Стволовые клетки памяти (Tscm) характеризуются как CCR7+, CD45RO- и CD95+. Центральные клетки памяти (Tcm) характеризуются как CCR7+ и CD45RO+.

5 **[0063]** На **фиг. 19** показаны результаты фенотипической характеристики клеток пациентов в исследовании (в ММУ2001) до инфузии в -57-е и -7- сутки, и после инфузии ММУ2001 CAR-T-клеток в 14-е, 21-е, 28-е и 56-е сутки. Фенотипы как клеток CAR-T+, так и клеток CAR-T- были охарактеризованы на 14-е, 21-е, 28-е и 56-е сутки. Очевидно, что клетки CAR-T+ по существу более обогащены центральными клетками
10 памяти (Tcm) по сравнению с клетками CAR-T-. С 21-х суток по 28-е и 56-е сутки клетки CAR-T+ становятся более обогащенными стволовыми клетками памяти (Tscm) по сравнению с обогащением клетками Tcm.

[0064] На **фиг. 20A** показаны результаты фенотипической характеристики CD8 Т-клеток (CD27+) различных пациентов в исследовании ММУ2001 при Smax. У
15 большинства пациентов большинство CAR+ CD8+ Т-клеток при Smax представляют собой клетки центральной памяти. На **фиг. 20B** показаны результаты фенотипической характеристики CD4 Т-клеток различных пациентов в исследовании ММУ2001 при Smax. Большинство CAR+ CD4+ Т-клеток при Smax представляют собой эффекторные клетки памяти. **Фиг. 20C** представляет собой график, на котором показано процентное
20 содержание клеток, которые характеризуются как CD8+ CD45RO- CD27+ и прогнозируют клинический ответ. Пациенты с полным клиническим ответом (CR) или с частичным клиническим ответом при измененном заболевании (PRTD) имели более высокое процентное содержание клеток CD8+ CD45RO- CD27+, чем пациенты с частичным клиническим ответом (PR) или без клинического ответа (NR). **Фиг. 20C** с
25 изменениями приведена из работы Fraietta et al., 2018 *Nature Medicine* 24, 563 - 71. На **фиг. 20D** представлены графики, на которых показана корреляция процентного содержания стволовых CD8 Т-клеток памяти (левая панель) или наивных Т-клеток (правая панель) у каждого пациента; представленные данные сгруппированы по клиническому ответу.

30 **[0065]** На **фиг. 21A** представлены графики, на которых показано процентное содержание клеток, представляющих собой клетки множественной миеломы (ММ), по сравнению с общими уровнями лейкоцитов на протяжении периода данного исследования. На данной фигуре указаны CD38+ клетки ММ и CD38dim клетки ММ.

На **фиг. 21В** представлены графики, на которых показан уровень МЭРФ для указанного антигена и процентное содержание антиген-положительных клеток ММ, исследованные в популяциях лейкоцитов CD38+ и CD38dim, ВСМА и GPRC5D, на протяжении периода данного исследования. На данной фигуре указаны клетки CD38+ 5 ВСМА, клетки CD38dim ВСМА, клетки CD38+ GPRC5D и клетки CD38dim GPRC5D. На **фиг. 21С** представлен график, на котором показано процентное содержание PD1+ CAR+ CD8+ Т-клеток (в процентах от CD8 CAR), и график, на котором показано содержание Treg в процентах от CD4 Т-клеток, оба параметра – у отдельных пациентов на протяжении периода данного исследования. Данные результаты дают представление 10 об истощении CAR-T и их и регуляторных механизмах.

[0066] На **фиг. 22** представлены данные, показывающие, что аналогично bb2121, увеличение числа LCAR-B38M (измеренное на основании Ctmax копий трансгена на микрограмм геномной ДНК) коррелирует со степенью тяжести синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ, англ. «CRS»).

15 **[0067]** На **фиг. 23** представлены два графика, на которых указано количество каждого из двух провоспалительных цитокинов сыворотки крови – ИЛ-6 и ИФН- γ – у отдельных субъектов на протяжении периода данного исследования. Количество ИЛ-6 увеличилось у большинства пациентов после инфузии.

20 **[0068]** На **фиг. 24** представлены два графика, на которых указано количество каждого из двух провоспалительных цитокинов сыворотки крови – ИЛ-10 и ФНО- α – у отдельных субъектов на протяжении периода данного исследования. Количество обоих цитокинов увеличилось у большинства пациентов после инфузии.

25 **[0069]** На **фиг. 25** представлены два графика, на которых указано количество каждого из двух провоспалительных цитокинов сыворотки крови – ИЛ-2 и ИЛ-2Ra – у отдельных субъектов на протяжении периода данного исследования.

[0070] На **фиг. 26А** представлен график, на котором показано, что уровни цитокина ИЛ-6 сыворотки крови коррелируют с СВЦ. На **фиг. 26В** представлен график, на котором показано, что уровни цитокина ИЛ-6 сыворотки крови не коррелируют с клиническими ответами.

30 **[0071]** На **фиг. 27** представлены данные, показывающие, что Ctmax ИЛ-6 в сыворотке крови может коррелировать с пиком LCAR-B38M. Левая панель представляет собой

фигуру, которая с изменениями приведена из работы из Fraietta et al., 2018 *Nature Medicine* 24, 563 - 71.

5 [0072] На **фиг. 28** представлены данные, показывающие, что уровни исходного sBCMA не коррелируют с исходным процентным содержанием опухолевых клеток костного мозга.

[0073] На **фиг. 29** представлена схема лечения с помощью LCAR-B38M и показано, что LCAR-B38M представляет собой «живое лекарственное средство» в динамической среде каждого отдельного пациента.

10 [0074] На **фиг. 30** показано, что LCAR-B38M представляет собой CAR-T-клеточный терапевтический агент с двумя доменами, нацеленными на BCMA. См. работы D'Agostino *Curr Hematol Malig Rep.* 2017; 12: 344; O'Connor *J Exp Med.* 2004; 199: 91; Friedman *Hum Gene Ther.* 2018; 29: 585. Sanchez *Br J Haematol* 2012; 158: 727. BCMA = антиген созревания В-клеток; CD = кластер дифференциации; MM = множественная миелома; NKG2D = группа 2D естественных киллеров; SLAMF7 = представитель 7
15 семейства сигнальных молекул – лимфоцитарных активаторов; VHH = одиночный переменный домен на тяжелой цепи.

[0075] На **фиг. 31** представлена общая частота ответа при воздействии с помощью LCAR-B38M. a: PR или более благоприятный ответ; на основании анализа, проведенного независимой комиссией; b: Ни у одного пациента не было стабильного
20 заболевания или прогрессирующего заболевания в качестве наилучшего ответа. CR = полный ответ; ORR = общая частота ответа; CNP = секвенирование нового поколения; PR = частичный ответ; sCR = строгий полный ответ; VGPR = очень благоприятный частичный ответ.

25 [0076] **Фиг. 32** показывает, что лекарственный продукт LCAR-B38M обогащен эффекторными Т-клетками памяти. T_{cm} = центральная Т-клетка памяти; T_{em} = эффекторная Т-клетка памяти; T_{emga} = терминально-дифференцированная Т-клетка; T_n = наивная Т-клетка.

[0077] **Фиг. 33** показывает, что LCAR-B38M демонстрирует переменные показатели увеличения числа и персистенции. Обнаруживаемое персистенция в
30 периферической крови. гДНК = геномная ДНК; НПКО = нижний предел количественного определения.

[0078] На **фиг. 34** показаны устойчивые ответы после потери персистенции LCAR-B38M в крови.

[0079] **Фиг. 35** показывает, что увеличение числа и персистенция не связаны с наиболее благоприятным ответом. $T_{\text{последн.}}$ = последние сутки исследования, когда уровни CAR-T-клеток превышают НПКО.

[0080] **Фиг. 36** показывает предпочтительное увеличение числа CAR+ CD8 T-клеток в крови и костном мозге. ЛП = лекарственный продукт до инфузии; ЦК = цельная кровь.

[0081] На **фиг. 37** показано, что фенотип CAR-T-клеток памяти может быть связан с клинической активностью. ¹ Blaeschke Cancer Immunol Immunother 2018; 67: 1053. Tscm = стволовая центральная T-клетка памяти.

[0082] На **фиг. 38** показано, что для LCAR-B38M характерно предпочтительное увеличение числа центральных CD8 T-клеток памяти. Анализ проведен на пике увеличения числа клеток.

[0083] На **фиг. 39** показано, что ответы не зависят от исходного уровня экспрессии ВСМА. МЭРФ (англ. «MESF») = молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома.

[0084] На **фиг. 40** представлены выводы для LCAR-B38M из исследования MMY2001.

[0085] На **фиг. 41** показаны устойчивые ответы после потери персистенции LCAR-B38M в крови.

[0086] На **фиг. 42** показано соотношение CAR+ CD4/CD8 при S_{max} T-клеток (T_{max}).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0087] Описание иллюстративных вариантов осуществления данного изобретения приведено ниже.

[0088] В данном изобретении также представлены родственные нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток, антитела или их антигенсвязывающие участки, и фармацевтические композиции, относящиеся к иммунокомпетентным клеткам и CAR-экспрессирующим T-клеткам согласно данному изобретению. Также представлены схемы введения доз, лекарственные формы и способы характеристики фенотипа CAR-T-клеток.

[0089] Ниже описаны несколько аспектов данного изобретения со ссылкой на примеры и лишь в иллюстративных целях. Следует понимать, что изложены многочисленные конкретные детали, взаимосвязи и способы, чтобы обеспечить полное понимание данного изобретения. Тем не менее, рядовому специалисту в соответствующей области техники будет понятно, что данное изобретение можно реализовать на практике без одной или большего числа конкретных деталей, или применять на практике другие способы, протоколы, реагенты, линии клеток и животных. Данное изобретение не ограничено проиллюстрированным порядком действий или событий, так как некоторые действия могут происходить в другом порядке и (или) одновременно с другими действиями или событиями. Более того, не все проиллюстрированные действия, этапы или события необходимы для реализации методологии в соответствии с данным изобретением. Многие из методик и процедур, описанных или упоминаемых в данном документе, хорошо понятны и широко применяются с использованием традиционной методологии специалистами в данной области техники.

[0090] Если не указано иное, все термины из данной области техники, обозначения и другие научные термины или терминология, употребляемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и (или) для удобства ссылки, и включение таких определений в данный документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники. Кроме того, следует понимать, что термины, такие как термины, определенные в широко используемых словарях, следует интерпретировать как имеющие значение, соответствующее их значению в контексте соответствующей области техники и (или) как определено в данном документе иным образом.

Определения

[0091] Термин «около» или «приблизительно» включает в себя статистически значимый диапазон значения. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно – в пределах 50%, более предпочтительно – в пределах

20%, еще более предпочтительно – в пределах 10% и еще более предпочтительно – в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое изменение, охватываемое термином «около» или «приблизительно», зависит от конкретной изучаемой системы и может быть легко оценено рядовым специалистом в данной области техники.

[0092] Термин «антитело» включает в себя моноклональные антитела (включая полноразмерные 4-цепочечные антитела или полноразмерные антитела из тяжелых цепей, которые содержат область Fc иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы), а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv). Термин «иммуноглобулин» (Ig) употребляется в данном документе взаимозаменяемо с термином «антитело». Антитела, рассматриваемые в данном документе, включают в себя однодоменные антитела, такие как антитела из тяжелых цепей.

[0093] Термин «антитело из тяжелых цепей» или «АтТЦ» (англ. «HCAb») относится к функциональному антителу, которое содержит тяжелые цепи, но не содержит легких цепей, обычно обнаруживаемых в 4-цепочечных антителах. Известно, что животные из семейства верблюдовых (такие как верблюды, ламы или альпаки) продуцируют АтТЦ.

[0094] Термин «однодоменное антитело» или «одАт» (англ. «sdAb») относится к одиночному антигенсвязывающему полипептиду, который имеет три области, определяющие комплементарность (CDR). Одиночное одАт способно связываться с антигеном без сопряжения с соответствующим CDR-содержащим полипептидом. В некоторых случаях однодоменные антитела сконструированы из АтТЦ верблюдовых, и их переменные домены тяжелой цепи называются в данном документе «VHH». Некоторые VHH также могут быть известны как нанотела. одАт верблюдовых представляет собой один из наименьших известных антигенсвязывающих фрагментов антитела (см., например, работы Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446 - 8 (1993); Greenberg et al., Nature 374: 168 - 73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8: 1013 - 26 (2013)). Основной VHH имеет следующую структуру в направлении от N-конца к C-концу: FR1 – CDR1 – FR2 – CDR2 – FR3 – CDR3 – FR4, где FR1 - FR4 относятся к каркасным областям 1 - 4, соответственно, и где CDR1 - CDR3 относятся к областям 1 - 3, определяющим комплементарность.

[0095] «Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относятся к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепей антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут называться «VN» и «VL», соответственно. Эти домены обычно являются наиболее вариабельными частями антитела (относительно
5 других антител одного класса) и содержат антигенсвязывающие сайты. Антитела из тяжелых цепей от животных семейства верблюдовых имеют одну вариабельную область тяжелой цепи, которая называется «VNH». Таким образом, VNH представляет собой особый тип VN.

[0096] Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты
10 вариабельных доменов значительно различаются между антителами. V-домен опосредует связывание с антигеном и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Тем не менее, вариабельность распределяется неравномерно по всей продолжительности вариабельных доменов. Вместо этого она концентрируется в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями (HVR),
15 как в вариабельных доменах легкой цепи, так и в вариабельных доменах тяжелой цепи. Более высококонсервативные участки вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре области FR, которые по большей части принимают конфигурацию бета-листа, соединенные тремя областями HVR, которые образуют петли,
20 соединяющие, а в некоторых случаях образующие, часть структуры бета-листа. HVR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от областей FR и вместе с областями HVR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. работу Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные
25 домены не участвуют напрямую в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности.

[0097] Термины «фрагмент антитела», «функциональный фрагмент антитела» и «антигенсвязывающая часть» употребляются в данном документе взаимозаменяемо для
30 обозначения одного или большего числа фрагментов или частей антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (см., в целом, работу Holliger et al., Nat. Biotech., 23 (9): 1126 - 1129 (2005)). Фрагмент CAR, распознающий антиген, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты согласно данному

изобретению, может содержать любой фрагмент ВСМА-связывающего антитела. Желательно, фрагмент антитела содержит, например, одну или большее число CDR, переменную область (или ее части), константную область (или ее части) или их комбинации. Примеры фрагментов антител включают в себя, но не ограничиваются ими, (i) фрагмент Fab, который представляет собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab)₂, который представляет собой бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (iv) одноцепочечный Fv (scFv), который представляет собой моновалентную молекулу, состоящую из двух доменов фрагмента Fv (т. е. VL и VH), соединенных синтетическим линкером, что позволяет синтезировать указанные два домена в виде одной полипептидной цепи (см., например, работу Bird et al., *Science*, 242: 423 - 426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879 - 5883 (1988); и работу Osbourn et al., *Nat. Biotechnol.*, 16: 778 (1998); и (v) диатело, которое представляет собой димер полипептидных цепей, при этом каждая полипептидная цепь содержит VH, соединенный с VL с помощью пептидного линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить соединение между VH и VL на одной и той же полипептидной цепи, приводя тем самым к соединению между комплементарными доменами на различных полипептидных цепях VH – VL для создания димерной молекулы, имеющей два функциональных антигенсвязывающих сайта. Фрагменты антител известны в данной области техники и более подробно описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2009/0093024 A1.

[0098] Термин «Стах» употребляется в данном документе для обозначения максимальной концентрации эффекторных CAR-T-клеток в крови после введения лекарственного средства и до введения второй дозы. Ссылка на «при Стах» у субъекта относится к тем суткам, в которые достигается максимальная концентрация эффекторных CAR-T-клеток в крови у данного субъекта.

[0099] При употреблении в контексте данного документа термины «специфически связывает», «специфически распознает» или «специфичный в отношении» относятся к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антигенсвязывающим белком (например, CAR или одАт), которое является определителем наличия данной мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы.

[0100] Термин «специфичность» относится к избирательному распознаванию антигенсвязывающим белком (таким как CAR или одАт) конкретного эпитопа антигена. Природные антитела, например, являются моноспецифическими. Термин «мультиспецифический» означает, что антигенсвязывающий белок (такой как CAR или одАт) имеет два или большее число антигенсвязывающих сайта, из которых по меньшей мере два связывают разные антигены. При употреблении в контексте данного документа термин «биспецифический» означает, что антигенсвязывающий белок (такой как CAR или одАт) имеет две разные антигенсвязывающие специфичности.

[0101] Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающие домены антитела (scFv), связанные с сигнальными доменами Т-клеток. Характеристики CAR могут включать в себя их способность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не ограниченным в отношении ГКГ образом с использованием антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не ограниченное в отношении ГКГ распознавание антигена придает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антигены независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунного ответа. Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора (TCR). Т-клетки, экспрессирующие CAR, называются в данном документе CAR Т-клетками, CAR-Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками, и данные термины употребляются в данном документе взаимозаменяемо. Клетка может быть генетически модифицирована таким образом, чтобы стабильно экспрессировать на своей поверхности связывающий домен антитела, придавая новую антигенную специфичность, которая не зависит от ГКГ. «BCMA CAR» относится к CAR, имеющему внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении BCMA. «Двухэпитопный CAR» относится к CAR, имеющему внеклеточный связывающий домен, специфичный в отношении двух различных эпитопов BCMA.

[0102] «LCAR-B38M» представляет собой терапевтический агент на основе Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR-Т-клеток), содержащий два однодоменных антитела, нацеленных на антиген созревания В-клеток (BCMA), которые сконструированы для придания avidности. LCAR-B38M может включать в себя Т-лимфоциты, трансдуцированные LCAR-B38M CAR – антигеном CAR,

кодируемым лентивирусным вектором. Указанный CAR нацелен на антиген созревания В-клеток человека (CAR против BCMA). Схема лентивирусного вектора, кодирующего LCAR-B38M CAR, представлена на фиг. 2А.

5 [0103] Термины «экспрессировать» и «экспрессия» означают разрешение или обеспечение образования информации в гене или последовательности ДНК, например, получение белка путем активации клеточных функций, участвующих в транскрипции и трансляции соответствующего гена или последовательности ДНК. Последовательность ДНК экспрессируется в клетке или клеткой с образованием «продукта экспрессии», такого как белок. Сам продукт экспрессии, например, полученный белок, может также
10 называться «экспрессированным» клеткой. Продукт экспрессии можно охарактеризовать как внутриклеточный, внеклеточный или трансмембранный.

[0104] Термины «лечить» или «лечение» относятся к терапевтическому лечению, при котором у объекта должно происходить замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или заболевания, или которое обеспечивает
15 благоприятный или желательный клинический результат во время лечения. Благоприятные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и (или)
20 ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать продление выживаемости по сравнению с выживаемостью, ожидаемой в случае, если субъект не получает лечение. К требующим лечения относятся субъекты, у которых уже отмечаются нежелательные физиологические изменения или заболевание, а также субъекты, склонные к
25 физиологическим изменениям или заболеванию.

[0105] При употреблении в контексте данного документа термин «субъект» относится к животному. Термины «субъект» и «пациент» в данном документе могут употребляться взаимозаменяемо по отношению к субъекту. Таким образом, «субъект» включает в себя человека, выступающего в качестве пациента, которого лечат от
30 заболевания или у которого предупреждают заболевание. Описанные в данном документе способы можно применять для лечения субъекта-животного, относящегося к любой системе классификации. Примеры таких животных включают в себя млекопитающих. Млекопитающие включают в себя, но не ограничиваются ими,

млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Lagomorpha, таких как кролики. Млекопитающие могут быть из отряда Carnivora, включая кошачьих (кошки) и псовых (собаки). Млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включая крупный рогатый скот (коровы) и свиней (свиньи), или из отряда Perissodactyla, включая лошадиных (лошади). Млекопитающие могут относиться к отряду Primates, Ceboidea или Simiiformes (обезьяны), или к отряду Anthropoidea (люди и человекообразные обезьяны). В одном варианте осуществления данного изобретения млекопитающее представляет собой человека.

[0106] Термин «эффективный», применяемый к дозе или количеству, относится к такому количеству соединения или фармацевтической композиции, которого достаточно для достижения желательной активности при введении субъекту, нуждающемуся в этом. Следует отметить, что при введении комбинации активных ингредиентов эффективное количество комбинации может включать в себя или не включать в себя количества каждого ингредиента, которые были бы эффективны при введении по отдельности. Точное необходимое количество будет варьировать от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста и общего состояния данного субъекта, тяжести подлежащего лечению патологического состояния, конкретного применяемого лекарственного средства или средств, способа введения и т. п.

[0107] Фраза «фармацевтически приемлемый», употребляемая в связи с композициями, описанными в данном документе, относится к молекулярным единицам и другим ингредиентам таких композиций, которые являются физиологически переносимыми и, как правило, не продуцируют нежелательные реакции при их введении млекопитающему (например, человеку). Предпочтительно, термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства США или правительства штата США, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у млекопитающих, в частности – у человека.

[0108] Применяемые в данном документе термины используются только в целях описания конкретных вариантов осуществления данного изобретения и не предназначены быть ограничивающими. При употреблении в контексте данного документа формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если из контекста явным образом не следует иное.

[0109] По всему тексту данной заявки различные аспекты данного изобретения могут быть представлены в виде диапазона. Следует понимать, что описание в виде диапазона приведено исключительно для удобства и краткости, и не должно быть истолковано как жесткое ограничение объема данного изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретным образом включающее в себя все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах данного диапазона. Например, описание диапазона, такое как «от 1 до 6», следует рассматривать как конкретным образом включающее в себя поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные значения в пределах данного диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. В качестве другого примера, диапазон, такой как «идентичность на 95% - 99%», включает в себя нечто, имеющее идентичность на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99%, и включает в себя поддиапазоны, такие как идентичность на 96% - 99%, 96% - 98%, 96% - 97 %, 97% - 99%, 97% - 98% и 98% - 99%. Это правило применимо независимо от ширины диапазона.

Векторы

[0110] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие CAR, описанные в данной заявке, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методик. Желательные полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из клеток, продуцирующих антитела, например, из клеток гибридомы. В качестве альтернативы, полинуклеотиды могут быть синтезированы с применением синтезатора нуклеотидов или методик ПЦР. Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор можно функционально связать с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепи, путем удаления данного промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестрикционным ферментом и вставки выделенной промоторной последовательности в вектор, представленный в данном документе.

[0111] В данном документе также представлен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению. Вектор может представлять собой, например, плазмиду, космиду, вирусный вектор (например, ретровирусный или аденовирусный) или фаг. Подходящие

векторы и способы работы с векторами хорошо известны в данной области техники (см., например, работы Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York; Ausubel et al. eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ).

[0112] В дополнение к представленной в данном документе последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, вектор предпочтительно содержит последовательности контроля экспрессии, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, терминаторы транскрипции, сайты внутренней посадки рибосомы (СВПР, англ. «IRES») и т. п., которые обеспечивают экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Иллюстративные последовательности контроля экспрессии известны в данной области техники и описаны, например, в работе Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[0113] В данной области техники хорошо известно большое число промоторов, включая конститутивные, индуцируемые и репрессируемые промоторы, из различных источников. Репрезентативные источники промоторов включают в себя, например, вирус, млекопитающее, насекомое, растение, дрожжи и бактерии, и подходящие промоторы из данных источников легко доступны или могут быть получены синтетическим способом на основе последовательностей, общедоступных, например, из депозитариев, таких как ATCC, а также других коммерческих или частных источников. Промоторы могут быть однонаправленными (т. е. инициировать транскрипцию в одном направлении) или двунаправленными (т. е. инициировать транскрипцию либо в направлении к 3', либо в направлении к 5'). Неограничивающие примеры промоторов включают в себя, например, бактериальную систему экспрессии T7, бактериальную систему экспрессии pBAD (araA), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40 и промотор RSV. Индуцируемые промоторы включают в себя, например, систему Tet (патенты США № 5464758 и № 5814618), индуцируемую систему Ecdysone (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346 - 3351 (1996), систему T-REX™ (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США), систему LACSWITCH™ (Stratagene, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) и индуцируемую систему рекомбиназы тамоксифена Cre-ERT (Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324 - 4327 (1999));

Nuc. Acid. Res., 28: e99 (2000); патент США № 7112,715; и Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol, 308: 123 - 144 (2005)).

[0114] При употреблении в контексте данного документа термин «энхансер» относится к последовательности ДНК, которая увеличивает транскрипцию, например, нуклеотидной последовательности, с которой она функционально связана.

[0115] Энхансеры могут быть расположены на расстоянии многих т. п. о. от области кодирования последовательности нуклеиновой кислоты и могут опосредовать связывание регуляторных факторов, паттерны метилирования ДНК или изменения в структуре ДНК. В данной области техники хорошо известно большое число энхансеров из различных источников, которые доступны в виде или в составе клонированных полинуклеотидов (например, из депозиторий, таких как ATCC, а также из других коммерческих или частных источников). Ряд полинуклеотидов, содержащих промоторы (такие как широко используемый промотор CMV), содержит также энхансерные последовательности. Энхансеры могут быть расположены в направлении к 5', внутри или в направлении к 3' в кодирующих последовательностях. Термин «Ig-энхансеры» относится к энхансерным элементам, полученным из энхансерных областей, картированных в пределах локуса иммуноглобулина (Ig) (такие энхансеры включают в себя, например, 5'-энхансеры тяжелой цепи (мю), 5'-энхансеры легкой цепи (каппа), интронные энхансеры каппа и мю, и 3'-энхансеры (см., в целом, работу Paul W.E. (ed), Fundamental Immunology, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), страницы 353 - 363; И патент США № 5885827).

[0116] Вектор может также содержать «селектируемый маркерный ген» При употреблении в контексте данного документа термин «селектируемый маркерный ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая позволяет специфически выбрать или отобрать клетки, экспрессирующие данную нуклеотидную последовательность, в присутствии соответствующего селектируемого агента. Подходящие селектируемые маркерные гены известны в данной области техники и описаны, например, в публикациях международных заявок на патенты WO 1992/08796 и WO 1994/28143; в работах Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981); Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150: 1 (1981); Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984); Kent et al., Science, 237: 901 - 903 (1987); Wigler et

al., Cell, IP. 223 (1977); Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962); Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980); и в патентах США № 5122464 и № 5770359.

[0117] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой «эписомальный вектор экспрессии» или «эписому», которые способны реплицироваться в клетке-хозяине и персистируют в качестве 5
внехромосомного сегмента ДНК в указанной клетке-хозяине в присутствии соответствующего давления отбора (см., например, работу Conese et al., Gene Therapy, 11: 1735 - 1742 (2004)). Репрезентативные коммерчески доступные эписомальные векторы экспрессии включают в себя, но не ограничиваются ими, эписомальные плазмиды, которые используют ядерный антиген 1 вируса Эпштейна – Барр (EBNA1) и 10
точку начала репликации (oriP) вируса Эпштейна – Барр (EBV). Векторы pREP4, pCER4, pREP7 и pcDNA3.1 от Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и pV-CMV от Stratagene (Ла-Холья, штат Калифорния, США) представляют собой неограничивающие примеры эписомального вектора, который использует Т-антиген и 15
точку начала репликации SV40 вместо EBNA1 и oriP.

[0118] Другие подходящие векторы включают в себя интегрирующиеся векторы экспрессии, которые могут случайным образом интегрироваться в ДНК клетки-хозяина, или могут включать в себя сайт рекомбинации, позволяющий осуществление 20
специфической рекомбинации между вектором экспрессии и хромосомой клетки-хозяина. Такие интегрирующиеся векторы экспрессии могут использовать эндогенные последовательности контроля экспрессии в хромосомах клетки-хозяина для осуществления экспрессии желательного белка. Примеры векторов, которые интегрируются сайт-специфическим способом, включают в себя, например, компоненты системы flp-in от Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) 25
(например, pcDNATM5/FRT) или компоненты системы cre-lox, обнаруживаемые, например, в коровых векторах pExchange-6 от Stratagene (Ла-Холья, штат Калифорния, США). Примеры векторов, которые случайным образом интегрируются в хромосомы клеток-хозяев, включают в себя, например, pcDNA3.1 (при введении в отсутствие Т-антигена) от Invitrogen (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и pCI или pFNI OA 30
(ACT) FLEXITM от Promega (г. Мадисон, штат Висконсин, США).

[0119] Также можно применять вирусные векторы. Репрезентативные вирусные векторы экспрессии включают в себя, но не ограничиваются ими, векторы на основе аденовируса (например, систему Per.C6 на основе аденовируса от Crucell, Inc

(г. Лейден, Нидерланды), векторы на основе лентивируса (например, pLP1 на основе лентивируса от Life Technologies (г. Карлсбад, штат Калифорния, США) и ретровирусные векторы (например, pFB-ERV плюс pCFB-EGSH от Stratagene (Лажолия, штат Калифорния, США)). В предпочтительном варианте осуществления
5 данного изобретения вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[0120] Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно данному изобретению, кодирующую CAR, может быть введен в клетку-хозяина, которая способна экспрессировать CAR, кодируемый таким образом, включая любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку. Предпочтительные клетки-хозяева
10 представляют собой те, которые можно легко и надежно культивировать, которые имеют достаточно высокую скорость роста, имеют хорошо охарактеризованные системы экспрессии и могут быть трансформированы или трансфицированы легко и эффективно.

[0121] При употреблении в контексте данного документа термин «клетка-хозяин»
15 относится к любому типу клеток, которые могут содержать указанный вектор экспрессии. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, клетку растения, животного, гриба или водоросли, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, клетку бактерии или простейшего. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е.
20 выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области техники и включают в себя, например, клетки E. coli DH5a, клетки яичника китайского хомяка, клетки обезьяны VERO, клетки COS, клетки HEK 293 и т. п. Для целей
25 амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, например, клетку DH5a. Для целей продуцирования рекомбинантного CAR клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой клетку человека. Клетка-хозяин может представлять собой клетку любого типа, может
30 происходить из ткани любого типа и может иметь любую стадию развития. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин может представлять собой лимфоцит периферической крови (ЛПК), мононуклеарную клетку периферической крови (МКПК) или клетку – естественного киллера (НК-клетку). Предпочтительно,

клетка-хозяин представляет собой клетку – естественного киллера (NK-клетку). Более предпочтительно, клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. Способы отбора подходящих клеток-хозяев, происходящих из млекопитающих, и способов трансформации, культивирования, амплификации, скрининга и очистки клеток известны в данной области техники.

[0122] В данном изобретении представлена выделенная клетка-хозяин, которая экспрессирует последовательность нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, кодирующую CAR, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. Т-клетка согласно данному изобретению может представлять собой любую Т-клетку, такую как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка, или Т-клетка из культивируемой Т-клеточной линии, или Т-клетка, полученная из млекопитающего. Если Т-клетка получена из млекопитающего, она может быть получена из множества источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки можно также обогащать или очищать. Предпочтительно, Т-клетка представляет собой Т-клетку человека (например, выделенную из организма человека). Т-клетка может иметь любую стадию развития, включая, но не ограничиваясь ими, дважды положительную Т-клетку CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺ хелперную Т-клетку, например, клетки Th и Th2, CD8⁺ Т-клетку (например, цитотоксическую Т-клетку), инфильтрирующую опухоль клетку, Т-клетку памяти, наивную Т-клетку и т. п. В одном варианте осуществления данного изобретения Т-клетка представляет собой CD8⁺ Т-клетку или CD4⁺ Т-клетку. Линии Т-клеток доступны, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC, г. Манассас, штат Виргиния, США) и Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ), и включают в себя, например, клетки Jurkat (ATCC TIB-152), клетки Sup-T1 (ATCC CRL-1942), клетки RPMI 8402 (DSMZ ACC-290), клетки Каграс 45 (DSMZ ACC-545) и их производные. В другом варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку – естественного киллера (NK-клетку). NK-клетки представляет собой тип цитотоксических лимфоцитов, играющих роль в системе врожденного иммунитета. NK-клетки определяются как большие гранулярные лимфоциты и составляют третий тип клеток, дифференцированных от общего лимфоидного предшественника, который также дает начало В- и Т-лимфоцитам (см., например, работу Immunobiology, 5th ed., Janeway et al.,

eds., Garland Publishing, New York, NY (2001)). NK-клетки дифференцируются и созревают в костном мозге, лимфатическом узле, селезенке, миндалинах и тимусе. После созревания NK-клетки попадают в кровотоки в виде больших лимфоцитов с характерными цитотоксическими гранулами. NK-клетки способны распознавать и уничтожать некоторые аномальные клетки, такие как, например, некоторые опухолевые клетки и инфицированные вирусом клетки, и считаются важными для врожденной иммунной защиты от внутриклеточных патогенов. Как описано выше в отношении Т-клеток, NK-клетка может представлять собой любую NK-клетку, такую как культивируемая NK-клетка, например, первичная NK-клетка, или NK-клетка из культивируемой NK-клеточной линии, или NK-клетка, полученная из млекопитающего. Если NK-клетка получена из млекопитающего, она может быть получена из множества источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. NK-клетки можно также обогащать или очищать. Предпочтительно, NK-клетка представляет собой NK-клетку человека (например, выделенную из организма человека). NK-клеточные линии доступны, например, из Американской коллекции типовых культур (ATCC, г. Манассас, штат Виргиния, США), и включают в себя, например, клетки NK-92 (ATCC CRL-2407), клетки NK92MI (ATCC CRL-2408) и их производные.

[0123] Кодированная CAR последовательность нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению может быть введена в клетку путем «трансфекции», «трансформации» или «трансдукции». При употреблении в контексте данного документа «трансфекция», «трансформация» или «трансдукция» относятся к введению одного или большего числа экзогенных полинуклеотидов в клетку-хозяина с использованием физических или химических способов. В данной области техники известно множество методик трансфекции, включая, например, ко-преципитацию ДНК фосфатом кальция (см. например, работу Murray E.J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)); ДЭАЭ-декстран; электропорацию; опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами, облегченную частицами вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776 - 777 (1990)); и ко-преципитацию ДНК фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031 - 2034 (1987)). Фаговые или вирусные векторы можно вводить в клетки-хозяева после выращивания инфекционных частиц в подходящих упаковывающих клетках, многие из которых коммерчески доступны.

Химерные антигенные рецепторы

5 [0124] Международная патентная публикация № WO 2018/028647 включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Патентная публикация США № 2018/0230225 включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10 [0125] В данном изобретении представлены способы лечения субъекта клетками, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (CAR). CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий один или большее число
15 однодоменных антител (таких как VHH). В различных вариантах осуществления данного изобретения представлен нацеленный на CAR ВСМА (также называемый в данном документе «ВСМА CAR»), содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одАт против ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых
20 вариантах осуществления данного изобретения указанное одАт против ВСМА представляет собой одАт верблюдовых, химерное одАт, гуманизованное одАт или одАт человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен эффекторной иммунокомпетентной клетки (такой как Т-клетка). В
25 некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный костимулирующий сигнальный домен
получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-Н3, лигандов CD83 и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления
данного изобретения указанный трансмембранный домен получен из CD137.

30 [0126] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как

сигнальный пептид CD8 α), расположенный на N-конце указанного полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит в направлении от N-конца к C-концу: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD28, первый костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD28, второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид содержит в направлении от N-конца к C-концу: сигнальный пептид CD8 α , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , второй костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ВСМА CAR является моновалентным.

[0127] В данной заявке также представлены CAR, которые имеют два или большее число (включая, но не ограничиваясь ими, любое число из 2, 3, 4, 5, 6 или больше) связывающих фрагментов, которые специфически связываются с антигеном, таким как ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные один или большее число связывающих фрагментов представляют собой антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные один или большее число связывающих фрагментов содержат однодоменные антитела.

[0128] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR представляет собой поливалентный (например, бивалентный, трехвалентный или с более высоким числом валентностей) CAR, содержащий полипептид, который содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий множество (например, по меньшей мере любое число из около 2, 3, 4, 5, 6 или больше) связывающих фрагментов, специфически связывающихся с антигеном (например, с опухолевым антигеном); (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен.

[0129] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывающие фрагменты, такие как одАт (включая множество одАт или первое одАт и (или) второе одАт), представляют собой одАт верблюдовых, химерное одАт, одАт человека или гуманизированное одАт. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

связывающие фрагменты или одАт соединены друг с другом посредством пептидных связей или пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения каждый пептидный линкер имеет длину не больше чем около 50 (например, не больше чем любое число из около 35, 25, 20, 15, 10 или 5) аминокислот.

5 **[0130]** В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 α), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный

10 пептид CD8 α), расположенный на N-конце указанного полипептида.

[0131] Не ограничиваясь какой-либо теорией, CAR, которые являются поливалентными, или CAR, которые содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый связывающий фрагмент антитела против ВСМА и второй ВСМА-связывающий фрагмент, могут быть особенно пригодными для нацеливания на

15 мультимерные антигены посредством синергического связывания с различными антигенсвязывающими сайтами или для усиления аффинности или авидности связывания с антигеном. Улучшенная авидность может обеспечить значительное снижение дозы CAR-T-клеток, необходимых для достижения терапевтического эффекта, например, дозу в диапазоне от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ CAR-T-клеток на

20 килограмм массы тела субъекта или от $3,0 \times 10^7$ до $1,0 \times 10^8$ CAR-T-клеток. Для достижения сопоставимого эффекта от моновалентных CAR, таких как bb2121, может потребоваться их введение в количестве, которое превышает указанное выше количество в 5 - 10 раз. В различных вариантах осуществления данного изобретения уменьшенные диапазоны доз могут обеспечивать значительное облегчение синдрома

25 высвобождения цитокинов (СВЦ) и других потенциально опасных побочных эффектов CAR-T-клеточной терапии.

[0132] Различные связывающие фрагменты (например, внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый связывающий фрагмент антитела против ВСМА и второй ВСМА-связывающий фрагмент) в CAR, описанных в данном

30 документе, могут быть соединены друг с другом посредством пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения связывающие фрагменты (такие как одАт) непосредственно соединены друг с другом без каких-либо пептидных линкеров. Пептидные линкеры, соединяющие различные связывающие фрагменты

(такие как одАт), могут быть одинаковыми или разными. Различные домены CAR также могут быть соединены друг с другом посредством пептидных линкеров.

[0133] Пептидный линкер в CAR, описанных в данном документе, может иметь любую подходящую длину. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер имеет длину по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 или большее число аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер не превышает в длину около 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или меньшее число аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения длина пептидного линкера является любой из следующего: от около 1 аминокислоты до около 10 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 20 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 30 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 30 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 30 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 50 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 100 аминокислот или от около 1 аминокислоты до около 100 аминокислот.

[0134] CAR согласно данному изобретению содержат трансмембранный домен, который может быть непосредственно или опосредованно соединен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

[0135] CAR может содержать фрагмент, активирующий Т-клетки. Указанный фрагмент, активирующий Т-клетки, может представлять собой любой подходящий фрагмент, происходящий или полученный из любой подходящей молекулы. В одном варианте осуществления данного изобретения, например, указанный фрагмент, активирующий Т-клетки, содержит трансмембранный домен. Указанный трансмембранный домен может представлять собой любой трансмембранный домен, происходящий или полученный из любой молекулы, известной в данной области техники. Например, указанный трансмембранный домен может происходить или быть получен из молекулы CD8 α или из молекулы CD28. CD8 представляет собой трансмембранный гликопротеин, который служит корцептором для Т-клеточного рецептора (TCR) и экспрессируется в основном на поверхности цитотоксических Т-клеток. Наиболее распространенной формой CD8 является димер, состоящий из цепей CD8 α и CD8 β . CD28 экспрессируется на Т-клетках и обеспечивает костимулирующие

сигналы, необходимые для активации Т-клеток. CD28 представляет собой рецептор для CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2). В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения CD8 α и CD28 являются человеческими.

[0136] В дополнение к трансмембранному домену фрагмент, активирующий Т-клетки, дополнительно содержит внутриклеточный (т. е. цитоплазматический) Т-клеточный сигнальный домен. Указанный внутриклеточный Т-клеточный сигнальный домен может происходить или быть получен из молекулы CD28, молекулы CD3-дзета (ζ) или ее модифицированных версий, цепи рецептора Fc гамма человека (FcR γ), молекулы CD27, молекулы OX40, молекулы 4-1BB или других внутриклеточных сигнальных молекул, известных в данной области техники. Как описано выше, CD28 представляет собой Т-клеточный маркер, играющий важную роль в Т-клеточной стимуляции. CD3 ζ связывается с TCR для генерирования сигнала и содержит активирующие мотивы иммунорецептора на основе тирозина (AMIT, англ. «ITAM»). Молекула 4-1BB, также известная как CD137, передает мощный стимулирующий сигнал на Т-клетки, стимулируя дифференцировку и повышая длительную выживаемость Т-лимфоцитов. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения CD28, CD3 ζ , 4-1BB, OX40 и CD27 являются человеческими.

[0137] Домен CAR, активирующий Т-клетки, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, может содержать любой из указанных выше трансмембранных доменов и любой один или большее число из указанных выше межклеточных Т-клеточных сигнальных доменов в любой комбинации. Например, последовательность нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению может кодировать CAR, содержащий трансмембранный домен CD28 и внутриклеточные Т-клеточные сигнальные домены CD28 и CD3 ζ . В качестве альтернативы, например, последовательность нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению может кодировать CAR, содержащий трансмембранный домен CD8 α и внутриклеточные Т-клеточные сигнальные домены CD28, CD3 ζ , цепи рецептора Fc гамма (FcR γ) и (или) 4-1 BB.

[0138] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент и (или) второй ВСМА-связывающий фрагмент представляют собой однодоменное антитело (одАт, англ. «sdAb») против ВСМА. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой первое одАт против ВСМА, и второй ВСМА-связывающий

фрагмент представляет собой второе одАт против ВСМА. В определенных вариантах осуществления данного изобретения первый ВСМА-связывающий фрагмент содержит следующую

аминокислотную последовательность:

QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDIS

5 TSYADSVKGRFTISRDNAAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGT

QVTVSS (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления данного

изобретения указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент содержит полипептид,

кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

CAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTG

10 CGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCTGGT

TTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGGCTGGAGGG

ACATCTCCACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGA

CAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACAC

CGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCTCTGG

15 GGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 2).

[0139] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент содержит следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYY

20 AESVKGRFTISRDNAAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ

VTVSS (SEQ ID NO: 3). В определенных вариантах осуществления данного

изобретения указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент содержит полипептид,

кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGGAGGCTCTCTG

25 AGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACAATGGGCTGGTTTAGGCAG

GCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTG

GCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCCGCGATAACGCCA

AGAATACAGTGGTGCTGCAGATGAACTCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGT

ACTATTGTGCCCGCCGATCGGAAGAGCGTGATGAGCATTAGACCAGACTATTGGGG

30 GCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 4).

[0140] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент и указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент связаны друг с другом с помощью пептидного линкера. В определенных вариантах

осуществления данного изобретения указанный пептидный линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GGGGS (SEQ ID NO: 5).

[0141] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный полипептид CAR дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце указанного полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный пептид получен из CD8 α . В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный пептид содержит следующую аминокислотную последовательность: MALPVTALLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 6). В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный сигнальный пептид содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты: ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCT (SEQ ID NO: 7).

[0142] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный трансмембранный домен содержит следующую аминокислотную последовательность: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8).

[0143] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный трансмембранный домен содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты: ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGC (SEQ ID NO: 9).

[0144] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен эффекторной иммунокомпетентной клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит один или большее число костимулирующих сигнальных доменов. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит следующую аминокислотную последовательность: RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQ

EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (SEQ ID NO: 10).

[0145] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный
внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, кодируемый следующей
5 последовательностью нуклеиновой кислоты:

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAAC
CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG
10 TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
CTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 11). В определенных вариантах осуществления

данного изобретения указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит
следующую аминокислотную последовательность:

15 KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12). В

определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный
внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, кодируемый следующей
последовательностью нуклеиновой кислоты:

20 AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA
GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA
GAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 13).

[0146] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный
полипептид CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между
С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного
25 домена. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный
шарнирный домен содержит следующую аминокислотную последовательность:

TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 15). В

определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный шарнирный
домен содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью
30 нуклеиновой кислоты:

ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGC
TCGCCCT (SEQ ID NO: 7).

[0147] В одном варианте осуществления данного изобретения CAR содержит один, или большее число, или все из элементов, перечисленных в таблице 1.

Таблица 1

Элемент CAR	Аминокислотная последовательность
Сигнальный пептид CD8 α , CD8 α SP	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 6)
BCMA-связывающий домен	Аминокислотная последовательность VHH1 (A37353) QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKE RESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNACKTLYLQMNSLKPED TAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 1) Аминокислотная последовательность линкера G4S GGGGS (SEQ ID NO: 5) Аминокислотная последовательность VHH2 (A37917) EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREF VAAISLPTLAYYAESVKGRFTISRDNACKNTVVLQMNSLKPEDTAL YYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3)
Шарнир CD8 α	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 15)
Трансмембранный CD8 α	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8)
Цитоплазматический CD137	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12)
Цитоплазматический CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDH GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 10)

5 Композиции эффекторных иммунокомпетентных клеток

[0148] «Эффекторные иммунокомпетентные клетки» представляют собой иммунокомпетентные клетки, которые могут выполнять эффекторные иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные иммунокомпетентные клетки экспрессируют по меньшей мере Fc γ RIII и выполняют эффекторную функцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, англ. «ADCC»). Примеры эффекторных иммунокомпетентных клеток, которые опосредуют АЗКЦ, включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), клетки – естественные киллеры (НК-клетки), моноциты, цитотоксические Т-клетки, нейтрофилы и эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные иммунокомпетентные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки представляют

собой клетки CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8- или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Т-клетки продуцируют ИЛ-2, ИФН и (или) ФНО при экспрессии CAR, и связываются с клетками-мишенями, такими как опухолевые клетки CD20+ или CD19+. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения CD8+ Т-клетки осуществляют лизис антигенспецифичных клеток-мишеней при экспрессии CAR и связываются с указанными клетками-мишенями.

[0149] Биологические способы введения вектора в эффекторную иммунокомпетентную клетку включают в себя применение ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы стали наиболее широко применяемой системой для вставки генов в клетки млекопитающих, например, в клетки человека. Химические способы введения вектора в эффекторную иммунокомпетентную клетку включают в себя коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокapsулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы, а также липосомы. Иллюстративная коллоидная система для применения в качестве несущей среды для доставки *in vitro* представляет собой липосому (например, искусственную мембранную везикулу).

[0150] В данном документе представлены лекарственные формы, содержащие от $3,0 \times 10^7$ до $1,0 \times 10^8$ CAR-Т-клеток, содержащих CAR, содержащий полипептид, который содержит: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый ВСМА-связывающий фрагмент, который специфически связывается с первым эпитопом ВСМА, и второй ВСМА-связывающий фрагмент, который специфически связывается со вторым эпитопом ВСМА; (б) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом указанный первый эпитоп и указанный второй эпитоп отличаются друг от друга. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $3,0 \times 10^7$ до $4,0 \times 10^7$ CAR-Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $3,5 \times 10^7$ до $4,5 \times 10^7$ CAR-Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $4,0 \times 10^7$ до $5,0 \times 10^7$ CAR-Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $4,5 \times 10^7$ до $5,5 \times 10^7$ CAR-Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $5,0 \times 10^7$ до $6,0 \times 10^7$ CAR-Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного

изобретения лекарственная форма содержит от $5,5 \times 10^7$ до $6,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $6,0 \times 10^7$ до $7,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $6,5 \times 10^7$ до $7,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $7,0 \times 10^7$ до $8,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $7,5 \times 10^7$ до $8,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $8,0 \times 10^7$ до $9,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $8,5 \times 10^7$ до $9,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $9,0 \times 10^7$ до $1,0 \times 10^8$ CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от 2×10^7 до 8×10^7 CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит около 1×10^7 , около 2×10^7 , около 3×10^7 , около 4×10^7 , около 5×10^7 , около 6×10^7 , около 7×10^7 , около 8×10^7 , около 9×10^7 или около 1×10^8 CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит около $5,1 \times 10^7$, около $5,2 \times 10^7$, около $5,25 \times 10^7$, около $5,3 \times 10^7$, около $5,4 \times 10^7$, около $5,5 \times 10^7$, около $5,6 \times 10^7$, около $5,7 \times 10^7$, около $5,8 \times 10^7$ или около $5,9 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит около $5,25 \times 10^7$ CAR-T-клеток.

[0151] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлена лекарственная форма, содержащая от $3,0 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^8$ сконструированных эффекторных иммунокомпетентных клеток (таких как Т-клетки), содержащих CAR, содержащий полипептид, который содержит: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое одАт против ВСМА, которое специфически связывается с первым эпитопом ВСМА, и второе одАт против ВСМА, которое специфически связывается со вторым эпитопом ВСМА; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, при этом указанный первый эпитоп и указанный второй эпитоп отличаются друг от друга. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $3,0 \times 10^7$ до $4,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная

форма содержит от $3,5 \times 10^7$ до $4,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $4,0 \times 10^7$ до $5,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $4,5 \times 10^7$ до $5,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $5,0 \times 10^7$ до $6,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $5,5 \times 10^7$ до $6,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $6,0 \times 10^7$ до $7,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $6,5 \times 10^7$ до $7,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $7,0 \times 10^7$ до $8,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $7,5 \times 10^7$ до $8,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $8,0 \times 10^7$ до $9,0 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $8,5 \times 10^7$ до $9,5 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от $9,0 \times 10^7$ до $1,0 \times 10^8$ CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит от 2×10^7 до 8×10^7 CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит около 1×10^7 , около 2×10^7 , около 3×10^7 , около 4×10^7 , около 5×10^7 , около 6×10^7 , около 7×10^7 , около 8×10^7 , около 9×10^7 или около 1×10^8 CAR-T-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит около $5,1 \times 10^7$, около $5,2 \times 10^7$, около $5,25 \times 10^7$, около $5,3 \times 10^7$, около $5,4 \times 10^7$, около $5,5 \times 10^7$, около $5,6 \times 10^7$, около $5,7 \times 10^7$, около $5,8 \times 10^7$ или около $5,9 \times 10^7$ CAR-T-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения лекарственная форма содержит около $5,25 \times 10^7$ CAR-T-клеток.

30 **Фармацевтические композиции и составы**

[0152] Кроме того, в данной заявке представлены фармацевтические композиции, содержащие любое из однодоменных антител против ВСМА, или любую из

сконструированных эффекторных иммунокомпетентных клеток, содержащих любой из CAR (такой как ВСМА CAR), как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции можно получать путем смешивания любой из эффекторных иммунокомпетентных клеток, описанных в данном документе, имеющих желательную степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в форме лиофилизированных составов или водных растворов.

[0153] Композиции, описанные в данном документе, можно вводить в составе фармацевтической композиции, содержащей один или большее число носителей. Выбор носителя частично определяется конкретной последовательностью нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, вектором или клетками-хозяевами, экспрессирующими CAR согласно данному изобретению, а также конкретным способом, применяемым для введения последовательности нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, вектора или клеток-хозяев, экспрессирующих CAR согласно данному изобретению. Соответственно, существует множество подходящих составов фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать в себя, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. Необязательно, можно применять смесь из двух или большего числа консервантов. Консервант или смеси консервантов, как правило, присутствуют в количестве, составляющем от около 0,0001% до около 2% по массе от общей массы композиции.

[0154] Кроме того, в композиции можно применять буферные агенты. Подходящие буферные агенты включают в себя, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия, а также различные другие кислоты и соли. Необязательно, можно применять смесь из двух или большего числа буферных агентов. Буферный агент или смеси буферных агентов, как правило, присутствуют в количестве, составляющем от около 0,001 % до около 4% по массе от общей массы композиции.

[0155] Композицию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению, кодирующую CAR, или клетки-хозяева согласно данному изобретению, экспрессирующие CAR, можно составить в виде комплекса включения, такого как циклодекстриновый комплекс включения, или в виде липосомы. Липосомы

могут служить для нацеливания клеток-хозяев (например, Т-клеток или НК-клеток) или последовательности нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению на конкретную ткань. Липосомы также можно применять для увеличения периода полужизни нуклеиновой кислоты согласно данному изобретению. Существует множество способов получения липосом, таких как те, которые описаны, например, в работе Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9: 467 (1980); и в патентах США № 4235871; № 4501728; № 4837028; и № 5019369. В композиции могут применяться системы доставки с замедленным высвобождением, отсроченным высвобождением и пролонгированным высвобождением, таким образом, чтобы доставка композиции согласно данному изобретению происходила до и с достаточным временем, чтобы вызвать сенсбилизацию участка, подлежащего лечению. Многие типы высвобождающих систем доставки доступны и известны специалистам в данной области техники. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым повышая удобство для пациента и врача, и могут быть особенно пригодными для определенных вариантов осуществления композиции согласно данному изобретению.

Способы лечения

[0156] Данная заявка дополнительно относится к способам и композициям для применения в клеточной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клеточная иммунотерапия предназначена для лечения онкологического заболевания, включая, но не ограничиваясь ими, злокачественные новообразования системы крови и солидные опухоли. Указанные способы подходят для лечения взрослых пациентов и детей, включая все возрастные подгруппы, и могут применяться в качестве любой линии лечения, включая первую линию или последующие линии лечения.

[0157] Любые из одАт против ВСМА, CAR и сконструированных эффекторных иммунокомпетентных клеток (таких как CAR-T-клетки), описанных в данном документе, можно применять в способе лечения онкологического заболевания.

[0158] В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, составляющей от около $4,0 \times 10^5$ до около $5,0 \times 10^5$ клеток/кг, от около $4,5 \times 10^5$ до около $5,5 \times 10^5$ клеток/кг, от около $5,0 \times 10^5$ до около $6,0 \times 10^5$ клеток/кг, от

$5,1 \times 10^7$, около $5,2 \times 10^7$, около $5,25 \times 10^7$, около $5,3 \times 10^7$, около $5,4 \times 10^7$, около $5,5 \times 10^7$, около $5,6 \times 10^7$, около $5,7 \times 10^7$, около $5,8 \times 10^7$ или около $5,9 \times 10^7$ клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, составляющей около $5,25 \times 10^7$ клеток.

5 **[0159]** В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $4,0 \times 10^5$ до около $5,0 \times 10^5$ клеток/кг, от около $4,5 \times 10^5$ до около $5,5 \times 10^5$ клеток/кг, от около $5,0 \times 10^5$ до около $6,0 \times 10^5$ клеток/кг, от около $5,5 \times 10^5$ до около $6,5 \times 10^5$ клеток/кг, от около $6,0 \times 10^5$ до около $7,0 \times 10^5$ клеток/кг, от около $6,5 \times 10^5$ до около $7,5 \times 10^5$ клеток/кг, от около $7,0 \times 10^5$ до около $8,0 \times 10^5$ клеток/кг, от около $7,5 \times 10^5$ до около $8,5 \times 10^5$ клеток/кг, от около $8,0 \times 10^5$ до около $9,0 \times 10^5$ клеток/кг, от около $8,5 \times 10^5$ до около $9,5 \times 10^5$ клеток/кг, от около $9,0 \times 10^5$ до около $1,0 \times 10^6$ клеток/кг у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $7,1 \times 10^5$ клеток/кг, около $7,2 \times 10^5$ клеток/кг, около $7,3 \times 10^5$ клеток/кг, около $7,4 \times 10^5$ клеток/кг, около $7,5 \times 10^6$ клеток/кг, около $7,6 \times 10^6$ клеток/кг, около $7,7 \times 10^6$ клеток/кг, около $7,8 \times 10^6$ клеток/кг или около $7,9 \times 10^6$ клеток/кг у данного субъекта. В одном варианте осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $7,5 \times 10^6$ клеток/кг у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $3,0$ до около $4,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $3,5$ до около $4,5 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $4,0$ до около $5,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $4,5$ до около $5,5 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $5,0$ до около $6,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около $5,5$ до около $6,5 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В

определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 6,0 до около $7,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 6,5 до около $7,5 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 7,0 до около $8,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 7,5 до около $8,5 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 8,0 до около $9,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 8,5 до около $9,5 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от около 9,0 до около $10,0 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В определенных вариантах осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $5,1 \times 10^7$, около $5,2 \times 10^7$, около $5,25 \times 10^7$, около $5,3 \times 10^7$, около $5,4 \times 10^7$, около $5,5 \times 10^7$, около $5,6 \times 10^7$, около $5,7 \times 10^7$, около $5,8 \times 10^7$ или около $5,9 \times 10^7$ клеток у данного субъекта. В одном варианте осуществления данного изобретения CAR-T-клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $5,25 \times 10^7$ клеток у данного субъекта.

[0160] Способы, описанные в данном документе, можно применять для лечения различных видов онкологических заболеваний, включая как солидные опухоли, так и опухоли жидких тканей. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные способы применяют для лечения множественной миеломы. Способы, описанные в данном документе, можно применять в качестве первой терапии, второй терапии, третьей терапии или комбинированной терапии с другими типами противоопухолевой терапии, известными в данной области техники, такими как химиотерапия, хирургическое вмешательство, облучение, генная терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, трансплантация стволовых клеток,

нацеленная терапия, криотерапия, ультразвуковая терапия, фотодинамическая терапия, радиочастотная абляция или т. п., в адьювантных или в неоадьювантных условиях.

[0161] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому стадии I, стадии II или стадии III, и (или) стадии A или стадии B на основе системы определения стадий по Durie-Salmon. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому стадии I, стадии II или стадии III на основе международной системы определения стадий, опубликованной Международной группой по изучению множественной миеломы (IMWG).

[0162] Композицию, содержащую клетки-хозяева, экспрессирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению, или вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению, можно вводить млекопитающему с помощью стандартных методик введения, включая пероральное, внутривенное, внутривентральное, подкожное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное или суппозиторное введение. Предпочтительно, указанная композиция пригодна для парентерального введения. При употреблении в контексте данного документа термин «парентеральное» включает в себя внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутривентральное введение. Более предпочтительно, указанную композицию вводят млекопитающему с помощью периферической системной доставки путем внутривенной, внутривентральной или подкожной инъекции.

[0163] Композицию, содержащую клетки-хозяева, экспрессирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению, или вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению, можно вводить с одним или большим числом дополнительных терапевтических агентов, которые можно совместно вводить млекопитающему. Под термином «совместное введение» подразумевается введение одного или большего числа дополнительных терапевтических агентов и композиции, содержащей клетки-хозяева согласно данному изобретению или вектор согласно данному изобретению, в достаточной степени близко от друга во времени,

таким образом, чтобы CAR согласно данному изобретению мог усиливать эффект указанных одного или большего числа дополнительных терапевтических агентов, или наоборот. В связи с этим первой можно ввести композицию, содержащую клетки-хозяева согласно данному изобретению или вектор согласно данному изобретению, а
5 затем можно ввести указанные один или большее число дополнительных терапевтических агентов, или наоборот.

[0164] Экспрессирующую CAR клетку, описанную в данном документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно в одной или в отдельных композициях, либо вводить последовательно. В случае
10 последовательного введения экспрессирующую CAR клетку, описанную в данном документе, можно вводить первой, а дополнительный агент можно вводить вторым, либо же порядок введения может быть обратным.

[0165] После введения композиции, содержащей клетки-хозяева, экспрессирующие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению, или вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR согласно данному изобретению, млекопитающему (например, человеку), биологическую активность CAR можно измерить любым подходящим
15 способом, известным в данной области техники. В соответствии со способом согласно данному изобретению CAR связывается с ВСМА на множестве клеток миеломы, и указанное множество клеток миеломы разрушается. Связывание CAR с ВСМА на поверхности множества клеток миеломы можно анализировать с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, включая, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА, англ. «ELISA») и проточную цитометрию. Способность CAR разрушать множество клеток миеломы
20 можно измерить с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в работах Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32 (7): 689 - 702 (2009); и Herman et al. J. Immunological Methods, 285 (1): 25 - 40 (2004). Биологическую активность CAR также можно измерить путем анализа экспрессии определенных цитокинов, таких как
25 CD 107a, ИФН- γ , ИЛ-2 и ФНО.
30

Фенотипическая характеристика Т-клеток

[0166] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения популяция клеток в лекарственных формах CAR-T, описанных в данном документе, содержит Т-клетку или популяцию Т-клеток, например, на различных стадиях дифференцировки. Стадии дифференцировки Т-клеток включают в себя наивные Т-клетки, стволовые центральные Т-клетки памяти, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти и терминально-дифференцированные эффекторные Т-клетки, перечисленные в порядке от менее дифференцированных к более дифференцированным. После воздействия антигена наивные Т-клетки пролиферируют и дифференцируются в Т-клетки памяти, например, в стволовые центральные Т-клетки памяти и в центральные Т-клетки памяти, которые затем дифференцируются в эффекторные Т-клетки памяти. При получении соответствующих сигналов от Т-клеточного рецептора, костимулирующих и воспалительных сигналов Т-клетки памяти далее дифференцируются в терминально-дифференцированные эффекторные Т-клетки. См., например, работы Restifo. *Blood*. 124.4 (2014): 476 - 77; и Joshi et al. *J. Immunol*. 180.3 (2008): 1309 - 15.

[0167] Наивные Т-клетки могут иметь следующий паттерн экспрессии поверхностных клеточных маркеров: CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RO⁻, CD95⁻. Стволовые центральные Т-клетки памяти (T_{scm}) могут иметь следующий паттерн экспрессии поверхностных клеточных маркеров: CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RO⁻, CD95⁺. Центральные Т-клетки памяти (T_{cm}) могут иметь следующий паттерн экспрессии поверхностных клеточных маркеров: CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RO⁺, CD95⁺. Эффекторные Т-клетки памяти (T_{em}) могут иметь следующий паттерн экспрессии поверхностных клеточных маркеров: CCR7⁻, CD62L⁻, CD45RO⁺, CD95⁺. Терминально-дифференцированные эффекторные Т-клетки (T_{eff}) могут иметь следующий паттерн экспрессии поверхностных клеточных маркеров: CCR7⁻, CD62L⁻, CD45RO⁻, CD95⁺. См., например, работы Gattinoni et al. *Nat. Med.* 17 (2011): 1290 - 7; и Flynn et al. *Clin. Translat. Immunol.* 3 (2014): e20. На фиг. 17 и фиг. 18 также показаны маркеры, экспрессируемые на каждом из указанных и дополнительных классов Т-клеток.

[0168] Не ограничиваясь какой-либо теорией, фенотип Т-клеток до инфузии может коррелировать с увеличением числа и персистенцией CAR⁺ Т-клеток, профилем токсичности и клиническими ответами. Соотношения CD4:CD8 для лекарственного продукта (ЛП) и после инфузии, и фенотип памяти CAR-T также может предоставить

информацию об увеличении числа и персистенции CAR⁺ Т-клеток, профиле токсичности и клинических ответах. Иммунофенотипирование субпопуляций CD4 и CD8 Т-клеток можно проводить на различных стадиях, включая стадию начального сбора Т-клеток пациента с помощью афереза, собственно ЛП, и в различные моменты времени после инфузии (например, для характеристики подмножеств, статуса активации, соотношений).

[0169] В различных вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет меньше чем 4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет меньше чем 2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет меньше чем 1,8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет меньше чем 1,7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет меньше чем 1,6. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет меньше чем 1,6. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет около 1,54. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток и CD8⁺ CAR-Т-клеток в дозе CAR-Т-клеток составляет 1,54.

[0170] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этапы анализа количества CD4⁺ CAR-Т-клеток у субъекта при Smax, анализа количества CD8⁺ CAR-Т-клеток у субъекта при Smax, при этом соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток при Smax и CD8⁺ CAR-Т-клеток при Smax составляет меньше чем 3,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4⁺ CAR-Т-клеток при Smax и

CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 2,0. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 1,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,6. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет около 0,35. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет около 0,3. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения у по меньшей мере пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пациентов медианное соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет 0,3.

[0171] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов центральные CAR+ T-клетки памяти составляют по меньшей мере 85% от общего количества CAR+ T-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,

29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65 сутки после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 90% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65 сутки после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 95% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 сутки после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 97% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 сутки после введения дозы.

[0172] В определенных вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ Т-клетки памяти составляют 85-86%, 86-87%, 87-88%, 88-89%, 89-90%, 90-91%, 91-92%, 92-93%, 93-94%, 94-95%, 95-96%, 96-97%, 97-98% или 98-99% от общего количества CAR+ Т-клеток.

[0173] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 2% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65 сутки после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 5% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 или 65 сутки после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 7% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 или 45 сутки после введения дозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ Т-клетки памяти составляют по меньшей

мере 8% от общего количества CAR+ Т-клеток на 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 сутки после введения дозы.

[0174] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества центральных CAR+ CD8+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы, при этом центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 30% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 50% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 50% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 80% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют 55-70%, 56-71%, 57-72%, 58-73%, 59-74%, 60-75%, 61-76%, 62-77%, 63-78%, 64-79%, 65-80%, 66-81%, 67-82%, 68-83%, 70-85%, 72-87%, 74-89%, 76-91%, 78-93% или 80-100% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

[0175] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества центральных CAR+ CD4+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы, при этом центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 60% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 65% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 70% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 75% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения центральные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют 65-80%, 66-81%, 67-82%, 68-83%, 69-84%, 70-85%,

71-86%, 72-87%, 73-88%, 74-89%, 75-90%, 76-91%, 77-92%, 78-93%, 80-90%, 82-92%, 84-94%, 86-96%, 88-98% или 90-100% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

[0176] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества эффекторных CAR+ CD8+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы, при этом указанные эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 2% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 5% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 8% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD8+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 10% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

[0177] В различных вариантах осуществления вышеуказанных способов представленный способ дополнительно включает в себя этап анализа соотношения количества эффекторных CAR+ CD4+ Т-клеток памяти и общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток у субъекта при Smax после введения дозы, при этом указанные эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 70% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 75% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 80% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют по меньшей мере 90% от общего количества CAR+ CD4+ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения эффекторные CAR+ CD4+ Т-клетки памяти составляют 70-80%, 70-85%, 71-86%, 72-87%, 73-88%, 74-89%, 75-90%, 76-91%, 77-92%, 78-93%, 80-90%, 82-92%, 84-94%, 86-96%, 88-98% или 90-100% от общего количества CAR+ CD8+ Т-клеток.

[0178] Не ограничиваясь какой-либо теорией, процентное содержание клеток у пациента может быть прогностическим показателем клинического ответа, как показано на фиг. 22С и фиг. 22D.

5 [0179] Анализ цитокинов (например, ИЛ-6, ИФН- γ , ИЛ-10, ФНО- α , ИЛ-2 и ИЛ-2R α) можно проводить в различные моменты времени во время лечения, например, за десять суток до введения или инфузии лекарственного продукта (ЛП), во время введения или инфузии ЛП, и в любое время после введения ЛП (например, через 10 суток, через 20 суток, через 30 суток, через 40 суток, через 60 суток, через 80 суток и через 100 суток после введения ЛП). Не ограничиваясь какой-либо теорией, уровни цитокина ИЛ-6 в
10 сыворотке крови могут коррелировать с синдромом высвобождения цитокинов, но не с клиническим ответом, на что указывают данные, представленные на фиг. 26А и фиг. 26В.

Наборы и изделия

15 [0180] Любую из композиций, описанных в данном документе, можно заключить в набор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированные иммортализованные CAR-T-клетки представлены в наборе, который также может включать в себя реагенты, подходящие для увеличения числа указанных клеток, такие как культуральная среда.
20

[0181] В неограничивающем примере конструкция экспрессии химерного рецептора, один или большее число реагентов для получения конструкции экспрессии химерного рецептора, клетки для трансфекции конструкцией экспрессии и (или) один или большее число инструментов для получения иммортализованных Т-клеток для трансфекции
25 конструкцией экспрессии (такой инструмент может представлять собой шприц, пипетку, пинцет и (или) любое такое приспособление, одобренное для применения в медицинских целях).

[0182] В некоторых аспектах данного изобретения набор содержит реагенты или приспособления для электропорации клеток.

30 [0183] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения набор содержит искусственные антигенпрезентирующие клетки.

[0184] Наборы могут содержать одну или большее число подходящим образом аликвотированных композиций согласно данному изобретению или реагентов для получения композиций согласно данному изобретению. Компоненты наборов могут быть упакованными либо в водную среду, либо в лиофилизированную форму. Емкости в наборах могут включать в себя по меньшей мере один флакон, пробирку, колбу, 5 бутылку, шприц или другие емкости, в которые компонент может быть помещен, и предпочтительно, подходящим образом аликвотирован. Если набор содержит больше чем один компонент, такой набор, как правило, также будет содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в который могут быть отдельно помещены 10 дополнительные компоненты. Тем не менее, флакон может содержать различные комбинации компонентов. Наборы согласно данному изобретению, как правило, также включают в себя емкости для размещения конструкции экспрессии химерного рецептора и любые другие контейнеры для реагентов в непосредственной близости для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать в себя, например, 15 пластиковые контейнеры, изготовленные впрыскиванием или литьем с раздувом, в которых находятся желательные флаконы.

ПРИМЕРЫ

20 **[0185]** Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в данном документе вариантов осуществления данного изобретения. Представленные примеры предназначены для иллюстрирования, но не для ограничения описанных в данном документе вариантов осуществления данного изобретения.

25

Пример 1

[0186] LCAR-B38M (JNJ-4528) представляет собой терапевтический агент на основе Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR-Т-клеток), содержащий два 30 однодоменных антитела, нацеленных на антиген созревания В-клеток (BCMA), которые сконструированы для придания авидности. Карта данной конструкции и схематическое изображение LCAR-B38M представлены на фиг. 2А. Конструкция

LCAR-B38M, используемая для получения клеток LCAR-B38M, исследованных в данном примере, содержит последовательности, перечисленные в таблице 2.

Таблица 2

Элемент CAR	Аминокислотная последовательность
Сигнальный пептид CD8 α , CD8 α SP	MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 6)
BCMA-связывающий домен	Аминокислотная последовательность VHH1 (A37353) QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKE RESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNACKTLYLQMNSLKPE DTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 1) Аминокислотная последовательность линкера G4S GGGG (SEQ ID NO: 5) Аминокислотная последовательность VHH2 (A37917) EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREF VAAISLPTLAYYAESVKGRFTISRDNACKNTVVLQMNSLKPEDTAL YYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3)
Шарнир CD8 α	TTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 15)
Трансмембранной CD8 α	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8)
Цитоплазматический CD137	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12)
Цитоплазматический CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 10)

5 [0187] Собирали образцы от 25 пациентов для афереза, собирали Т-клетки и
трандуцировали их лентивирусом, кодирующим конструкцию BCMA CAR,
экспрессирующую LCAR-B38M CAR. Схема данного эксперимента показана на
фиг. 2В. Затем данные 25 пациентов поступили в исследование MMY2001, как
10 показано на фиг. 3. Популяция пациентов включала в себя группы с рецидивирующей
или рефрактерной множественной миеломой, с 3 предшествующими линиями лечения
или дважды рефрактерной к ИП / IMiD и с предшествующим воздействием ИП, IMiD,
 α CD38. Первичной целью исследования MMY2001 являлось исследование
безопасности и определение RP2D, например, изучение частоты и тяжести
15 нежелательных явлений (фаза 1b). Другой первичной целью являлось исследование
эффективности: Объективная частота клинического ответа (ORR) в виде частичного
клинического ответа (PR) или более благоприятного клинического ответа согласно
определению IMWG (фаза 2). Ниже приведены вторичные цели: определение частоты и

тяжести нежелательных явлений (фаза 2), оценка иммуногенности, оценка PRO после лечения и оценка HRQoL, определение характеристик ФК и ФД, и определение любых дополнительных характеристик эффективности. Клинические ответы пациентов обобщенно представлены на фиг. 4.

5 **[0188]** Хотя Т-клетки трансдуцировали и размножали в течение около 3 - 4 недель, указанные 25 пациентов прошли переходную терапию (по мере необходимости) и режим кондиционирования с циклофосфамидом и флударабином. В течение указанного периода проводили различные анализы Т-клеток данных пациентов. Состав иммунных
10 клеток как из образцов афереза, так и из трансдуцированных клеток после увеличения их числа (которые называются в данном документе «лекарственным продуктом» или «ЛП») оценивали с помощью мультипараметрической проточной цитометрии.

[0189] Медианное процентное содержание CAR+ Т-клеток в ЛП составляло 16% (в диапазоне 6 - 28%) от общего количества клеток, при этом медианное процентное содержание CD4+ CAR+ Т-клеток составляло 12% (в диапазоне 4 - 22%), а медианное
15 процентное содержание CD8+ CAR+ Т-клеток составляло 7% (в диапазоне 3 - 20%). Исследовали соотношение CD4:CD8 CAR+ Т-клеток в ЛП, и соответствующие результаты представлены на фиг. 14В на оси X. Также исследовали фенотип Т-клеток указанных пациентов до инфузии, как показано на фиг. 19. Наблюдалась значительная
20 вариабельность между пациентами в отношении состава ЛП относительно субпопуляций Т-клеток (т. е. наивных, Tscm, Tcm, Tem, Teff и Temra), хотя данный профиль был сопоставим в субпопуляциях CAR- и CAR+ Т-клеток у каждого пациента.

[0190] Пациентам осуществляли одну инфузию ЛП LCAR-B38M в целевой дозе, составляющей $0,75 \times 10^6$ CAR+ Т-клеток/кг (целевой диапазон составлял $0,5 - 1,0 \times 10^6$) (см. таблицу 3 (фаза 1b). Из 21 пациента, которым провели оценку заболевания после
25 определения исходного уровня, общая частота клинического ответа составляла 91% при медианной продолжительности последующего наблюдения в 3 месяца (диапазон 1 - 10). Из 15 пациентов, у которых получили образцы костного мозга (КМ) на 28-е сутки после инфузии и провели оценку указанных образцов с помощью проточной цитометрии нового поколения и (или) секвенирования нового поколения, у
30 пациентов¹⁰ был отрицательный статус относительно минимального остаточного заболевания при уровне чувствительности в 10^{-5} , у 2 пациентов – при уровне чувствительности в 10^{-4} , а у 3 пациентов были неидентифицированные клоны. Все пациенты экспрессировали ВСМА в опухолевых клетках КМ на исходном уровне, что

основано на оценке с помощью проточной цитометрии, хотя уровни варьировали среди пациентов. Клинические ответы, по всей видимости, не зависели от экспрессии ВСМА в КМ.

5 [0191] Исследовали S_{max} , а также степень увеличения числа и персистенция LCAR-B38M в цельной крови на протяжении периода данного исследования. Не ограничиваясь какой-либо теорией, S_{max} связана с клиническим ответом (его длительностью или глубиной). Степени достаточности и недостаточности увеличения числа клеток на пике могут обеспечивать информацию для более эффективного повышения дозы. Персистенция связана с клиническим ответом (его длительностью
10 или глубиной). Степени достаточности и недостаточности персистенции могут обеспечивать информацию для улучшения схемы введения доз. Характеристики лекарственного продукта (ЛП) также могут обеспечивать информацию об увеличении числа клеток или персистенции.

15 [0192] После инфузии число CAR+ Т-клеток увеличивалось и достигло пика, составляющего от 20% до 87% от общего количества Т-клеток в крови, в период от 10-х до 14-х суток после инфузии, как показано на фиг. 8B. Также проводили кПЦР-анализ, демонстрирующий число копий трансгена на микрограмм гДНК, как показано на фиг. 8A. S_{max} была высоко вариабельной среди пациентов, тогда как показатель T_{max} был постоянным среди пациентов. Соотношение CD4:CD8 и доля субпопуляций
20 Т-клеток памяти в конечном ЛП не коррелировали с пиком увеличения числа CAR+ Т-клеток. Увеличение числа CAR+ Т-клеток не коррелировало с клиническим ответом. Число CAR+ Т-клеток/мкл у 15/28 пациентов, прошедших по меньшей мере 11-недельный период последующего наблюдения, был < НПКО (2 клетки/мкл) на момент времени в 11 недель, как показано на фиг. 8A - 8C. Несмотря на предварительный
25 характер данных, не было различий в частоте клинического ответа у данных пациентов по сравнению с пациентами с измеряемыми уровнями CAR+ Т-клеток через 8 недель. Подобная тенденция наблюдалась и при оценке увеличения числа клеток и персистенции путем измерения уровней трансгена, на что указывают данные, представленные на фиг. 10A, 10B и 11B. В отличие от сравниваемого bb2121 CAR,
30 отсутствует корреляция между клиническим ответом и как S_{max} , так и персистенцией.

[0193] В то время как число и CD4+, и CD8+ CAR+ Т-клеток увеличивалось *in vivo*, соотношение CD4:CD8 CAR+ уменьшалось при пиковом увеличении числа клеток по

сравнению с конечным ЛП (от медианы, составляющей 1,54, до медианы, составляющей, 0,35, как показано на фиг. 14B), что указывает на предпочтительное увеличение числа CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток в крови. Расчет на основании эксплораторного анализа указывает на то, что соотношение CD4/CD8 во время Cmax (Tmax) CAR⁺ Т-клеток характеризуется медианой, составляющей 0,29, и диапазоном в 0,08 - 3,4 (см. 5 фиг. 42). На пике увеличения их числа, CD8⁺ CAR⁺ Т-клетки демонстрировали преимущественно фенотип центральных клеток памяти (T_{cm}) (CCR7⁺ CD45RO⁺; медиана составляла 90% [в диапазоне 29,3 - 98,5%], как показано на фиг. 20A). Напротив, CD4⁺ CAR⁺ Т-клетки были обогащены эффекторными клетками памяти 10 (T_{em}) (CCR7⁻ CD45RO⁺; медиана составляла 87% [в диапазоне 69,5 - 98,1%], как показано на фиг. 20B) на пике увеличения числа клеток. Подобная тенденция также наблюдалась касательно соотношения CD4:CD8, а также состава субпопуляции Т-клеток памяти, в КМ всех 11 пациентов, чьи образцы исследовали на 28-е сутки.

[0194] Как показано на фиг. 20A и 20B, в CD8⁺ CAR⁻ Т-клетках выявили 15 приблизительно соотношение 50:50 субпопуляций стволовых клеток памяти (T_{scm}):T_{cm}, тогда как в CD4⁺ CAR⁻ Т-клетках выявили приблизительно соотношение 50:50 субпопуляций T_{cm}:T_{em}, что указывает на различную направленность созревания CD4⁺ и CD8⁺ CAR⁺ и CAR⁻ Т-клеток.

[0195] Соотношение клеток, которые характеризуются как CD8⁺ CD45RO⁻ CD27⁺, 20 является предикативным показателем клинического ответа, как показано на фиг. 20C. Пациенты с полным клиническим ответом (CR) или с частичным клиническим ответом при измененном заболевании (PRTD) имели более высокое процентное содержание клеток CD8⁺ CD45RO⁻ CD27⁺, чем пациенты с частичным клиническим ответом (PR) или без клинического ответа (NR). На фиг. 20D представлены графики, на которых 25 показана корреляция процентного содержания стволовых CD8 Т-клеток памяти (левая панель) или наивных Т-клеток (правая панель) у каждого пациента; представленные данные сгруппированы по клиническому ответу.

[0196] Исследовали соотношение клеток, которые представляли собой клетки 30 множественной миеломы, и общих лейкоцитов в течение периода данного исследования, и соответствующие результаты представлены на фиг. 21A. На 56-е сутки соотношение клеток множественной миеломы и общих лейкоцитов снизилось ниже того уровня, который наблюдался в момент инфузии (0-е сутки).

[0197] Было высказано предположение, что уровни периферических провоспалительных цитокинов коррелируют с увеличением числа CAR⁺ Т-клеток CAR, подмножествами Т-клеток и профилем токсичности для пациента. СВЦ и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз / синдром активации макрофагов (HLH/MAS) могут коррелировать с высокими уровнями периферических цитокинов (ИЛ-6, ИЛ2-РА). Уровни ИЛ-6 могут коррелировать с пиковым увеличением числа CAR-Т клеток (Fraietta et al., 2018 Nature medicine 24, 563 - 571). Выбранные цитокины сыворотки крови могут служить показателем механизма действия (MoA) и частот субпопуляций Т-клеток. Проводили оценку периферических цитокинов при увеличении числа CAR-Т клеток и начале СВЦ. Как показано на фиг. 23 - фиг. 25, увеличение числа CAR⁺ Т-клеток коррелировало с повышением уровней цитокинов сыворотки крови (т. е. ИЛ-6, ИФН- γ , ИЛ-10), которое достигло пика около 10-х суток, что совпадает с пиком увеличения числа CAR⁺ Т-клеток. Наблюдали корреляцию между увеличением числа LCAR-B38M и стадией синдрома высвобождения цитокинов, как показано в анализе, приведенном на фиг. 22. Как правило, повышение некоторых провоспалительных цитокинов (т. е. ИЛ-6) коррелировало с появлением симптомов синдрома высвобождения цитокинов (медиана продолжительности периода до появления симптомов составляла 7 суток [в диапазоне 2 - 12]), как показано на фиг. 26А.

[0198] Проводили дополнительные анализы. Анализ процентного содержания PD1⁺ CAR⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с CD8 CAR и анализ процентного содержания CD4 Т-клеток проводили для нескольких моментов времени в течение периода данного исследования для каждого пациента, и соответствующие результаты представлены на фиг. 21С. Указанные результаты могут дать представление об истощении CAR-Т-клеток и их регуляторных механизмах.

[0199] Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что LCAR-B38M представляет собой дифференцированное CAR-Т-клеточное терапевтическое средство, которое является высокоактивным при относительно низкой дозе по сравнению с другими CAR-Т-клеточными терапевтическими средствами. Не ограничиваясь какой-либо теорией, высокая активность LCAR-B38M при относительно низкой дозе потенциально связана с предпочтительным и стабильным увеличением числа CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток, демонстрирующих фенотип клеток центральной памяти, *in vivo*.

[0200] В таблице 3 ниже обобщенно представлена процедура инфузии, выполняемая в исследовании ММУ2001, представленном выше, и в связанном с ним исследовании фазы 2.

Таблица 3: краткое описание инфузии JNJ-4528 набор данных для всех пролеченных (исследование ММУ2001)

	Фаза 1b	Фаза 2	Фаза 1b + Фаза 2
Набор данных: все пролеченные	29	68	97
Время от момента начального афереза до инфузии JNJ-4528 (сутки)			
N	29	68	97
Среднее (СО)	52,2 (17,74)	52,3 (19,74)	52,2 (19,07)
Медиана	44,0	47,0	47,0
Диапазон	(42; 120)	(41; 167)	(41; 167)
Время от момента афереза до инфузии JNJ-4528 (сутки) ^a			
N	29	68	97
Среднее (СО)	49,0 (15,00)	52,3 (19,74)	51,3 (18,44)
Медиана	44,0	47,0	46,0
Диапазон	(41; 120)	(41; 167)	(41; 167)
Продолжительность инфузии JNJ-4528 (минуты)			
N	29	68	97
Среднее (СО)	21,2 (6,29)	20,3 (11,86)	20,6 (10,48)
Медиана	20,0	17,0	19,0
Диапазон	(14; 38)	(5; 71)	(5; 71)
Общий объем введенной инфузии (мл)			
N	29	68	97
Среднее (СО)	66,6 (10,45)	69,1 (16,28)	68,4 (14,77)
Медиана	70,0	70,0	70,0
Диапазон	(30; 70)	(30; 140)	(30; 140)
Общее число CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток, введенных			

инфузионно (x10E6 клеток)

N	29	68	97
Среднее (CO)	59,81 (13,409)	54,69 (13,696)	56,22 (13,744)
Медиана	59,00	51,45	54,30
Диапазон	(35,7; 82,0)	(23,5; 93,1)	(23,5; 93,1)

Составленная доза JNJ-4528 (x10E6 клеток/кг)^b

N	29	68	97
Среднее (CO)	0,698 (0,0844)	0,694 (0,0821)	0,695 (0,0823)
Медиана	0,709	0,687	0,693
Диапазон	(0,54; 0,88)	(0,52; 0,94)	(0,52; 0,94)

Введенная доза JNJ-4528 (x10E6 клеток/кг)^c

N	29	68	97
Среднее (CO)	0,710 (0,877)	0,710 (0,0904)	0,710 (0,0892)
Медиана	0,722	0,707	0,709
Диапазон	(0,52; 0,89)	(0,51; 0,95)	(0,51; 0,95)

^a В случае нескольких попыток афереза используется аферез, который привел к завершению изготовлению JNJ-4528.

^b CAR-положительные жизнеспособные Т-клетки, скорректированные по массе при аферезе.

5 ^c CAR-положительные жизнеспособные Т-клетки, скорректированные по массе при инфузии JNJ-4528 (на момент инфузии JNJ-4528 или за 1 сутки до этого).

Примечание. Продолжительность инфузии включает в себя как фактическое время инфузии, так и время прерывания, если таковое имеется.

10 **[0201]** Содержание всех патентов, опубликованных заявок и ссылок, упоминаемых в данном документе, включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

[0202] Несмотря на то, что иллюстративные варианты осуществления данного изобретения были конкретным образом представлены и описаны в данном документе, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в данное изобретение могут быть внесены различные изменения в форме и деталях, без отступления от объема вариантов осуществления данного изобретения, охватываемых прилагаемой формулой изобретения.

Последовательности

10 **Аминокислотная последовательность CD8 α SP сигнального пептида LCAR-B38M**

CD8 α

MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 6)

15 **Аминокислотная последовательность VHH1 BCMA-связывающего домена LCAR-**

B38M

QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDIS
TSYADSVKGRFTISRDNAAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO: 1)

20 **Аминокислотная последовательность линкера G4S BCMA-связывающего домена**

LCAR-B38M

GGGG (SEQ ID NO: 5)

25 **Аминокислотная последовательность VHH2 BCMA-связывающего домена LCAR-**

B38M

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVAAISLPTLAYY
AESVKGRFTISRDNAAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ
VTVSS (SEQ ID NO: 3)

30 **Аминокислотная последовательность шарнирного участка LCAR-B38M CD8 α**

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 15)

Аминокислотная последовательность трансмембранного участка LCAR-B38M**CD8 α**

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8)

5 **Аминокислотная последовательность цитоплазматического участка LCAR-B38M****CD137**

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 12)

10 **Аминокислотная последовательность цитоплазматического участка LCAR-B38M****CD3 ζ** RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
PR (SEQ ID NO: 10)15 **Нуклеотидная последовательность CD8 α SP сигнального пептида LCAR-B38M****CD8 α** ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGC
TCGCCCT (SEQ ID NO: 7)20 **Нуклеотидная последовательность VHH1 BCMA-связывающего домена LCAR-B38M**CAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTG
CGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCTGGT
TTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGGCTGGAGGG
25 ACATCTCCACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGA
CAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACAC
CGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCCCTGG
GGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 2)30 **Нуклеотидная последовательность линкера G4S домена связывания LCAR-B38M BCMA (SEQ ID NO: 5)**

GGAGGAGGAGGATCT (SEQ ID NO: 16)

Нуклеотидная последовательность VHH2 ВСМА-связывающего домена LCAR-B38M

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGGAGGCTCTCTG
 AGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACAATGGGCTGGTTTAGGCAG
 5 GCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTG
 GCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCCGCGATAACGCCA
 AGAATACAGTGGTGTGCTGCAGATGAACTCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGT
 ACTATTGTGCCGCCGATCGGAAGAGCGTGATGAGCATTAGACCAGACTATTGGGG
 GCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 4)

10

Нуклеотидная последовательность шарнирного участка LCAR-B38M CD8 α

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG
 CCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGAC
 ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 14)

15

Нуклеотидная последовательность трансмембранного участка LCAR-B38M CD8 α

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGT
 TATCACCCCTTTACTGC (SEQ ID NO: 9)

Нуклеотидная последовательность цитоплазматического участка LCAR-B38M

CD137

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA
 GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA
 AGAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 13)

25

Нуклеотидная последовательность цитоплазматического участка LCAR-B38M

CD3 ζ

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
 CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
 30 AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
 TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG
 TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
 CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
 CTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 11)

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, имеющего онкологическое заболевание, включающий в себя введение указанному субъекту по меньшей мере одной дозы клеток, содержащих полипептид химерного антигенного рецептора (CAR), содержащий:
- 5 а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первый связывающий фрагмент антитела против ВСМА и второй ВСМА-связывающий фрагмент;
- б) трансмембранный домен; и
- 10 в) внутриклеточный сигнальный домен,
- необязательно при этом указанные клетки представляют собой CAR-T-клетки.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что число указанных клеток увеличивают *in vitro* до инфузии.
- 15 3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанные клетки представляют собой Т-клетки, NK-клетки, iPSC-NK-клетки.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные клетки представляют собой CAR-
- 20 Т-клетки.
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанные клетки представляют собой NKT-клетки, iPSC-T-клетки или гамма-дельта Т-клетки.
- 25 6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанные клетки являются гетерологичными или аутологичными.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанная доза содержит от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ указанных CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного
- 30 субъекта.
8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанная доза содержит от $5,5 \times 10^5$ до 8×10^6 указанных CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного субъекта.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанная доза содержит около $7,5 \times 10^5$ указанных CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного субъекта.
- 5 10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанная доза содержит от 1×10^6 до 1×10^8 указанных CAR-T-клеток.
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанная доза содержит от 2×10^7 до 8×10^6 указанных CAR-T-клеток.
- 10 12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанная доза содержит около $5,25 \times 10^7$ указанных CAR-T-клеток.
13. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанные клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $4,0 \times 10^5$ до $1,0 \times 10^6$ указанных CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного субъекта.
- 15 14. Способ по любому из пп. 1-6 и п. 13, отличающийся тем, что указанные клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от $5,5 \times 10^5$ до 8×10^5 указанных CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного субъекта.
- 20 15. Способ по любому из пп. 1-6, п. 13 и п. 14, отличающийся тем, что указанные клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $7,5 \times 10^5$ указанных CAR-T-клеток на килограмм массы тела указанного субъекта.
- 25 16. Способ по любому из пп. 1-7 и пп. 13-15, отличающийся тем, что указанные клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от 1×10^6 до 1×10^8 указанных CAR-T-клеток у указанного субъекта.
- 30 17. Способ по любому из пп. 1-7 и пп. 13-16, отличающийся тем, что указанные клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему от 2×10^7 до 8×10^7 указанных CAR-T-клеток у указанного субъекта.

18. Способ по любому из пп. 1-7 и пп. 13-17, отличающийся тем, что указанные клетки вводят в дозе, приводящей к количеству, составляющему около $5,25 \times 10^7$ указанных CAR-T-клеток у указанного субъекта.
- 5 19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что указанную дозу CAR-T-клеток вводят только один раз во время курса лечения.
20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанную дозу CAR-T-клеток вводят внутривенно.
- 10 21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что указанное онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что множественная миелома представляет собой рефрактерную множественную миелому или рецидивирующую множественную миелому.
- 15 23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем
- 20 4.
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 2.
- 25 25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,8.
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,7.
- 30 27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,6.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,4.
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,2.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток и CD8+ CAR-T-клеток в указанной дозе CAR-T-клеток составляет меньше чем 1,0.
31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 3,5.
32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 2,0.
33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 1,2.
34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,8.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,6.
36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,4.
37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что соотношение CD4+ CAR-T-клеток при Smax и CD8+ CAR-T-клеток при Smax составляет меньше чем 0,3.
38. Способ по любому из пп. 1-37, дополнительно включающий в себя анализ количества CD4+ CAR-T-клеток и (или) CD8+ CAR-T-клеток у указанного субъекта.

39. Способ по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент и (или) указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент представляют собой одАт против ВСМА.

5 40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой первое одАт против ВСМА, и указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент представляет собой второе одАт против ВСМА.

10 41. Способ по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент содержит следующую аминокислотную последовательность:
QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDIS
TSYADSVKGRFTISRDNAAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO: 1).

15 42. Способ по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что указанный первый ВСМА-связывающий фрагмент содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:
CAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTG
CGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCTGGT
20 TTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGGCTGGAGGG
ACATCTCCACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGA
CAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCAGGACAC
CGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCTCTGG
GGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 2).

25 43. Способ по любому из пп. 1-42, отличающийся тем, что указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент содержит следующую аминокислотную последовательность:
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYYY
AESVKGRFTISRDNAAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ
30 VTVSS (SEQ ID NO: 3).

44. Способ по любому из пп. 1-43, отличающийся тем, что указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGGAGGCTCTCTG
 AGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACAATGGGCTGGTTTAGGCAG
 GCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTG
 GCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCCGCGATAACGCCA
 5 AGAATACAGTGGTGCTGCAGATGAACTCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGT
 АСТАТТGTGCCCGCCGATCGGAAGAGCGTGATGAGCATTAGACCAGACTATTGGGG
 GCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 4).

10 45. Способ по любому из пп. 1-44, отличающийся тем, что указанный первый ВСМА-
 связывающий фрагмент и указанный второй ВСМА-связывающий фрагмент связаны
 друг с другом посредством пептидного линкера.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанный пептидный линкер содержит
 следующую аминокислотную последовательность: GGGGS (SEQ ID NO: 5).

15 47. Способ по любому из пп. 1-46, отличающийся тем, что указанный полипептид CAR
 дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце указанного
 полипептида.

20 48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что указанный сигнальный пептид получен из
 CD8 α .

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что указанный сигнальный пептид содержит
 следующую аминокислотную последовательность:

25 MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 6).

50. Способ по п. 48, отличающийся тем, что указанный сигнальный пептид содержит
 полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

30 ATGGCTCTGCCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGC
 TCGCCCT (SEQ ID NO: 7).

51. Способ по любому из пп. 1-48, отличающийся тем, что указанный
 трансмембранный домен содержит следующую аминокислотную последовательность:
 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 8).

52. Способ по любому из пп. 1-48, отличающийся тем, что указанный трансмембранный домен содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

5 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGT
TATCACCCCTTTACTGC (SEQ ID NO: 9).

53. Способ по любому из пп. 1-52, отличающийся тем, что указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен эффекторной иммунокомпетентной клетки.

54. Способ по любому из пп. 1-52, отличающийся тем, что указанный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 ζ .

15 55. Способ по любому из пп. 1-54, отличающийся тем, что указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит один или большее число костимулирующих сигнальных доменов.

20 56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит следующую аминокислотную последовательность:
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR (SEQ ID NO: 10).

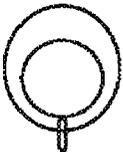
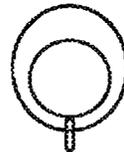
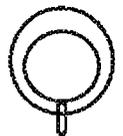
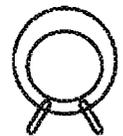
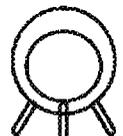
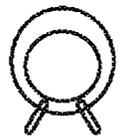
25 57. Способ по п. 55, отличающийся тем, что указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:

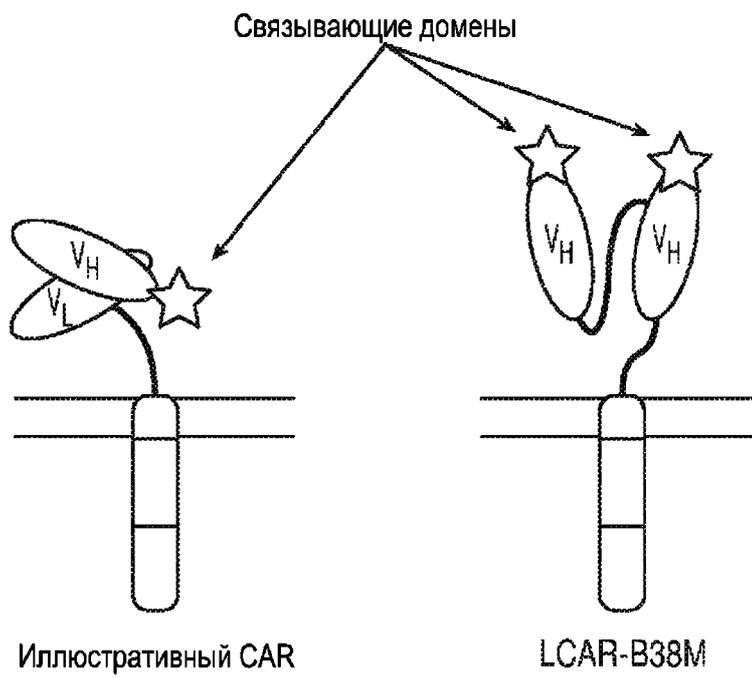
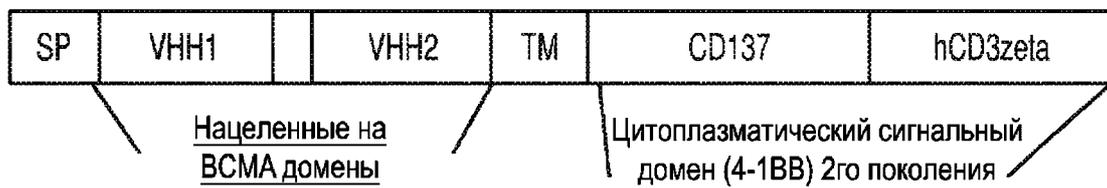
30 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAAC
CAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAG
TGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTA
CCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
CTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 11).

58. Способ по любому из пп. 55-57, отличающийся тем, что указанный
внутриклеточный сигнальный домен содержит следующую аминокислотную
последовательность: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
5 (SEQ ID NO: 12).
59. Способ по любому из пп. 55-57, отличающийся тем, что указанный
внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид, кодируемый следующей
последовательностью нуклеиновой кислоты:
10 AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA
GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA
GAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 13).
60. Способ по любому из пп. 1-59, отличающийся тем, что указанный полипептид CAR
15 дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между С-концом
указанного внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом указанного
трансмембранного домена.
61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что указанный шарнирный домен содержит
20 следующую аминокислотную последовательность:
TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 15).
62. Способ по п. 60, отличающийся тем, что указанный шарнирный домен содержит
полипептид, кодируемый следующей последовательностью нуклеиновой кислоты:
25 ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAG
CCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGAC
ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 14).
63. Способ по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что указанные Т-клетки
30 представляют собой аутологичные Т-клетки.
64. Способ по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что указанные Т-клетки
представляют собой аллогенные Т-клетки.

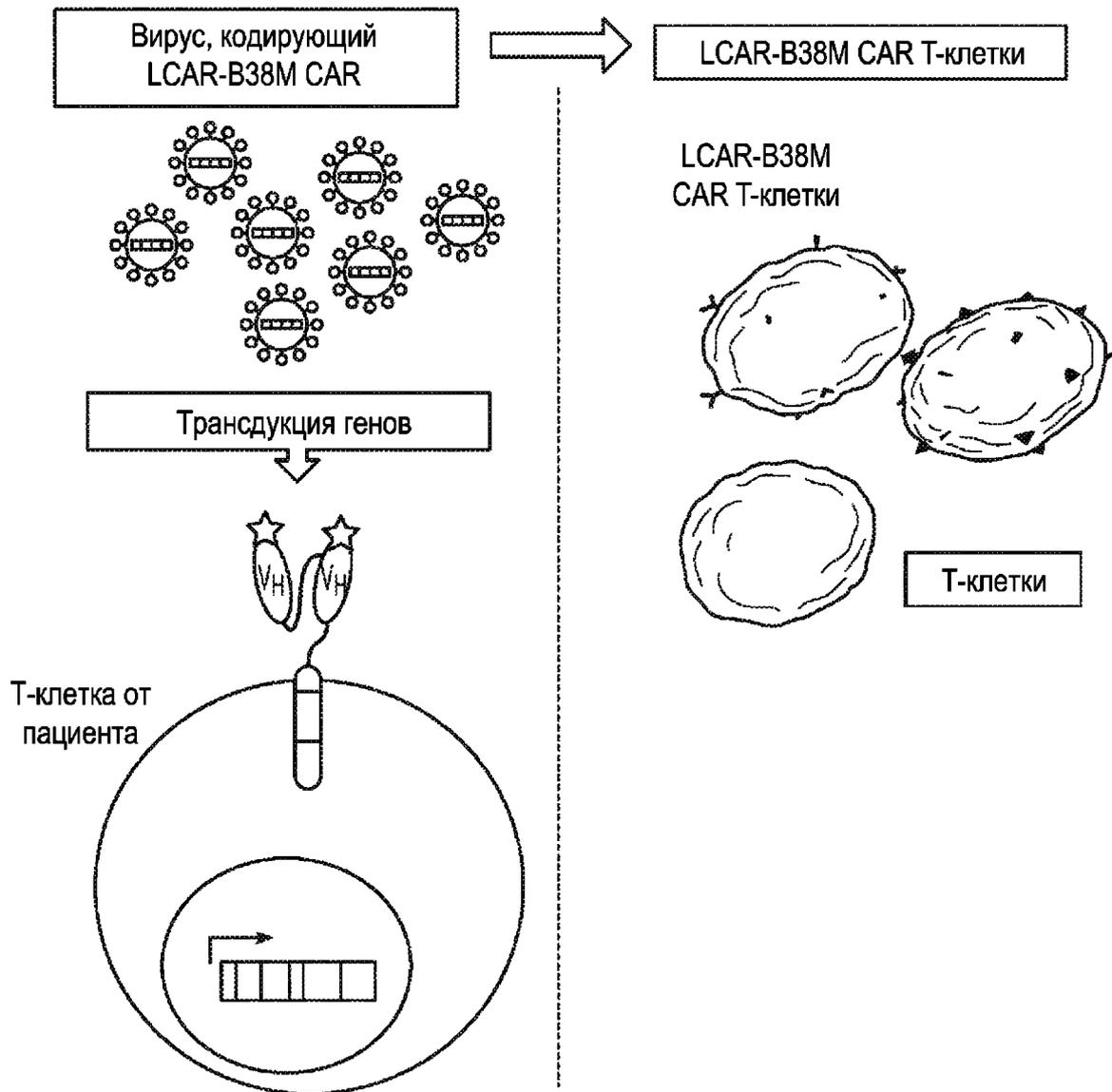
65. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

ФИГ. 1

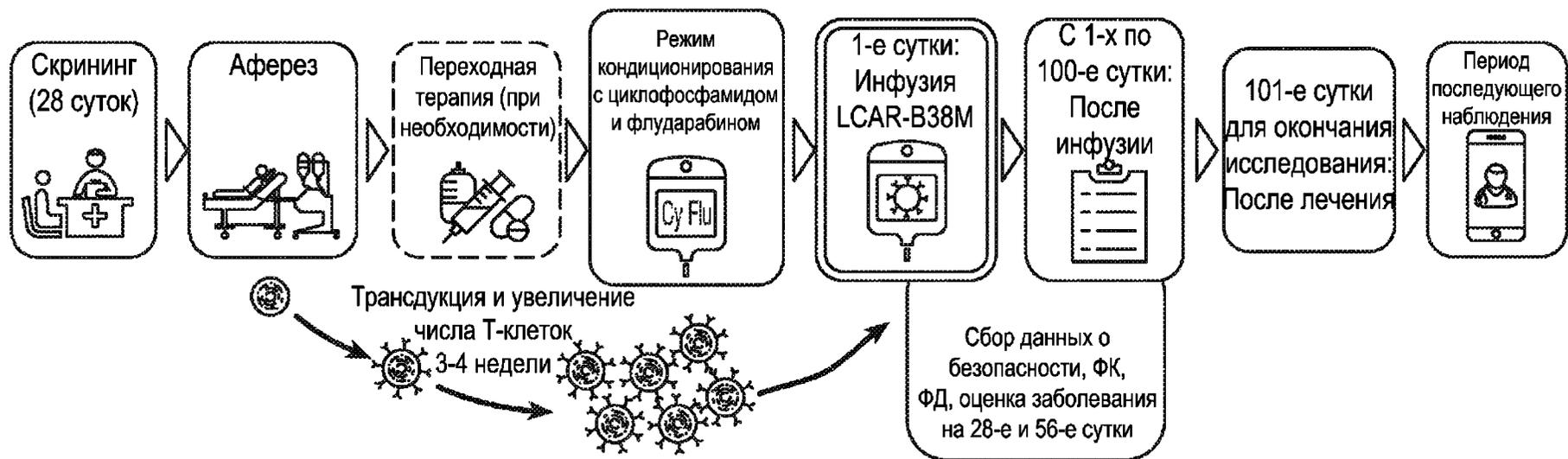
Костный мозг	Кровь КМ, селезенка	Лимфатический узел				Костный мозг ЛУ, MALT	Множественная миелома
Незрелая В-клетка	Переходная В-клетка	Наивная	GC	Память	Плазмабласт	Долгоживущая плазматическая клетка	
							
BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R BCMA	BAFF-R BCMA TACI	BCMA TACI	BCMA TACI CD138	BCMA +/- TACI CD138

ФИГ. 2А

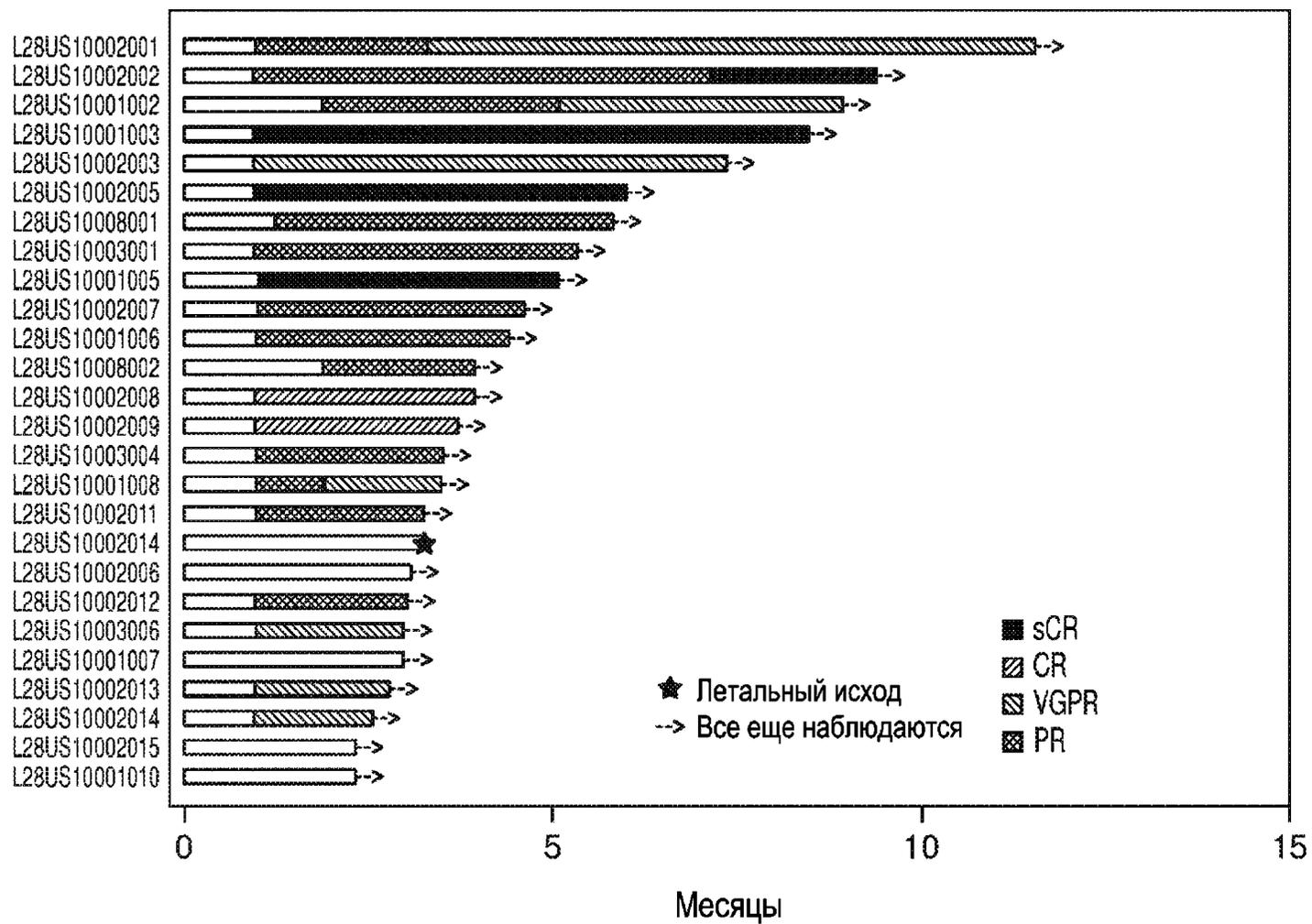
ФИГ. 2В



ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5А

ID субъекта	28-е сутки			56-е сутки			184-е сутки			365-е сутки		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
L28US10002001		F-					NGS-	NGS-	NGS-	NGS-	NGS-	NGS-
L28US10002002	NGS-	NGS-/F-	NGS+				NGS-	NGS-/F-	Неопред.			
L28US10001002	NGS-	Неопред.	Неопред.									
L28US10001003	NGS-	Неопред.	Неопред.									
L28US10002004	Образец не получен											
L28US10002003	NGS-	NGS-/F-	NGS-				NGS-	NGS-/F-	Неопред.			
L28US10002005	Сбой калибр.	F-					Отправлено	Отправлено	Отправлено			
L28US10008001	Сбой калибр.											
L28US10003001	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10001005	Сбой калибр.											
L28US10002007	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10001006	NGS-	NGS-	Неопред.									
L28US10002008	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10008002	Сбой калибр.											
L28US10002009	NGS-	NGS-/F-	NGS-		/F-							
L28US10003004	NGS-	NGS-	Неопред.	NGS-	NGS-	NGS-						
L28US10001008	NGS-	NGS-	Неопред.									
L28US10002011	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10002006	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10002012	NGS-	NGS-/F-	Неопред.									

F = проточная цитометрия
 NGS = ClonoSeq

XXX = отрицательный
XXX = положительный
 Неопред. = Неопределенно

ФИГ. 5В

ID субъекта	28-е сутки			56-е сутки			184-е сутки			365-сутки		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
L28US10001007	Отправлено	Отправлено/F-	Отправлено									
L28US10001010	NGS-	Неопред.	Неопред.									
L28US10002013	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10002014		/F-			/F-							
L28US10002015	NGS-	NGS-	NGS-									
L28US10003006	Отправлено	Отправлено	Отправлено	NGS-	NGS-	NGS-						
L28US10003010	NGS-	Неопред.	Неопред.									
L28US10004001	NGS-	NGS-	Неопред.									
L28US10008004	NGS-	NGS-	Неопред.									
L28US10008005	NGS-	NGS-	NGS-									

F = проточная цитометрия
 NGS = ClonoSeq

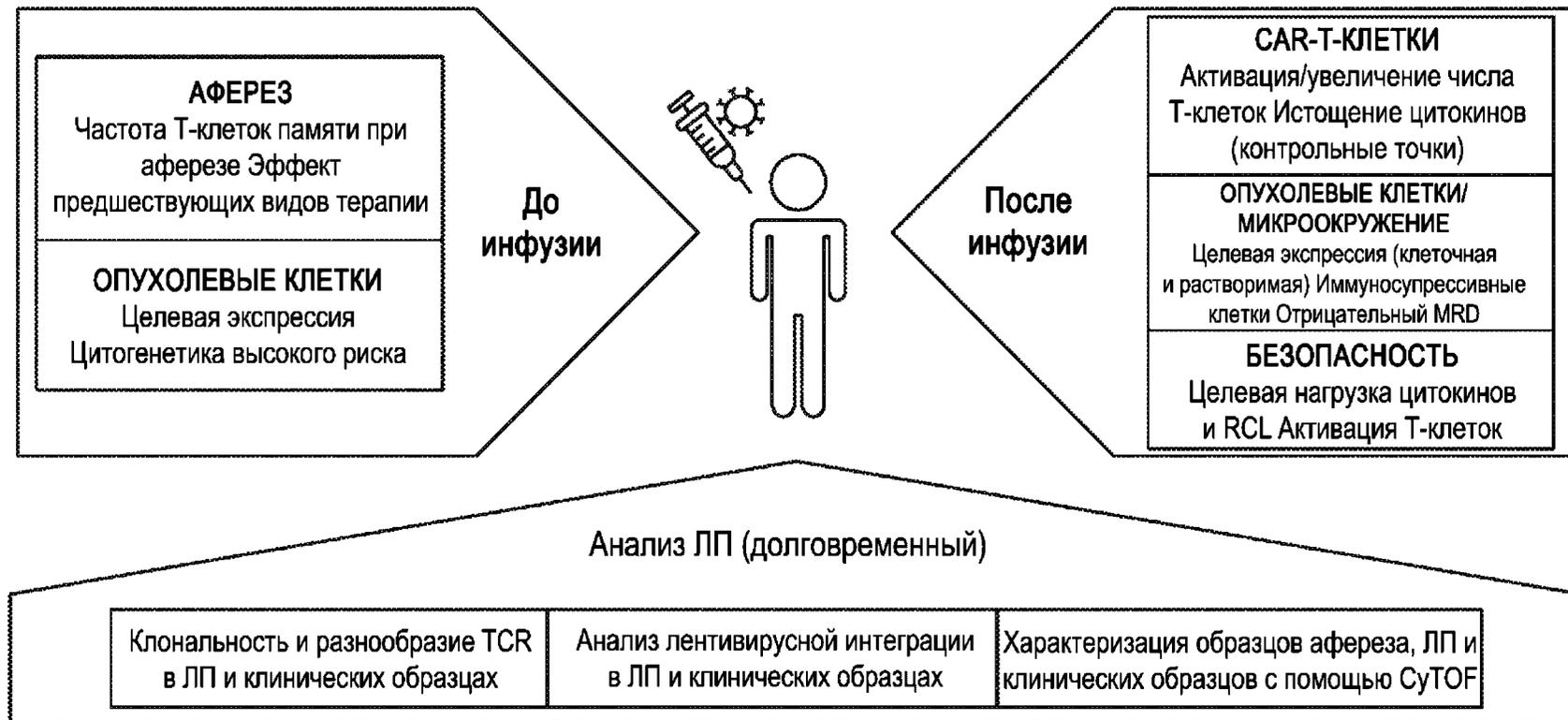
XXX = отрицательный

XXX = положительный

Неопред. = Неопределенно

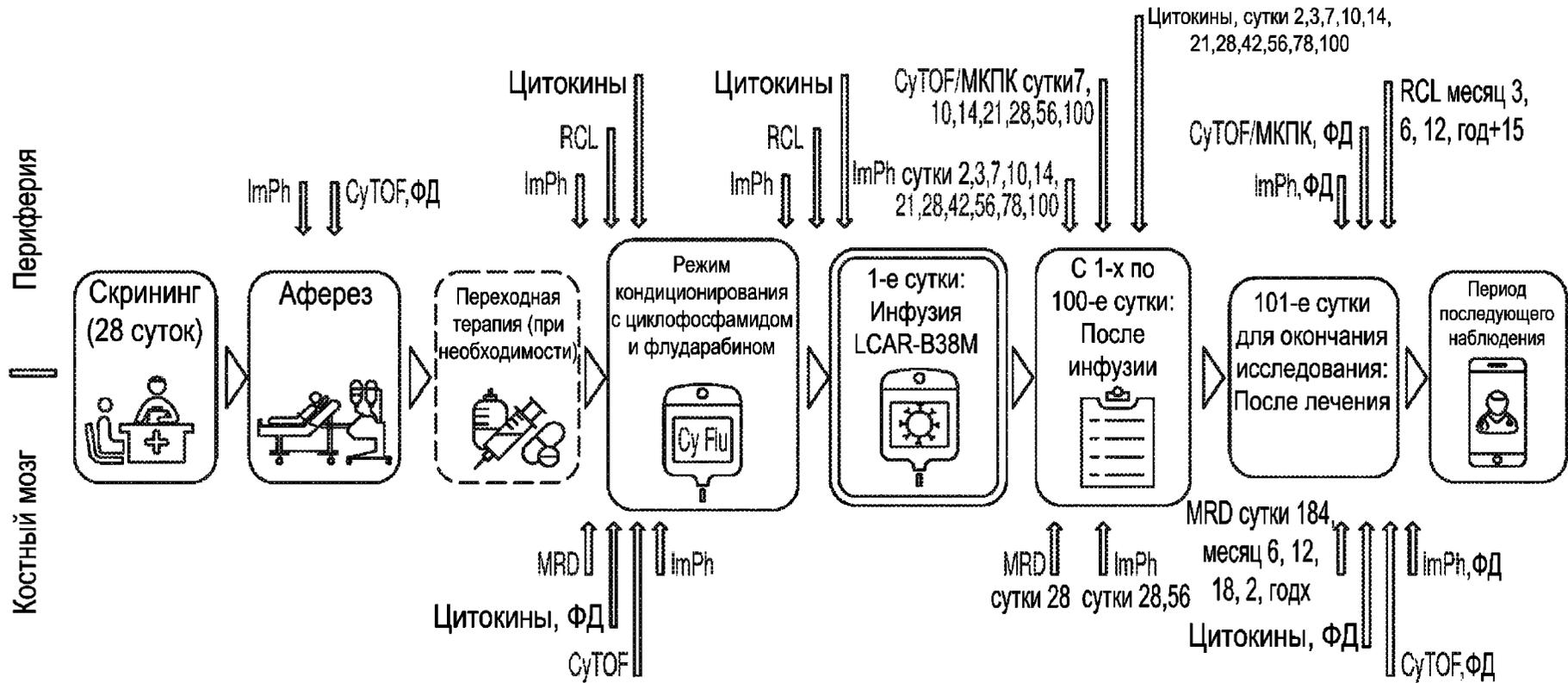
ФИГ. 6

Трансляционное исследование CAR-T-клеточной терапии (MMY2001)



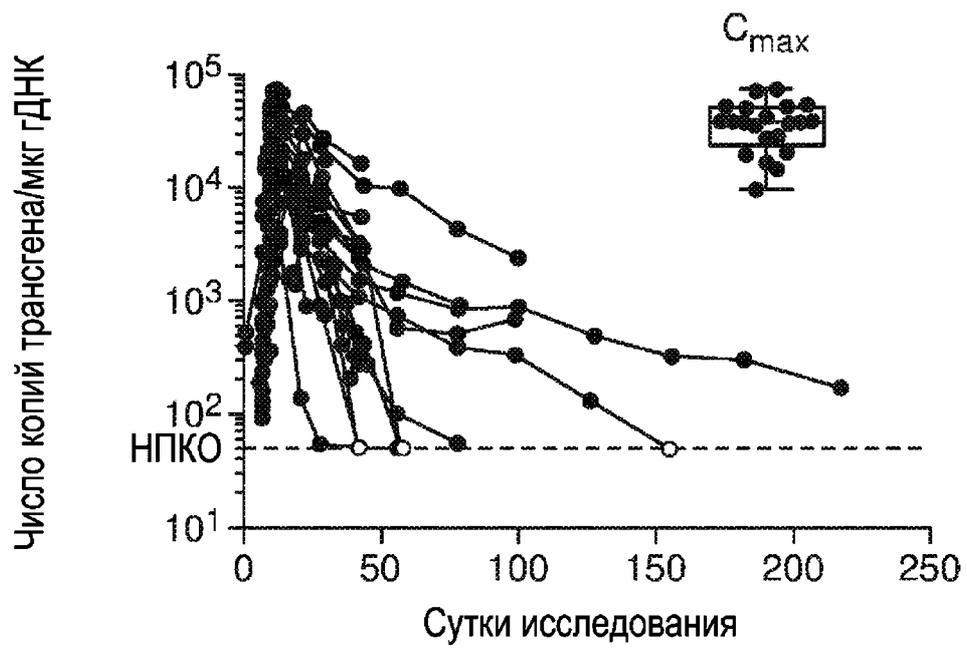
СуТОФ – цитометрия по времени пролета; ЛП – лекарственный продукт; TCR – Т-клеточный рецептор.

ФИГ. 7



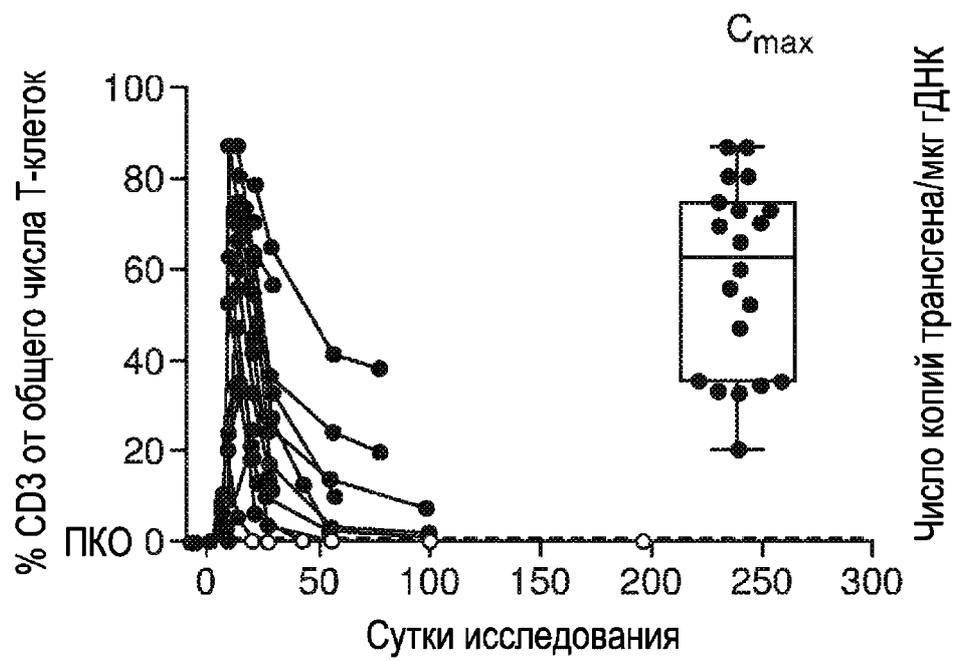
ФИГ. 8А

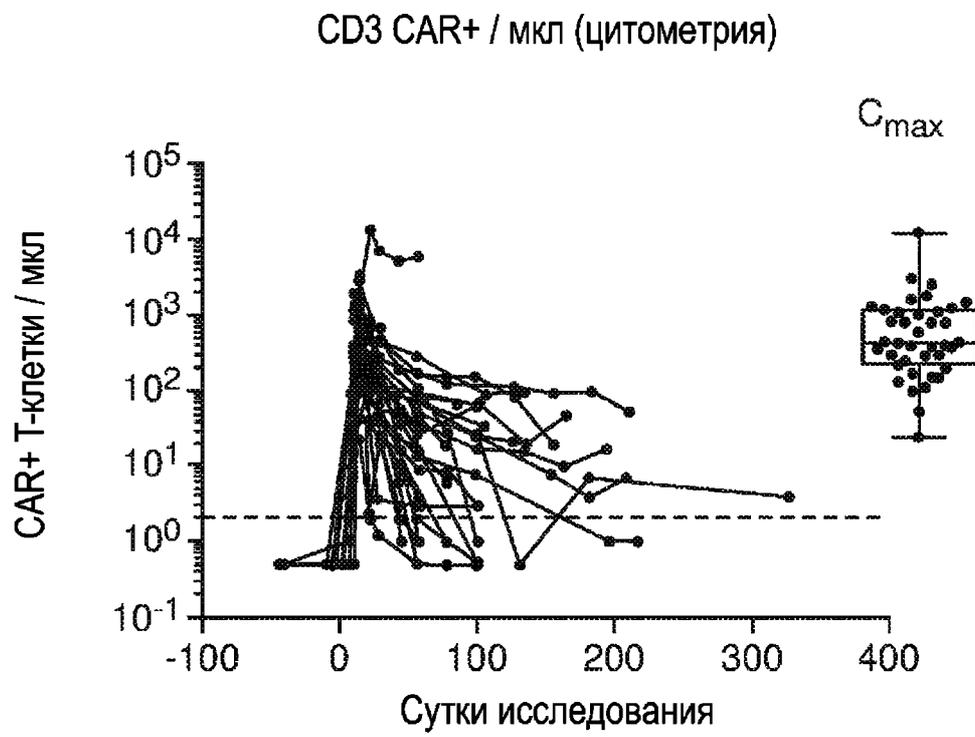
Число копий трансгена CAR/мкг гДНК (кПЦР)

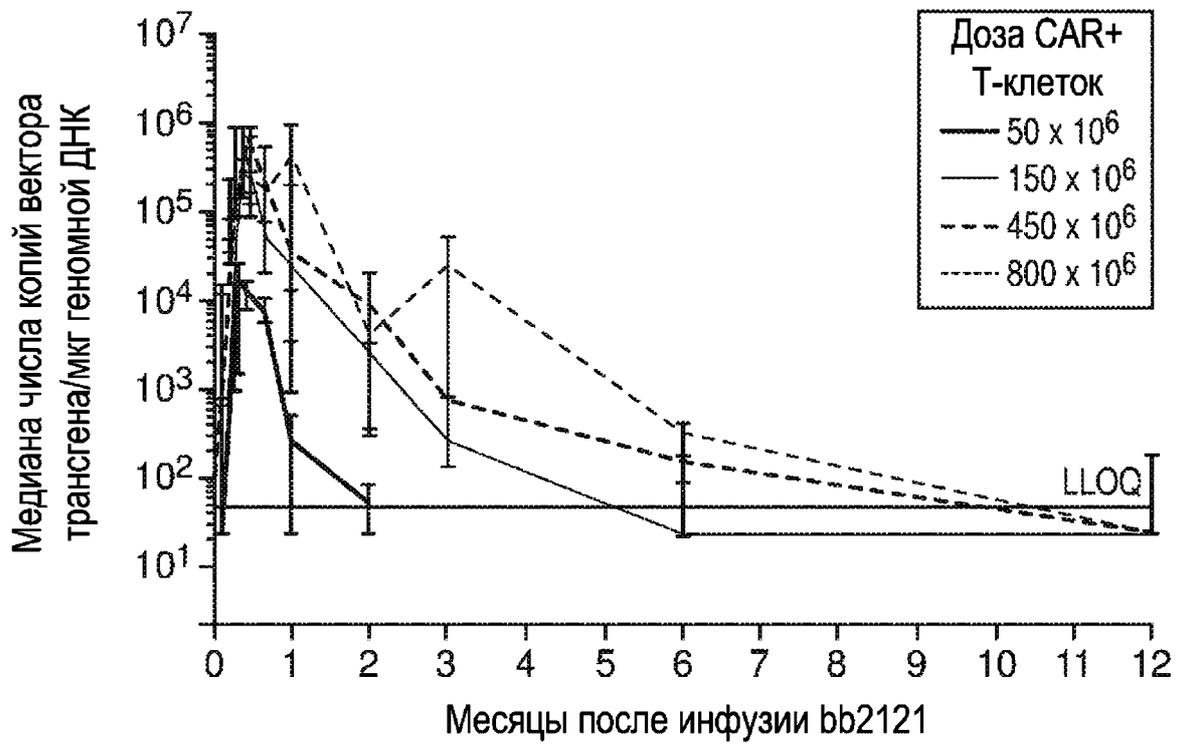


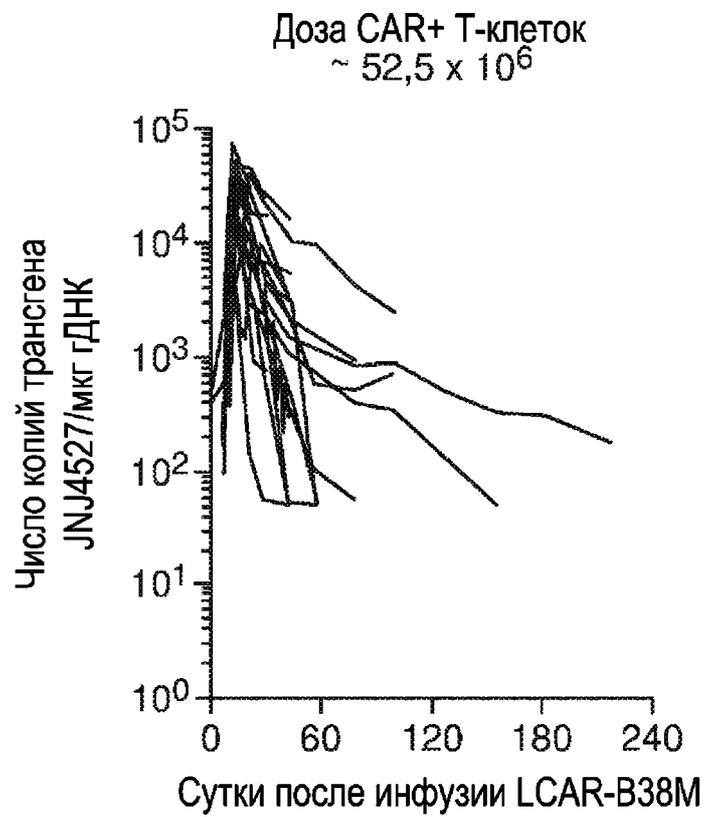
ФИГ. 8В

% CD3 CAR+ Т-клеток от общего числа Т-клеток (цитометрия)



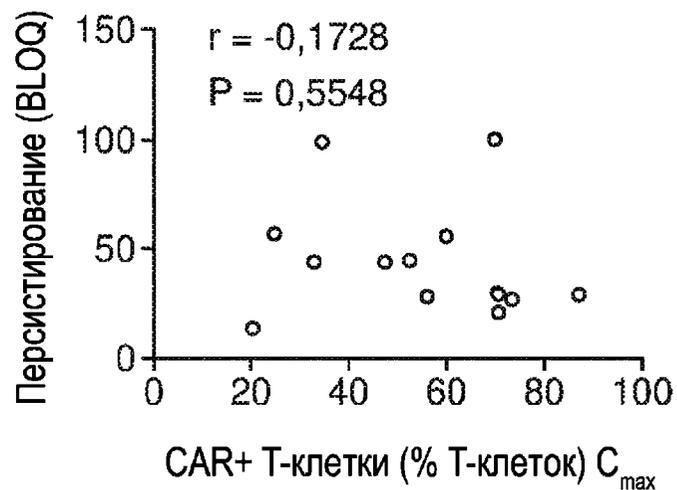
ФИГ. 8С

ФИГ. 9А

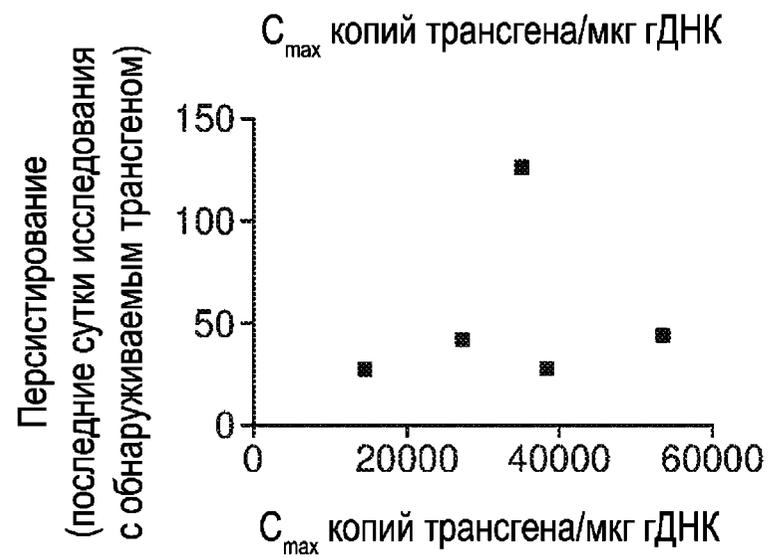
ФИГ. 9В

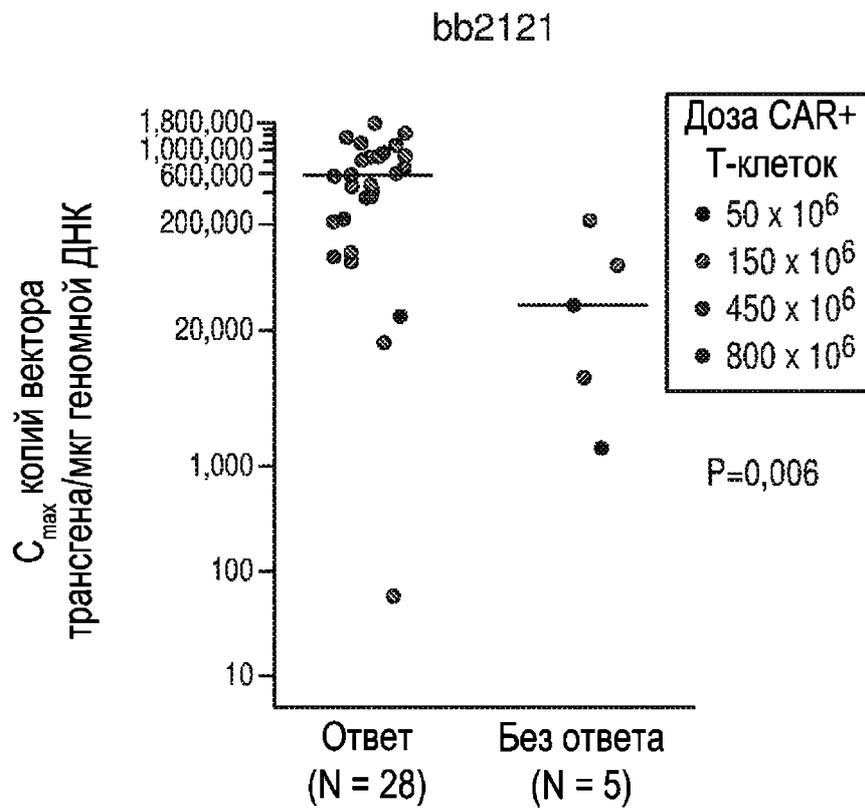
ФИГ. 10А

%CAR+ T-клеток C_{max} от общего числа CD3 T-клеток

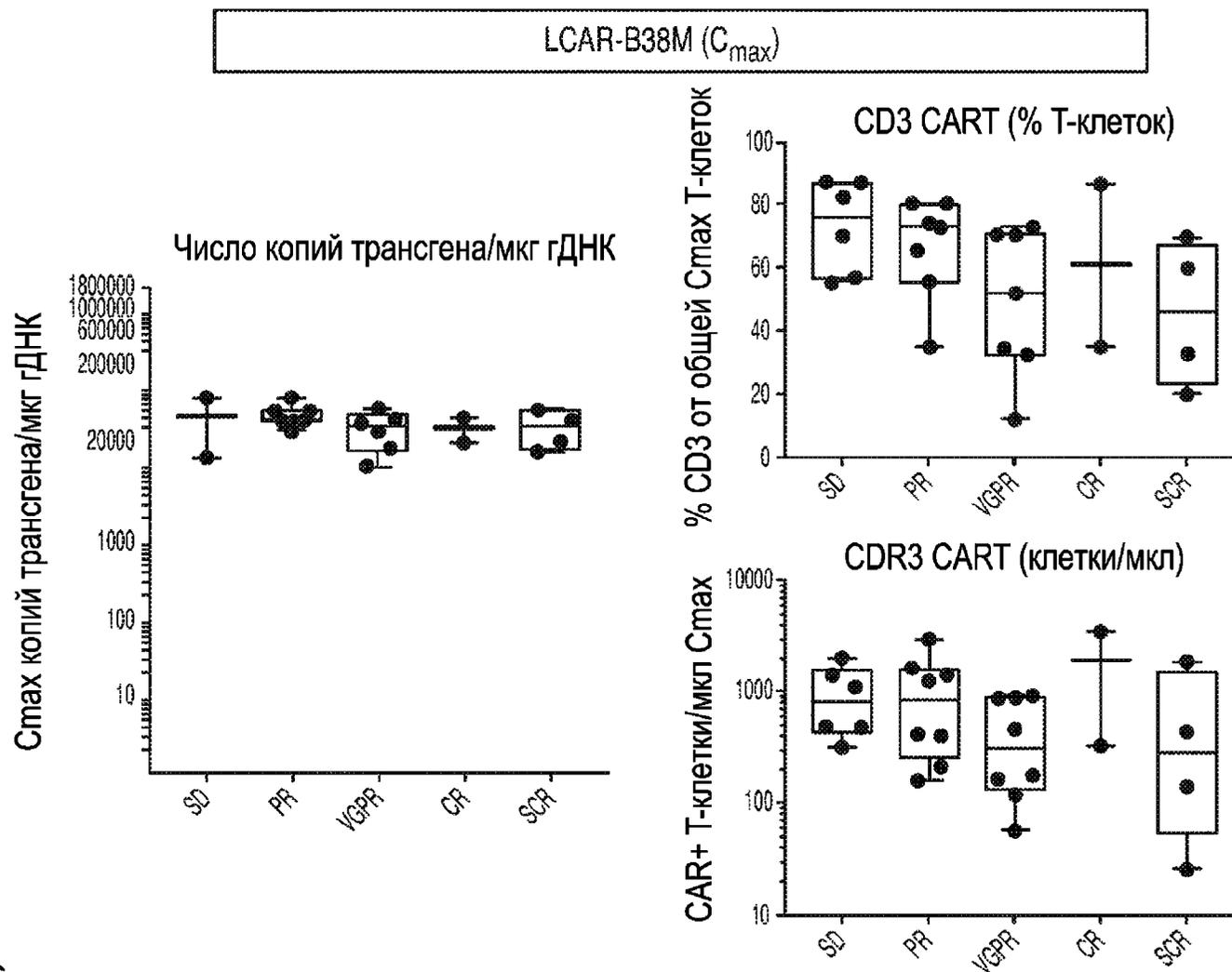


ФИГ. 10В

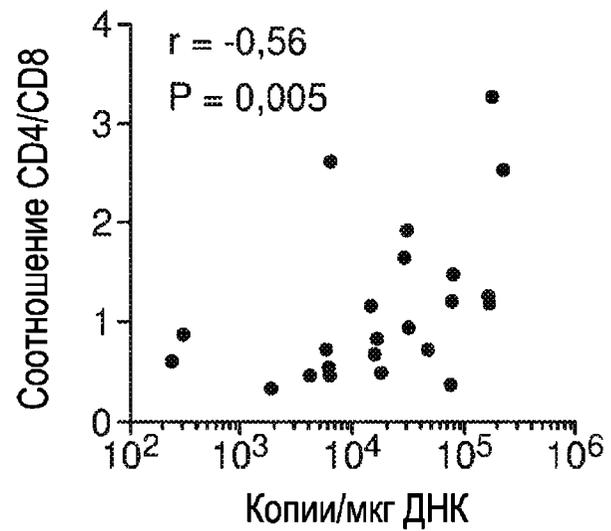


ФИГ. 11А

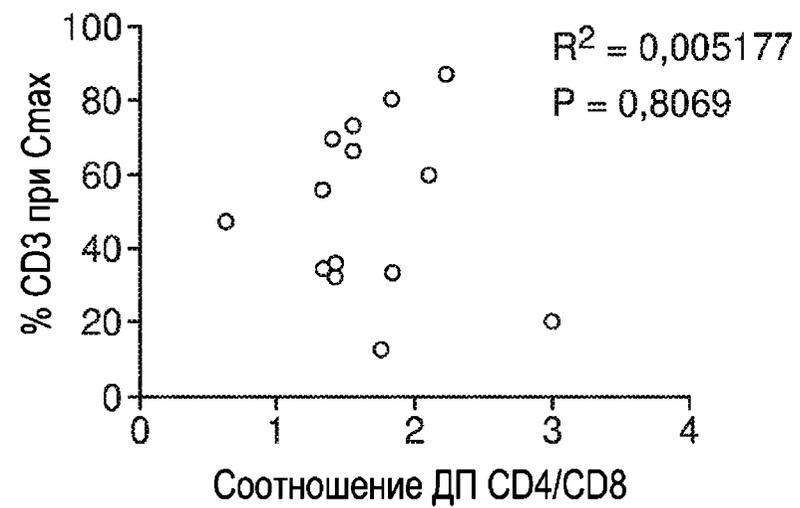
ФИГ. 11В



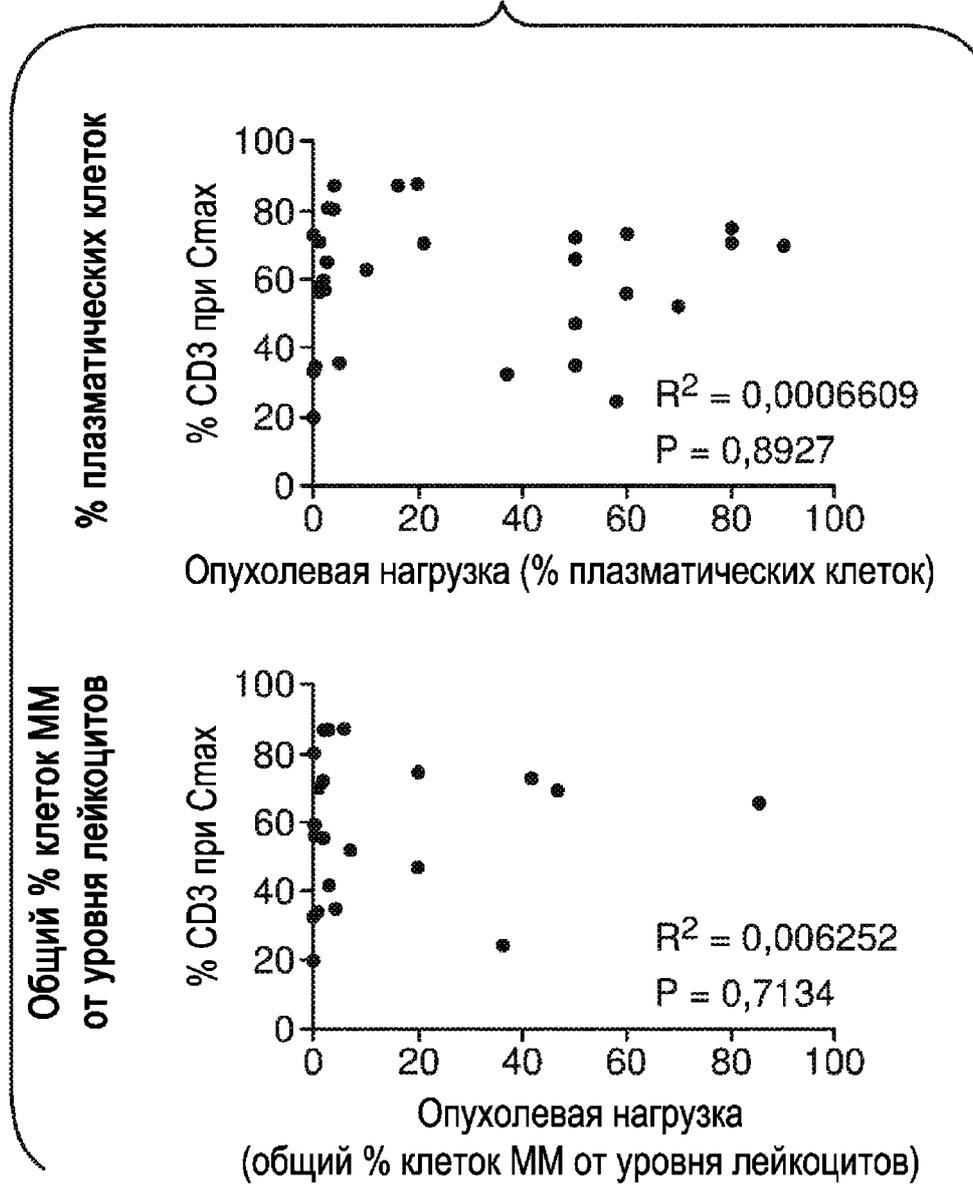
ФИГ. 11С

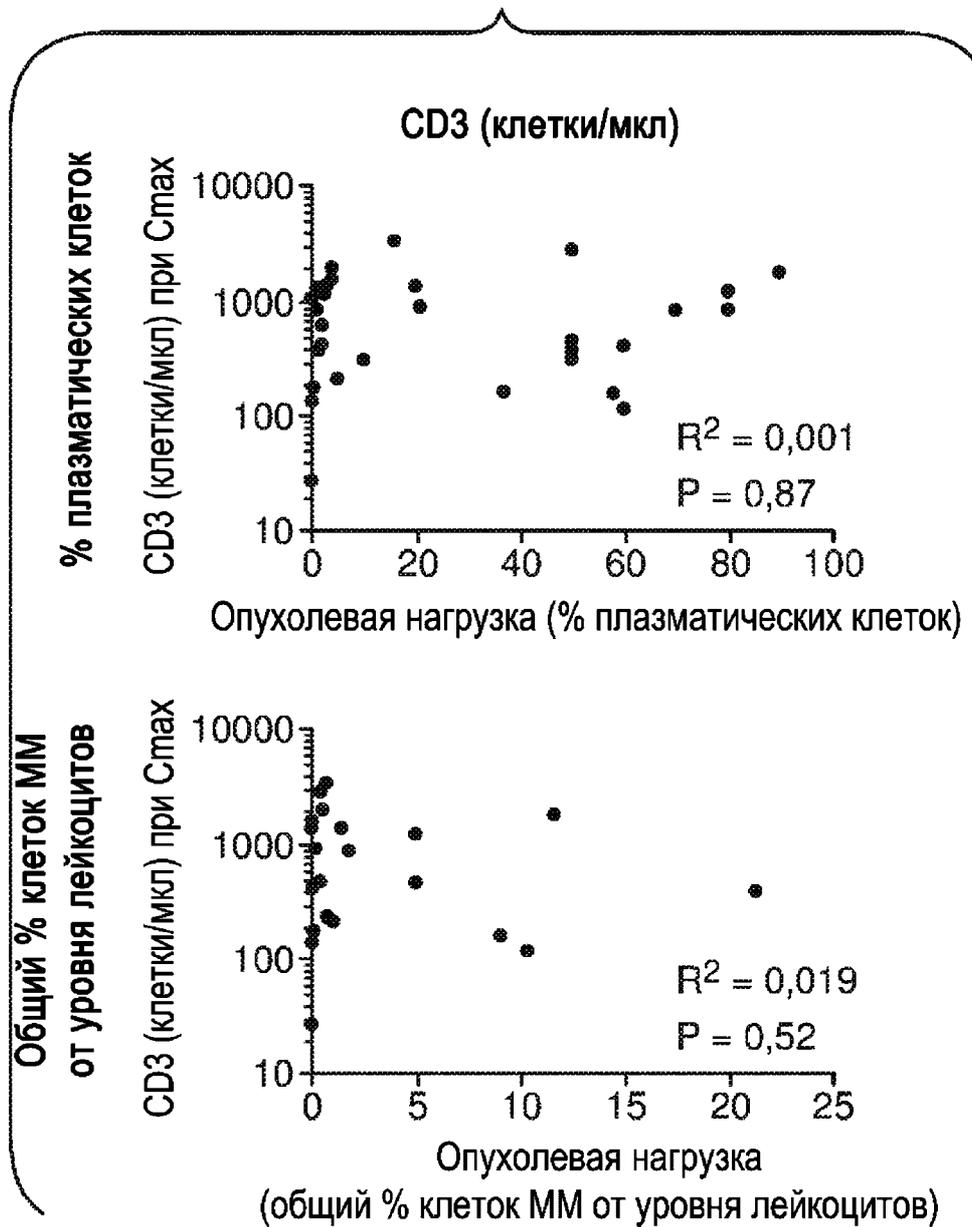


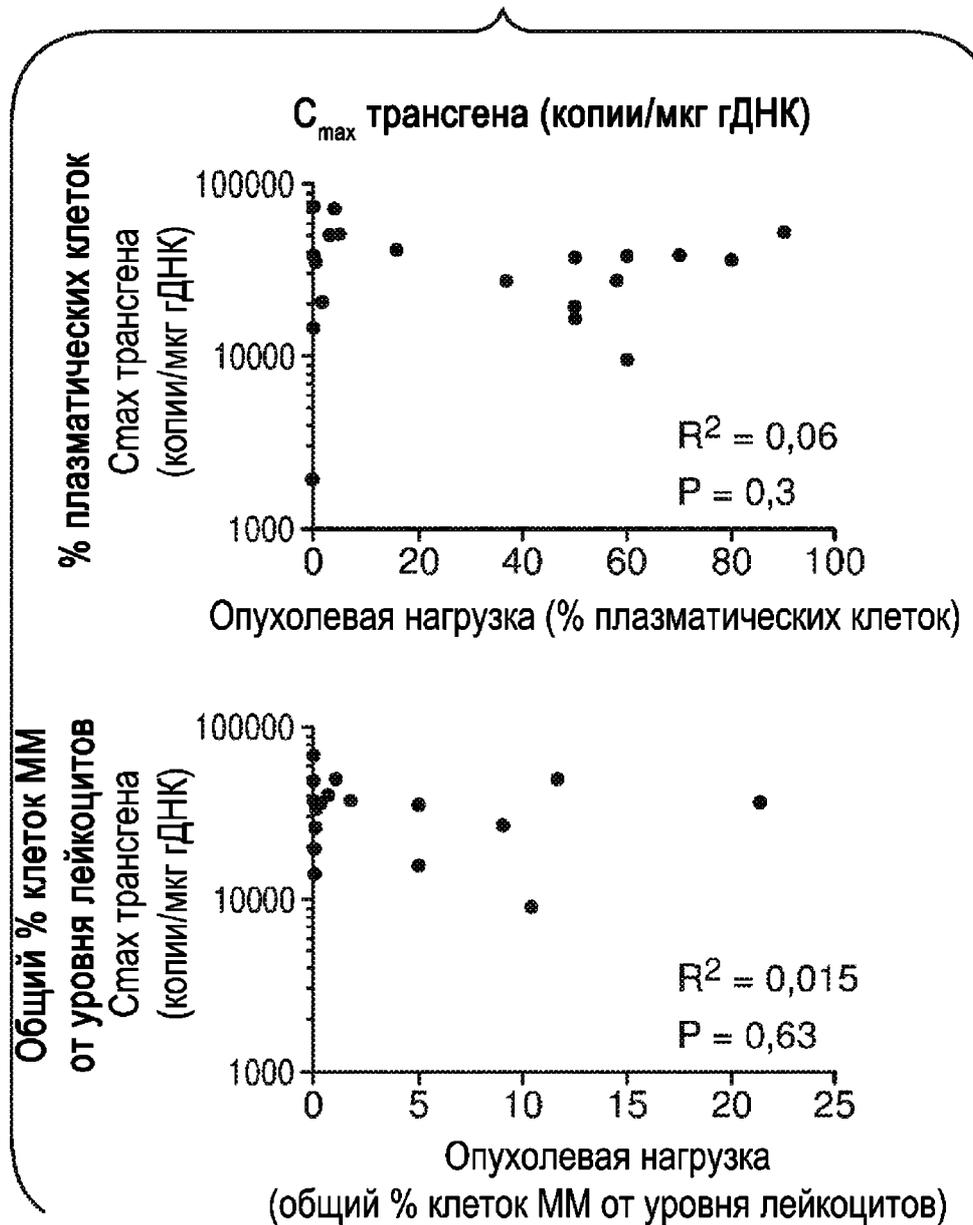
ФИГ. 11D



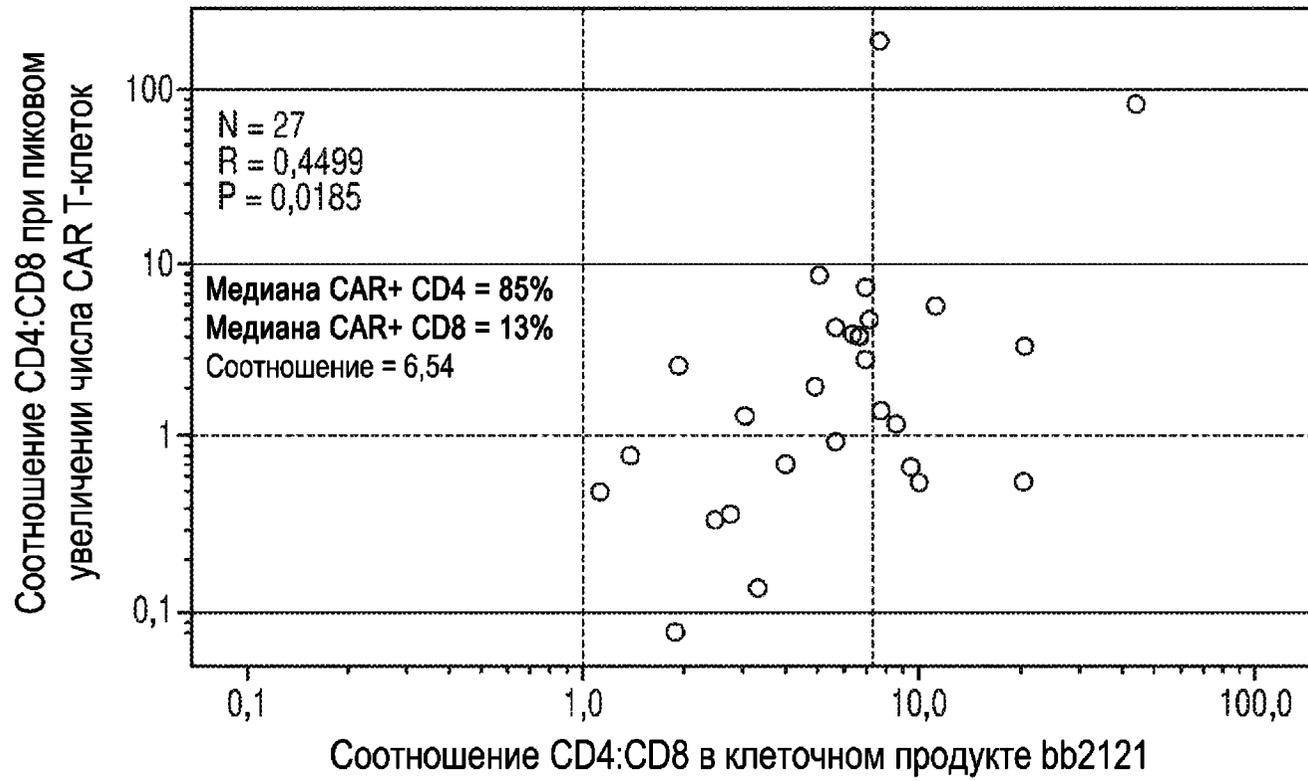
ФИГ. 12

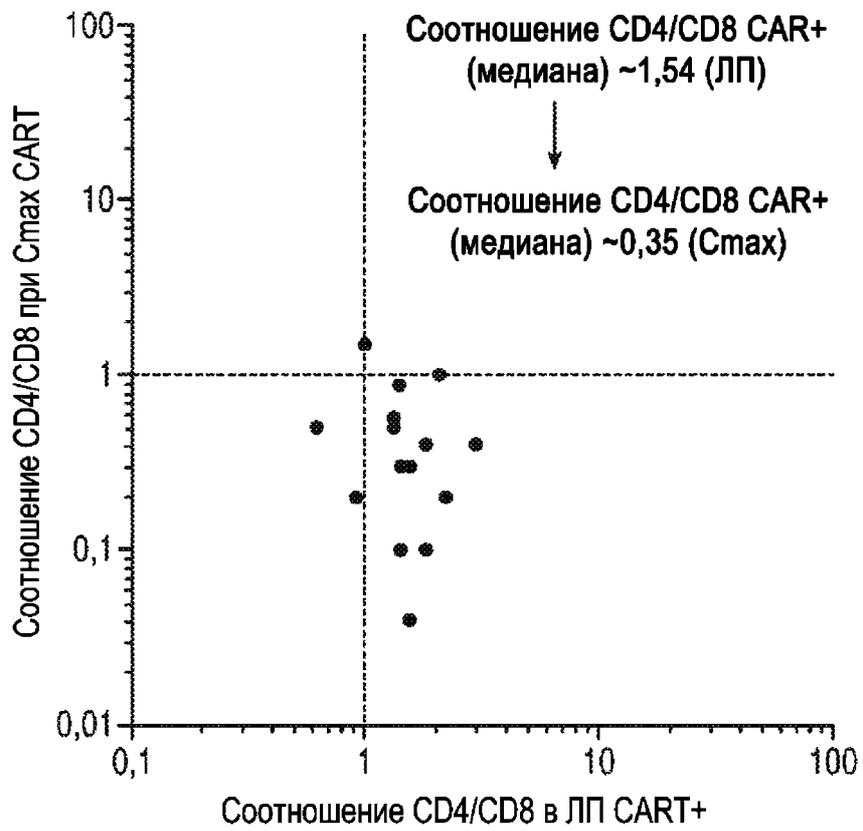


ФИГ. 13А

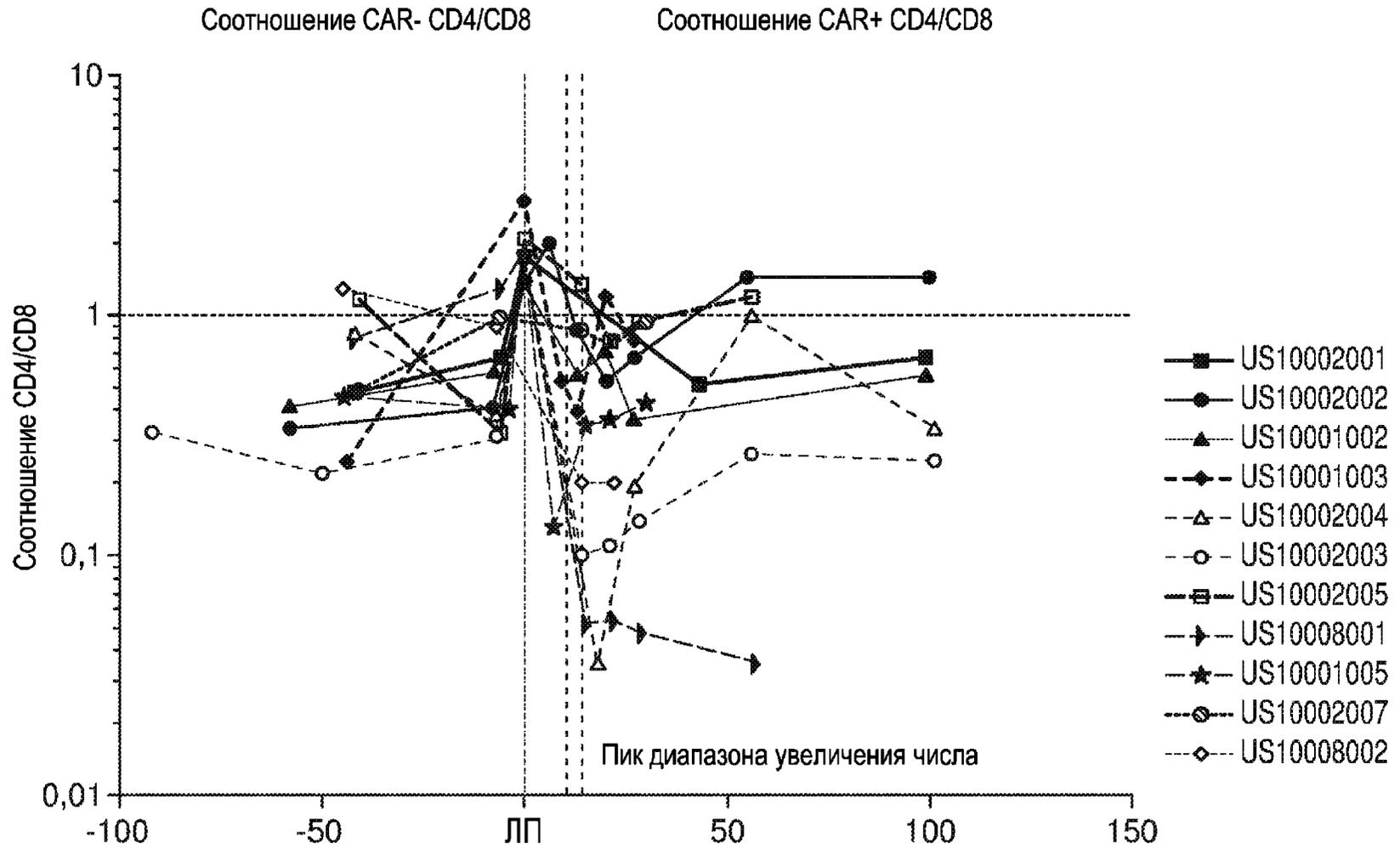
ФИГ. 13В

ФИГ. 14А



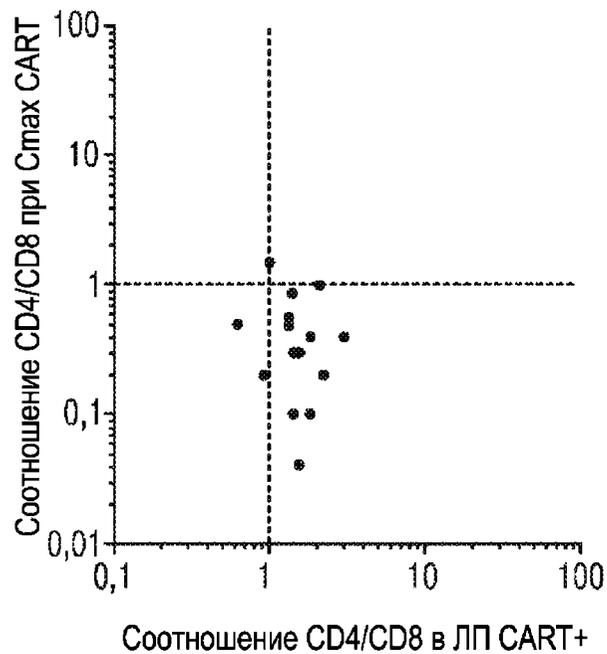
ФИГ. 14В

ФИГ. 15



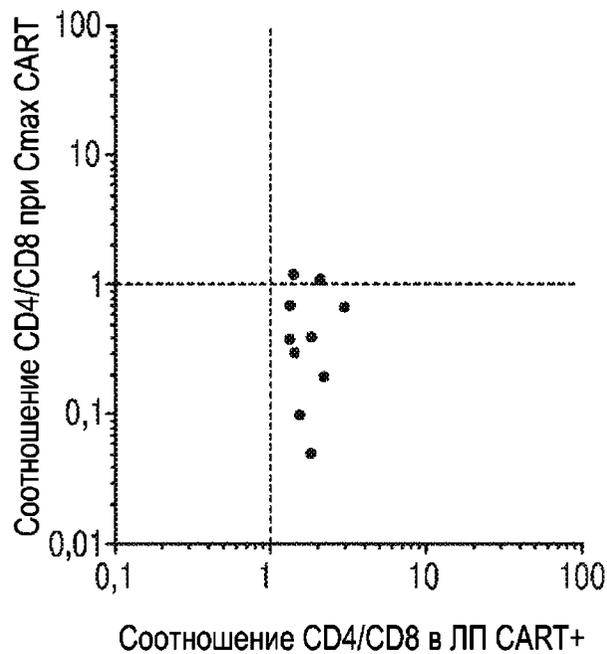
ФИГ. 16А

Периферическая кровь



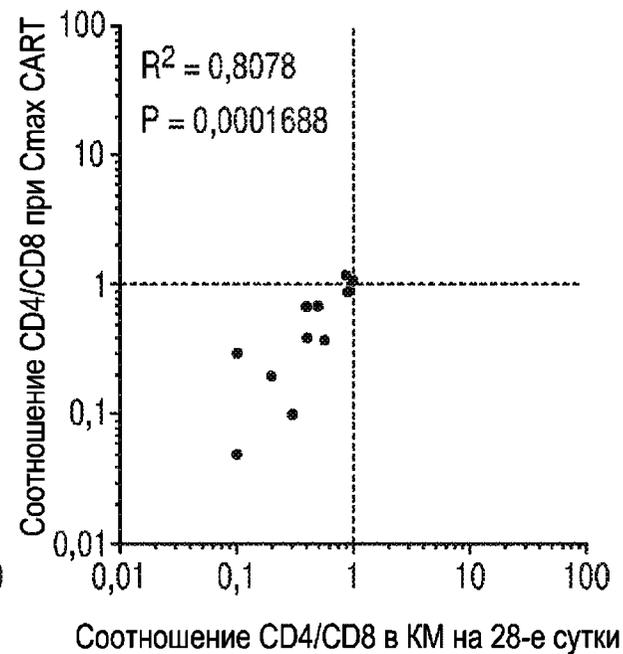
ФИГ. 16В

Костный мозг

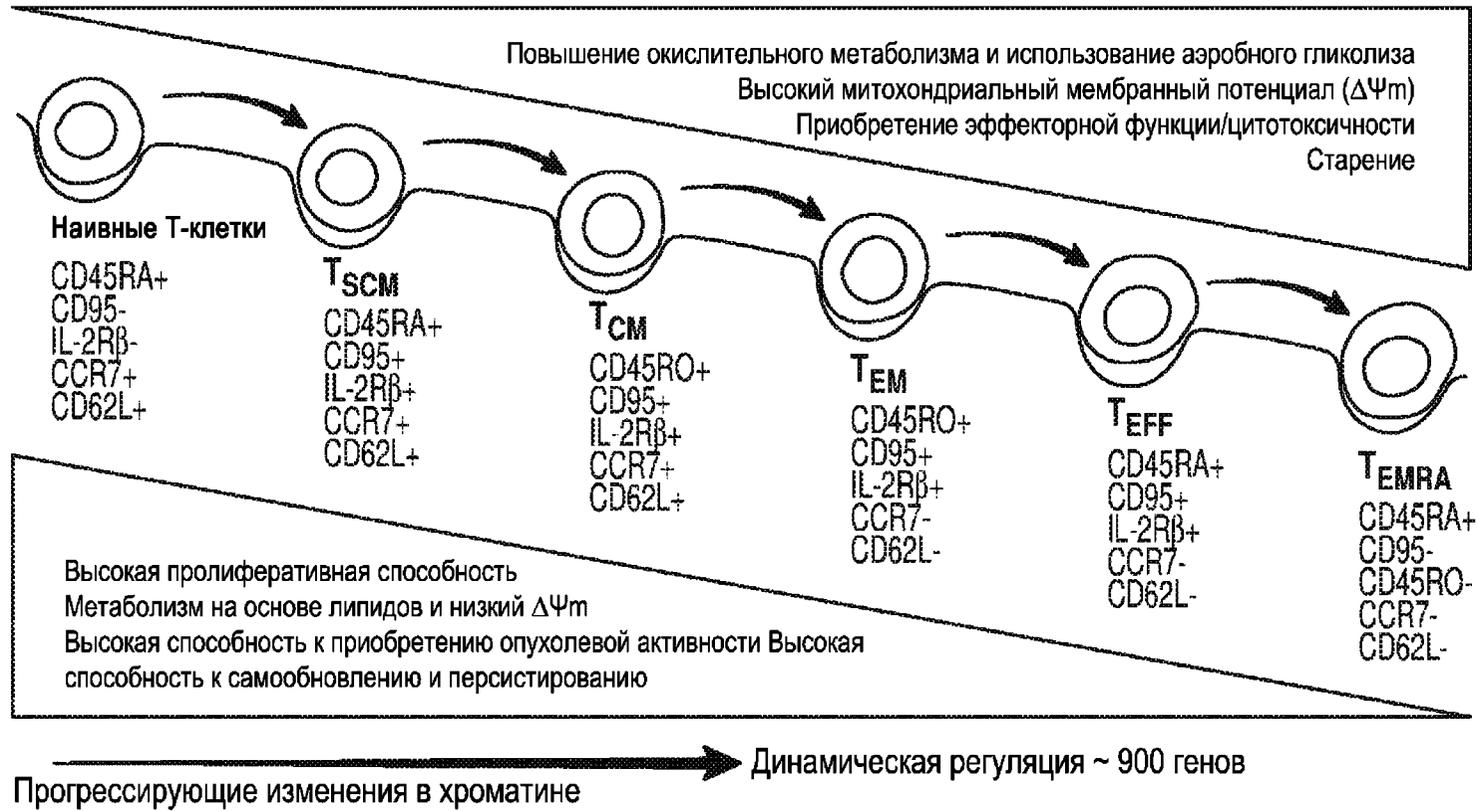


ФИГ. 16С

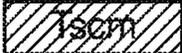
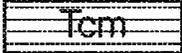
Периферическая кровь по сравнению с костным мозгом



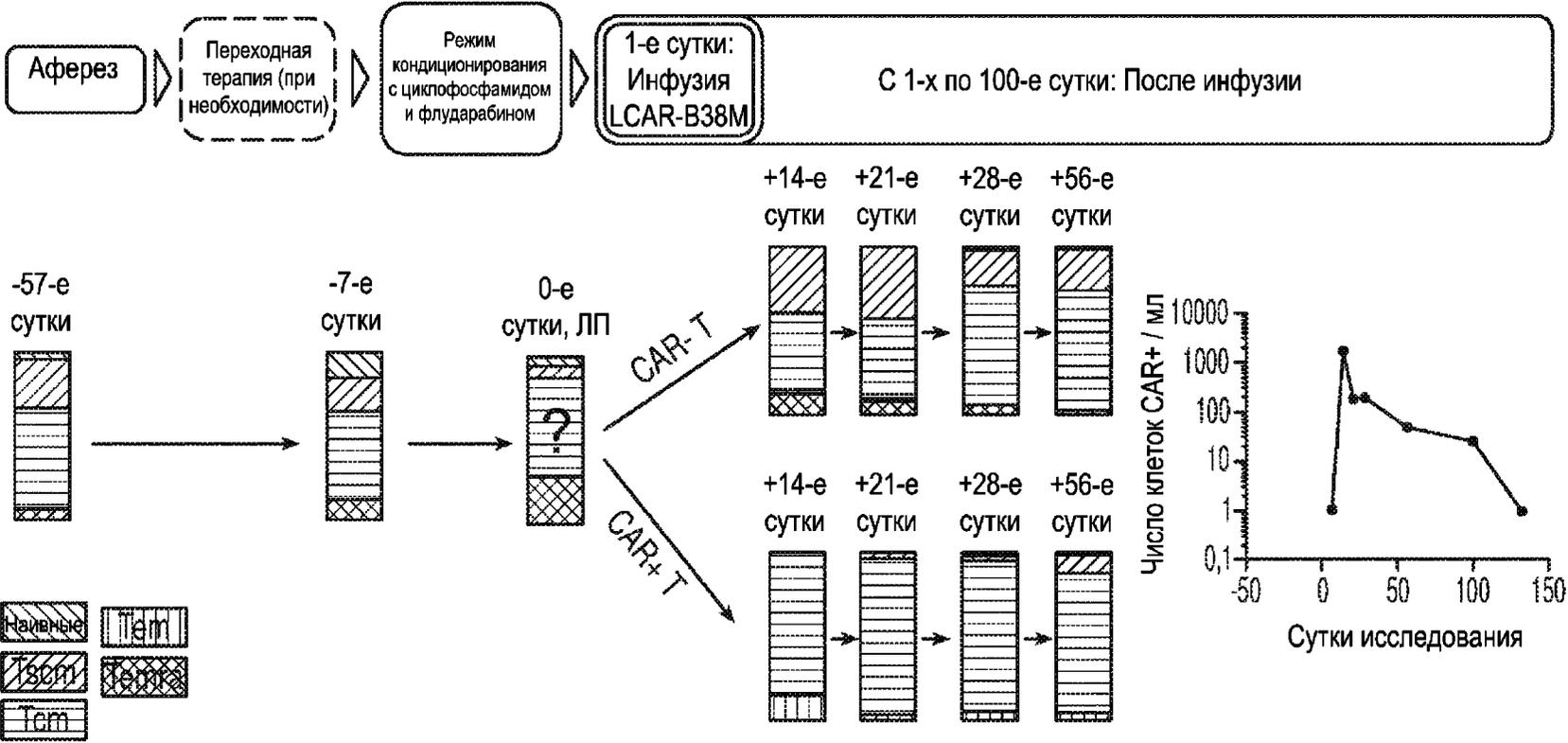
ФИГ. 17



ФИГ. 18

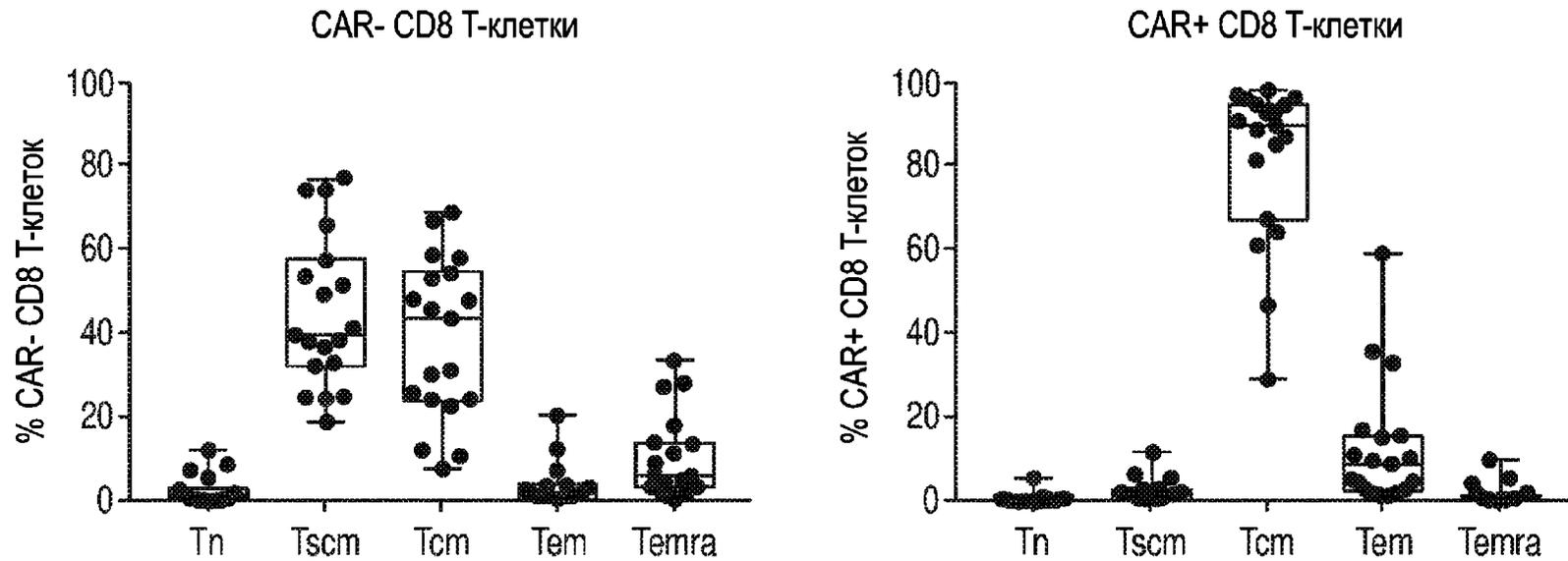
-  Наивные Лимфоциты CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7+ CD45RO- CD95-
-  Tscm Лимфоциты CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7+ CD45RO- CD95+
-  Tcm Лимфоциты CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7+ CD45RO+
-  Tem Лимфоциты CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7- CD45RO+
-  Temra Лимфоциты CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7- CD45RO-

ФИГ. 19



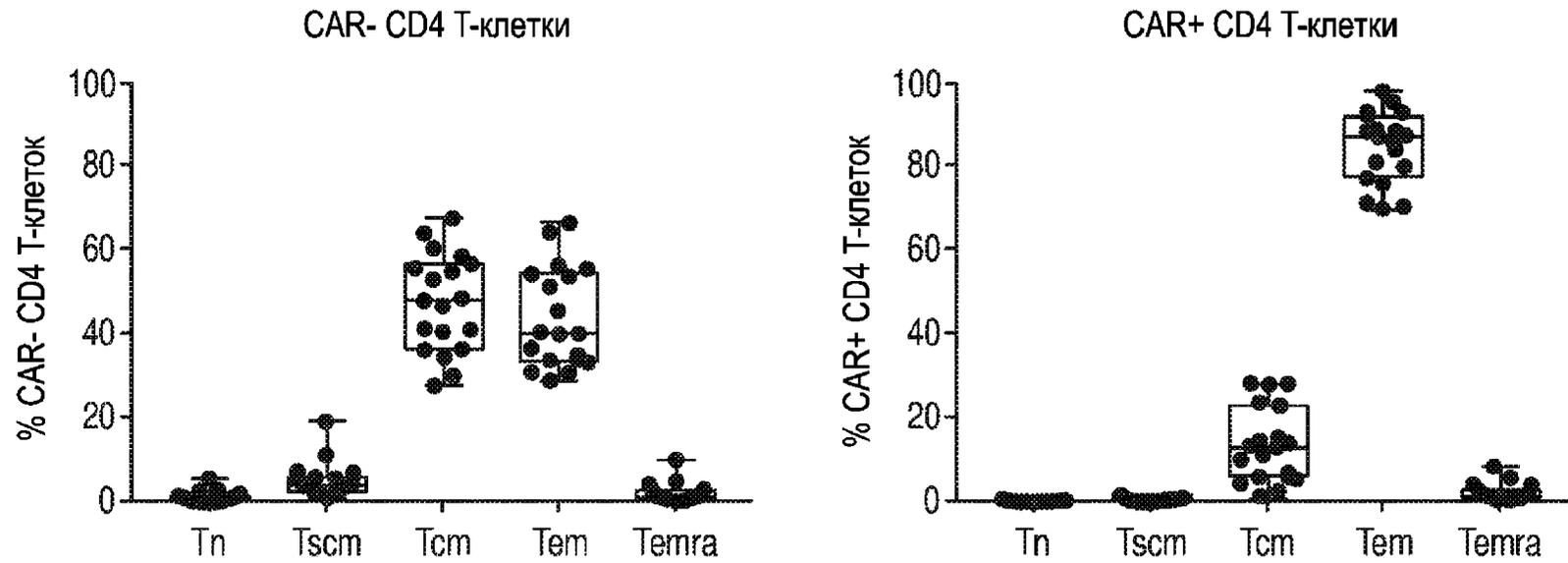
ФИГ. 20А

Субпопуляции Т-клеток памяти при Смах

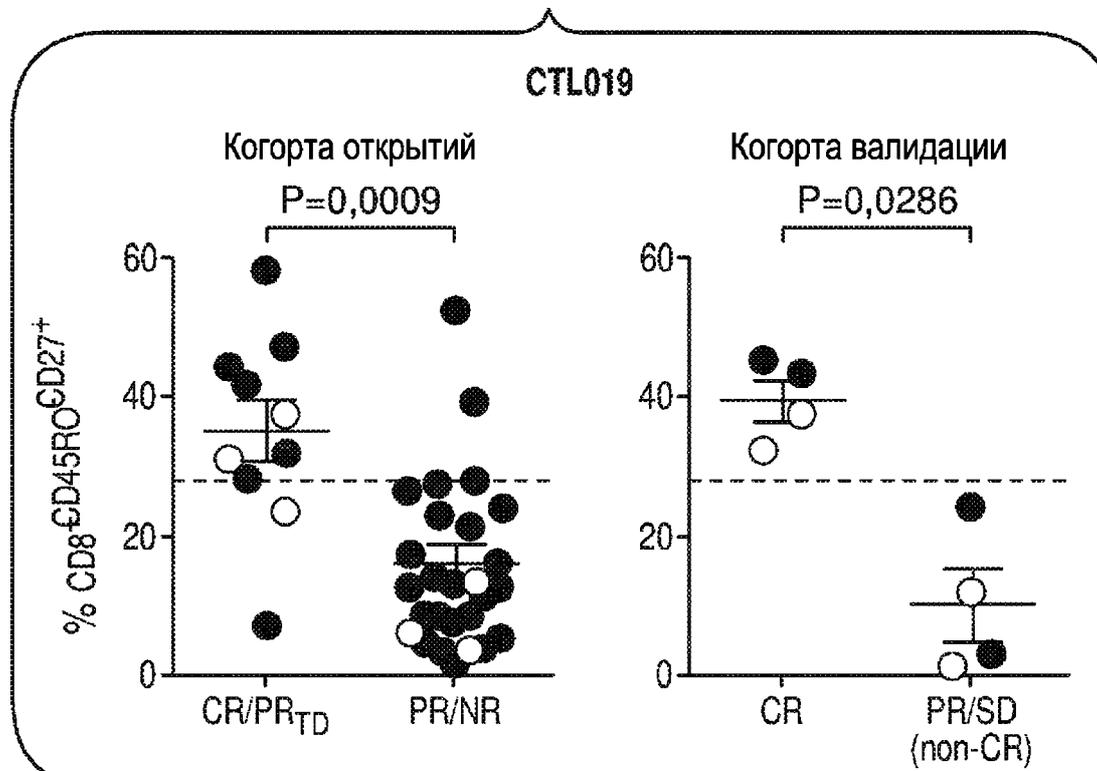


ФИГ. 20В

Субпопуляции Т-клеток памяти при Смах

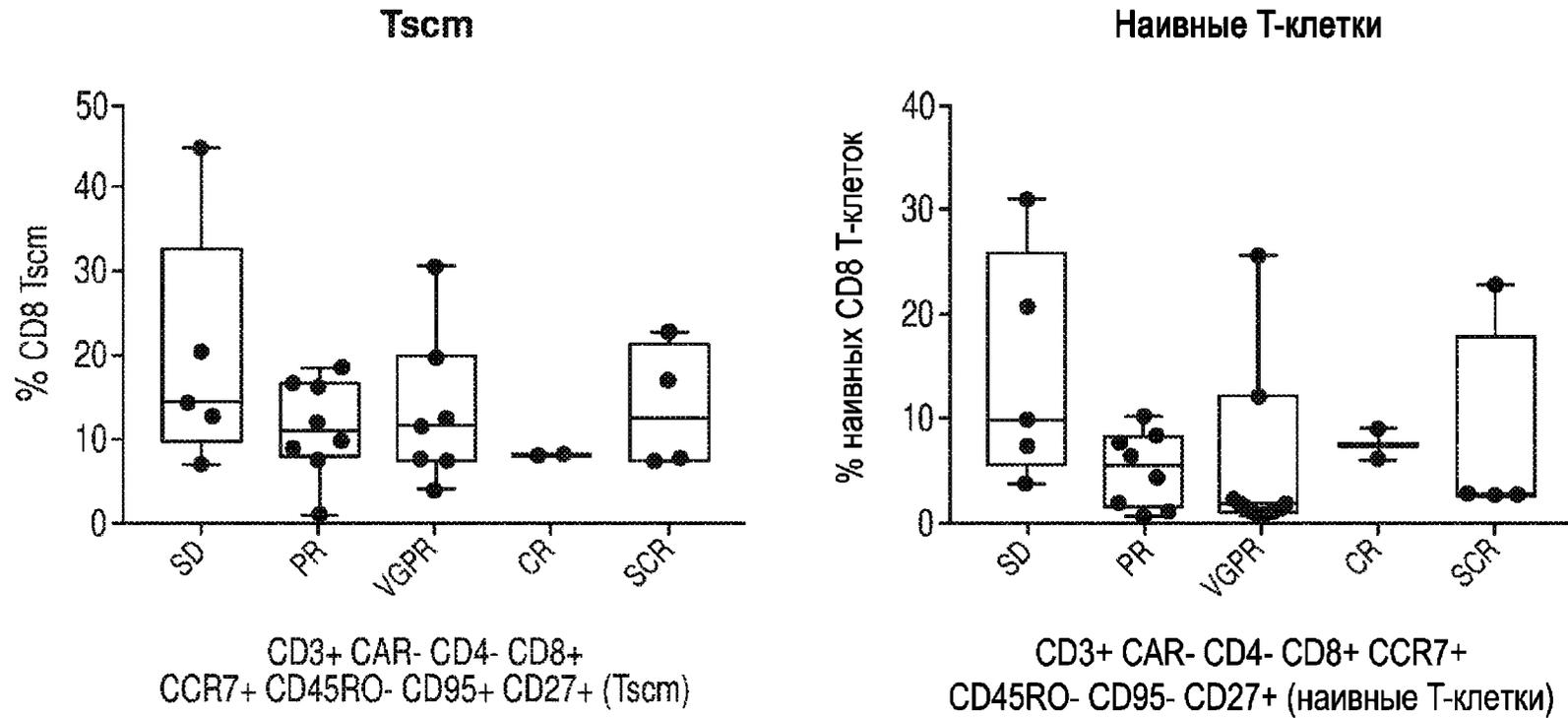


ФИГ. 20С

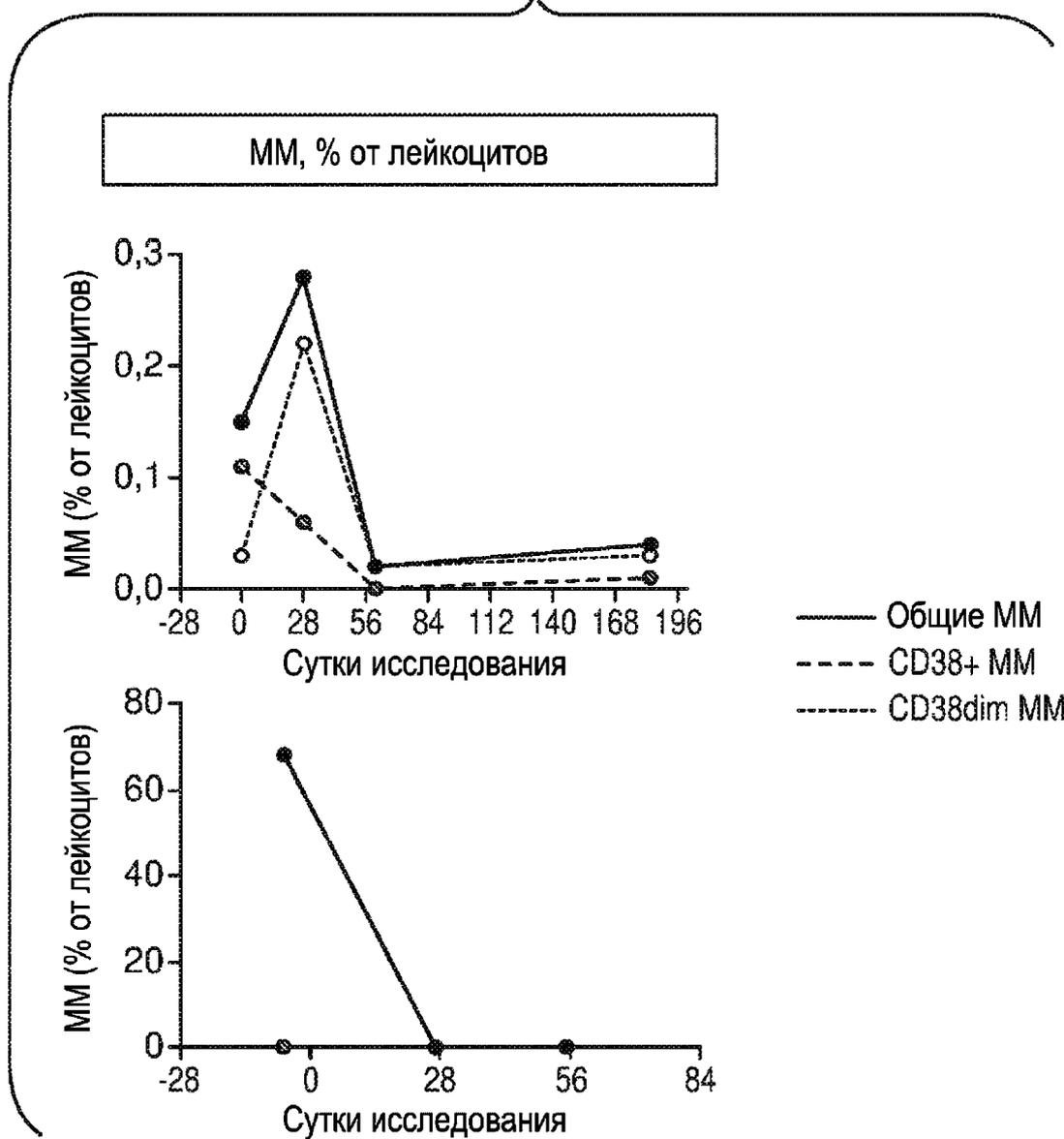


ФИГ. 20D

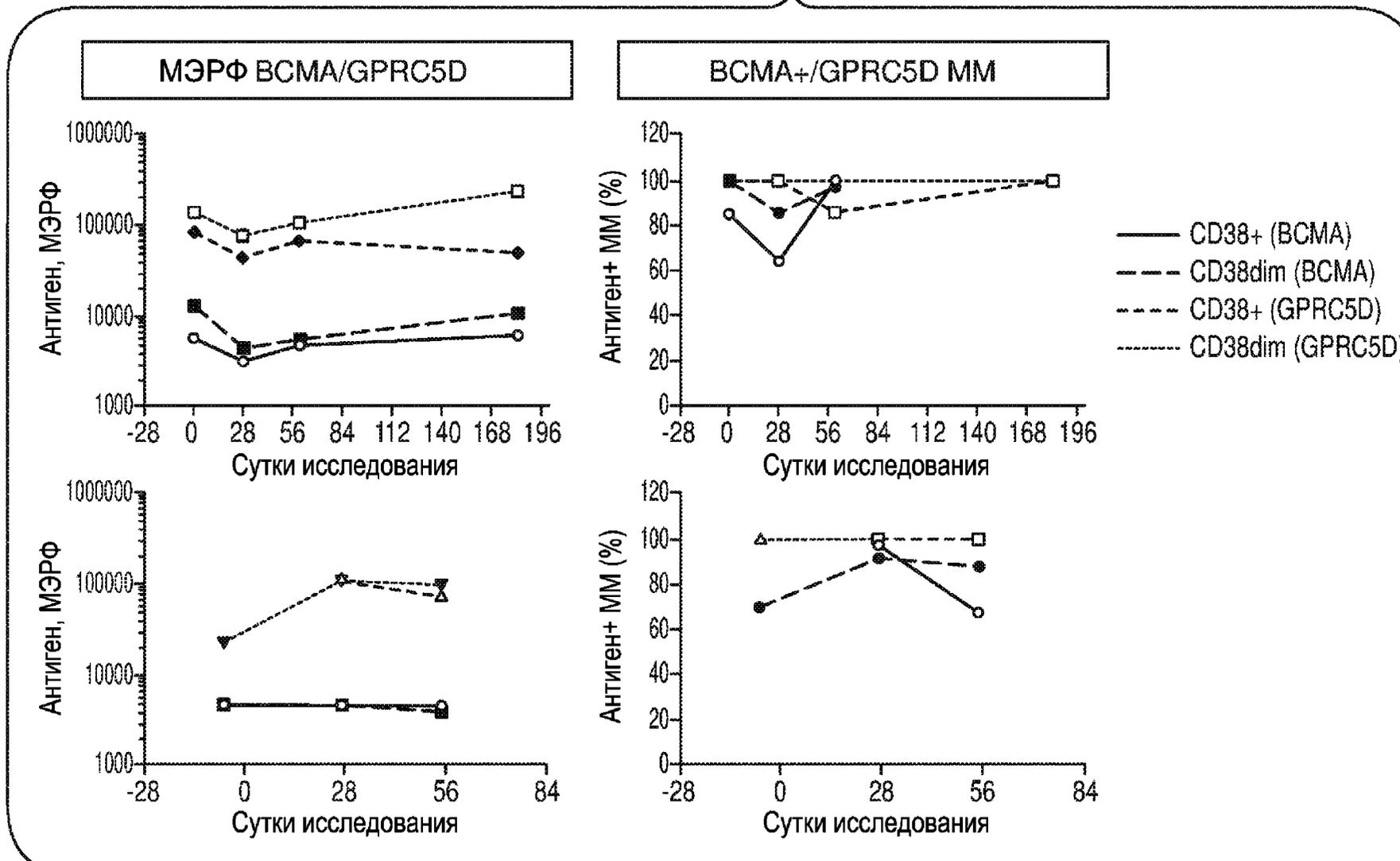
LCAR-B38M



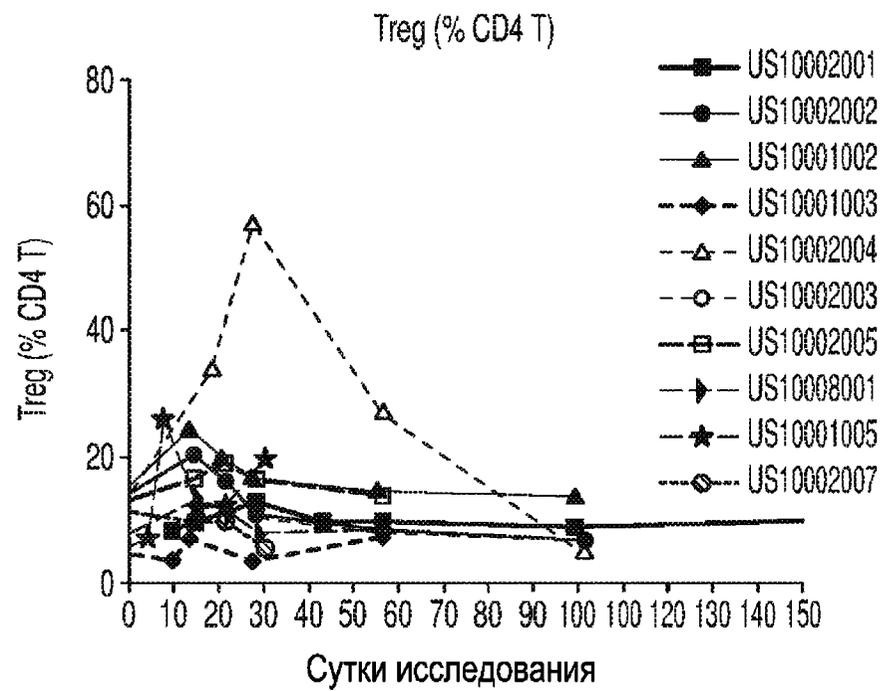
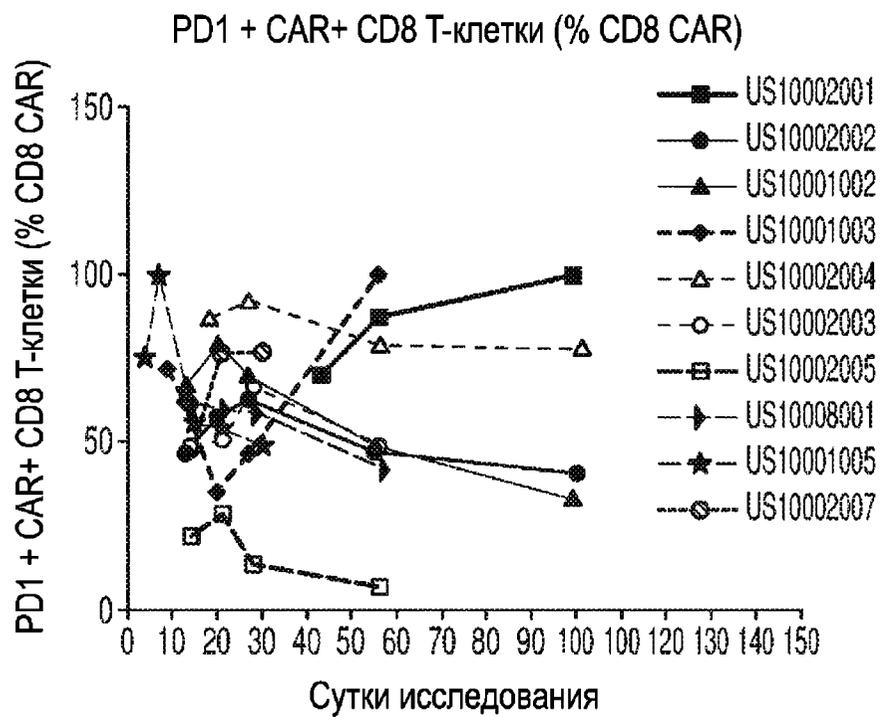
ФИГ. 21А



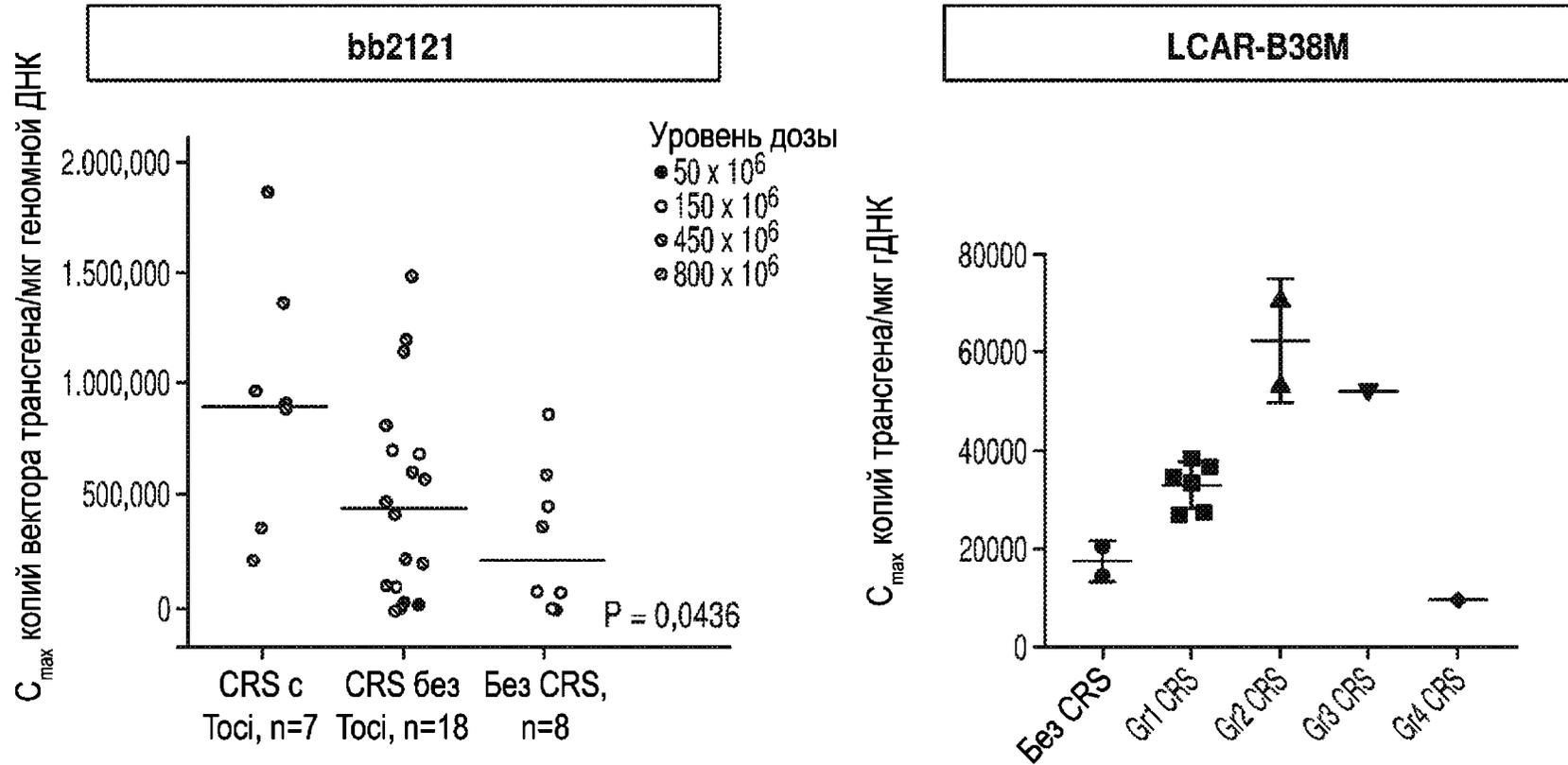
ФИГ. 21В



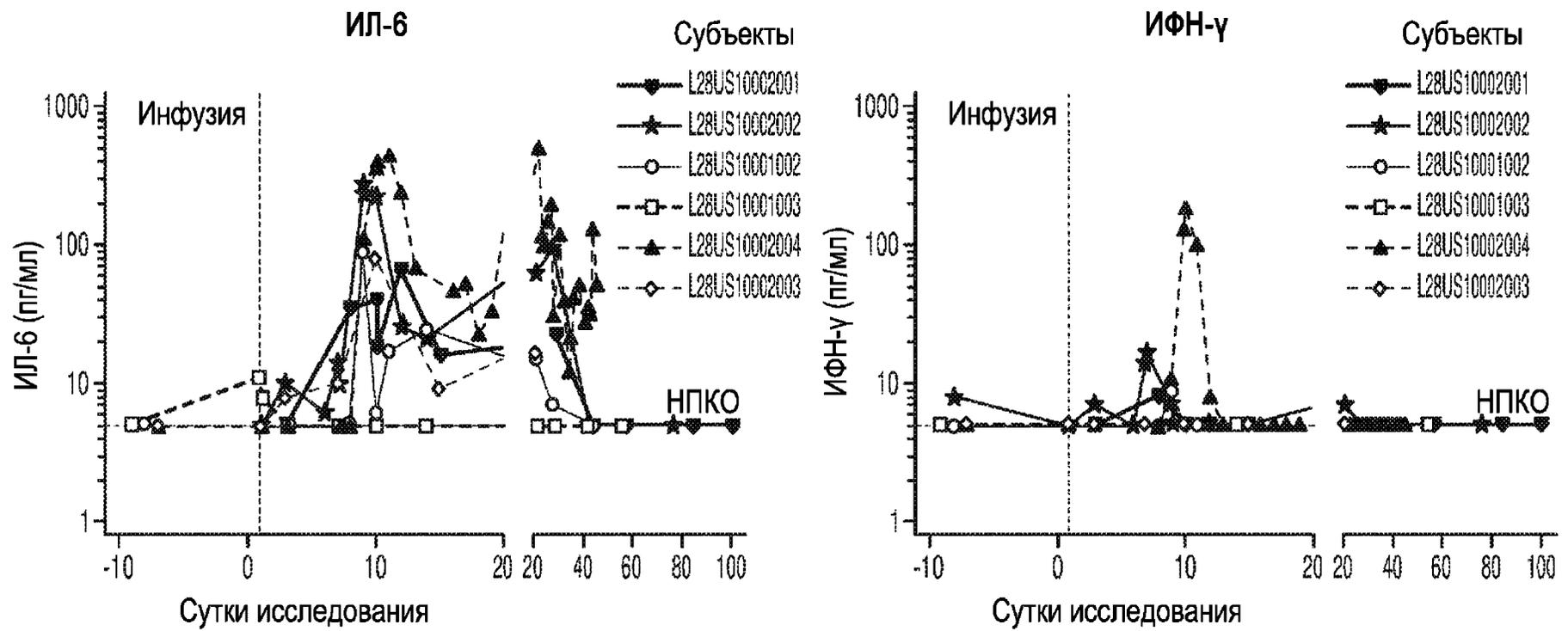
ФИГ. 21С



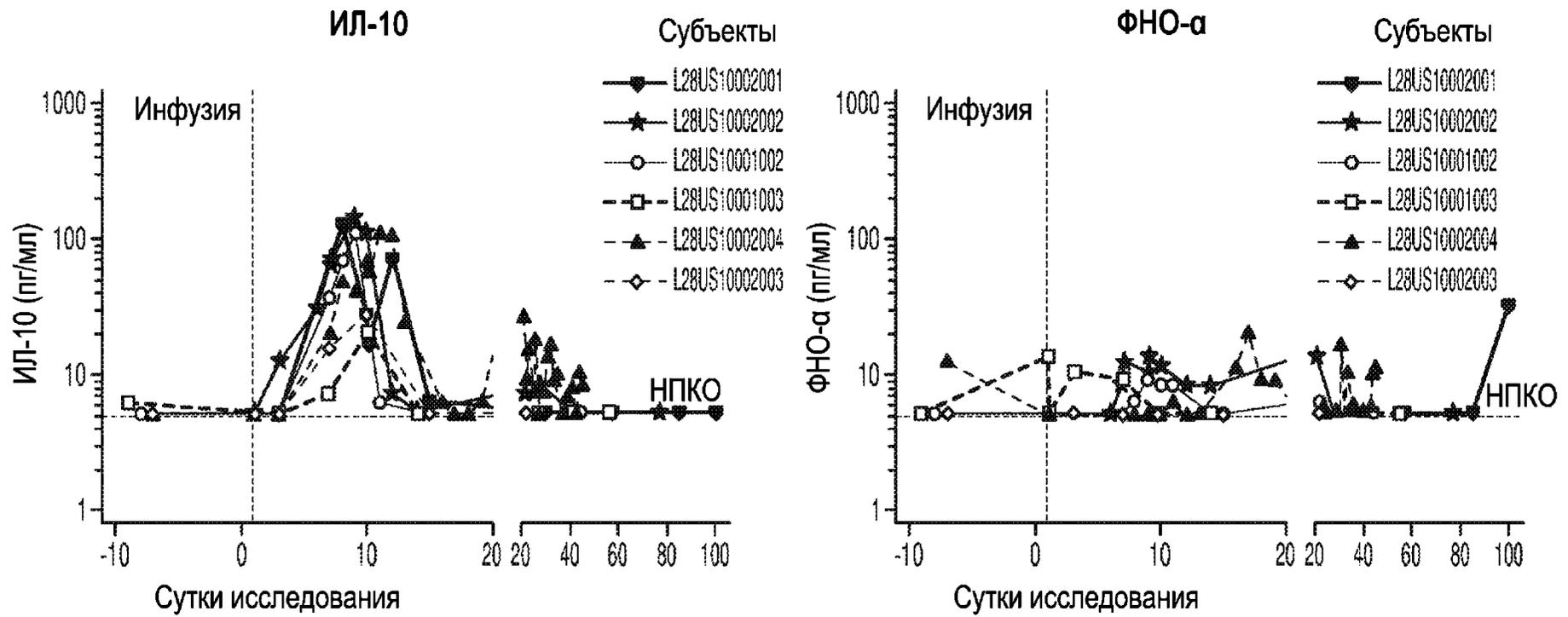
ФИГ. 22



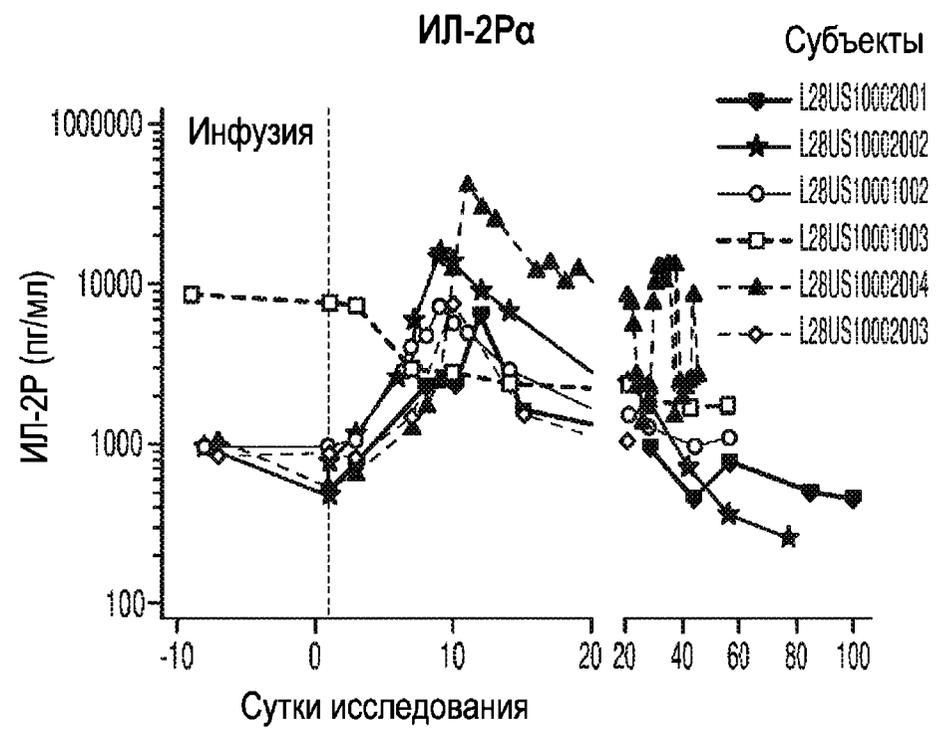
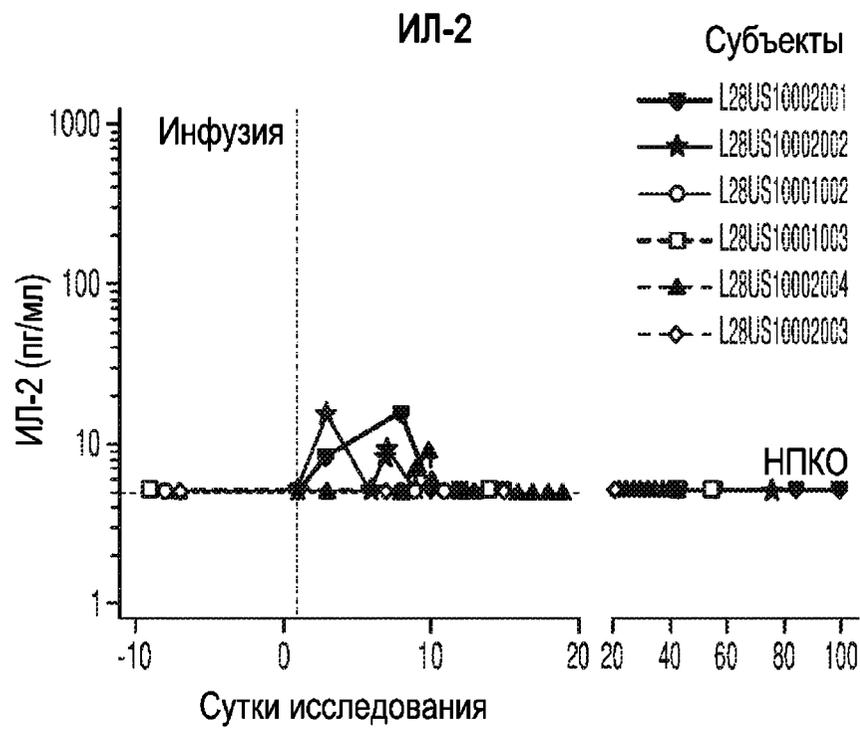
ФИГ. 23

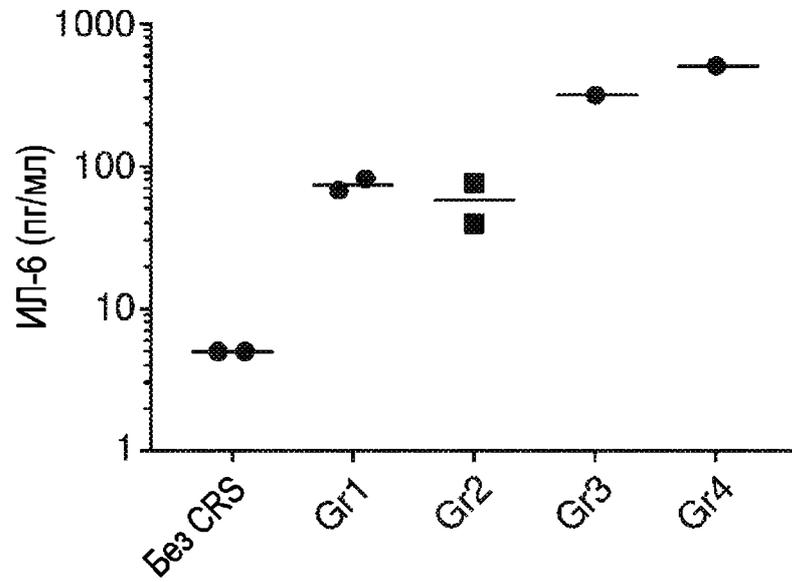
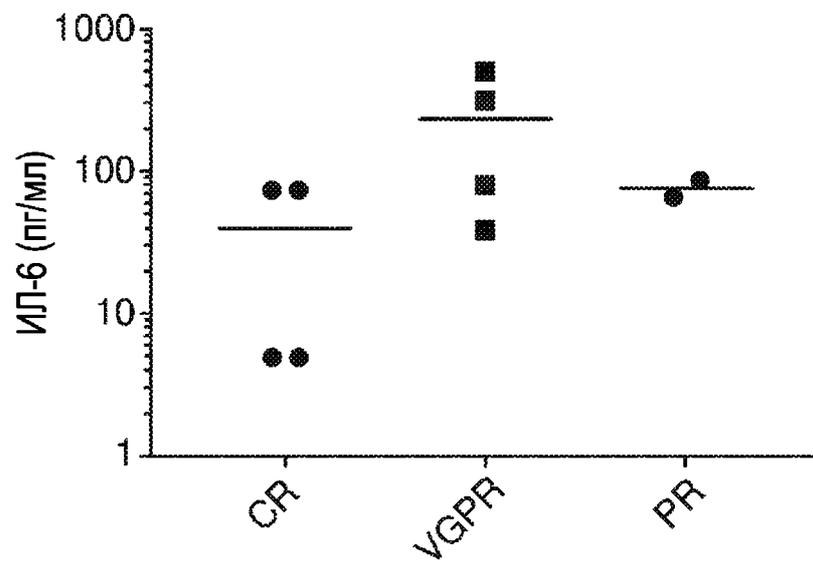


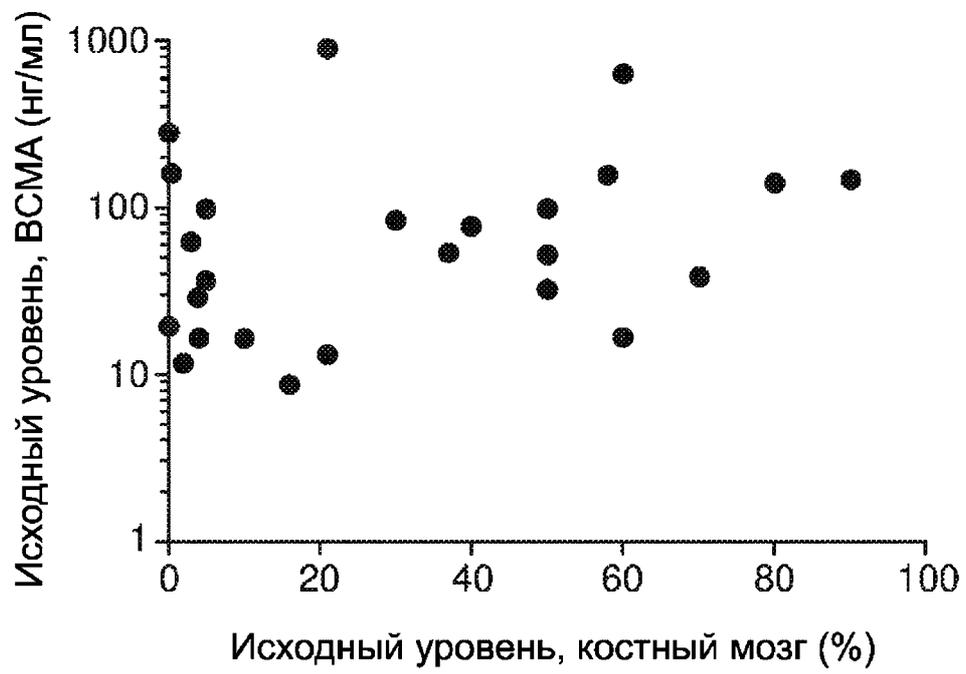
ФИГ. 24



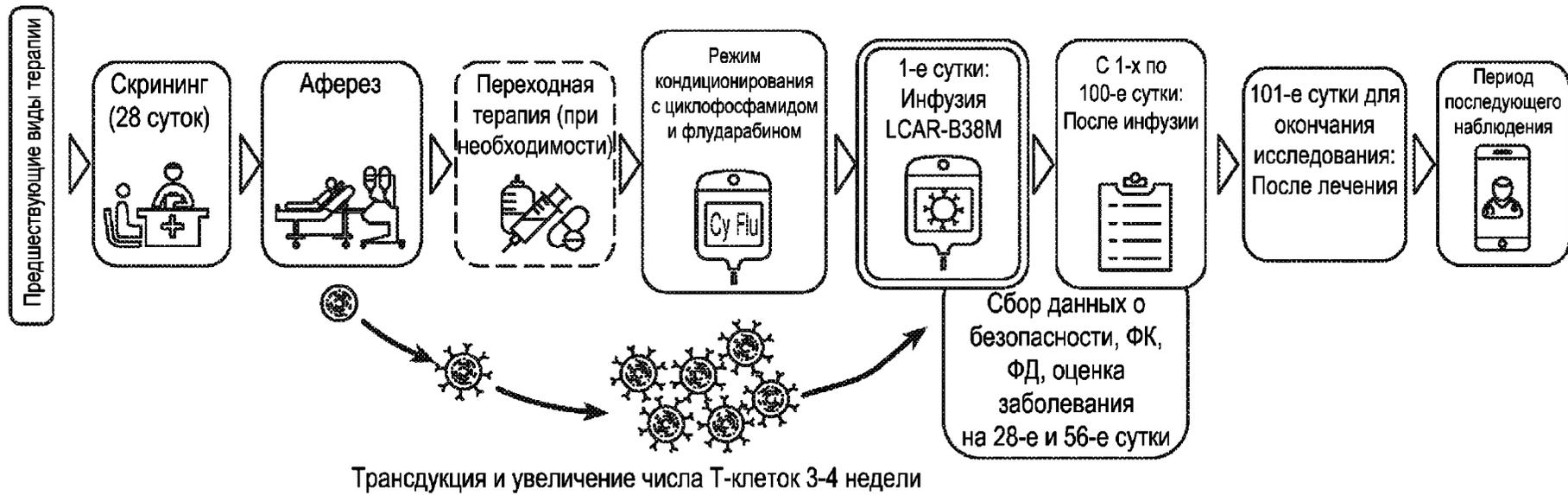
ФИГ. 25



**ФИГ. 26А****ФИГ. 26В**

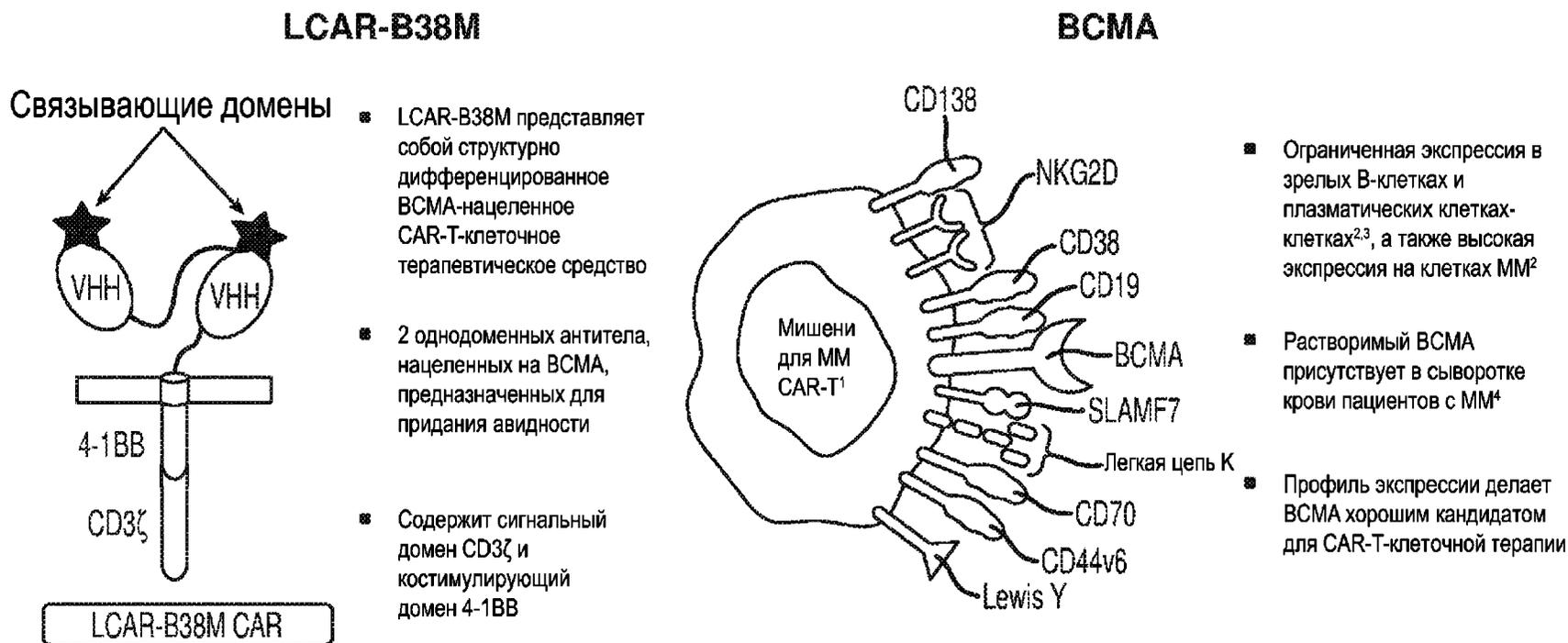
**ФИГ. 28**

ФИГ. 29



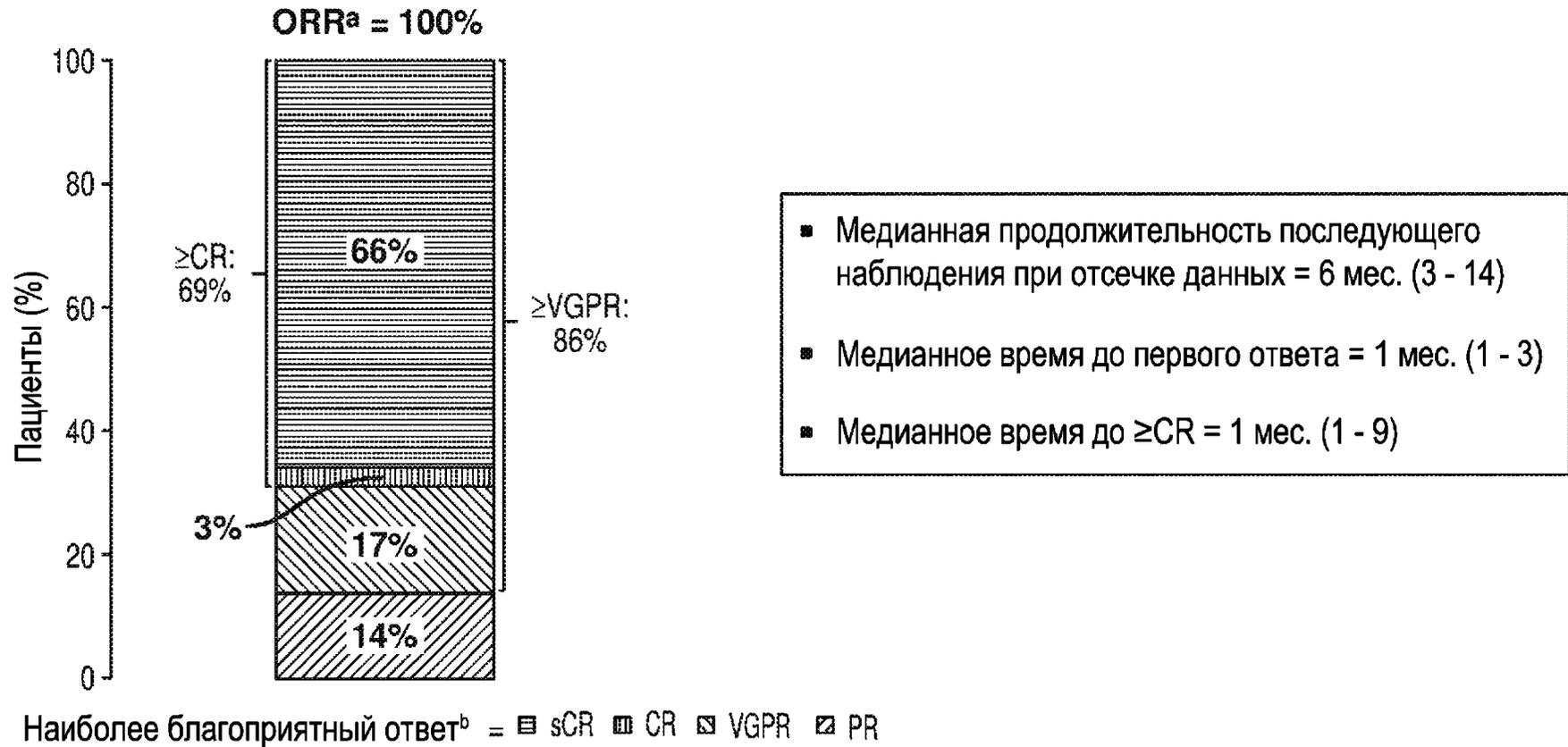
ФИГ. 30

LCAR-B38M CAR-T-клеточное терапевтическое средство с двумя BCMA-нацеленными доменами



ФИГ. 31

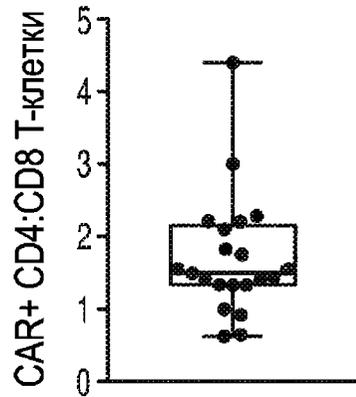
Эффективность LCAR-B38M: Общая частота ответа



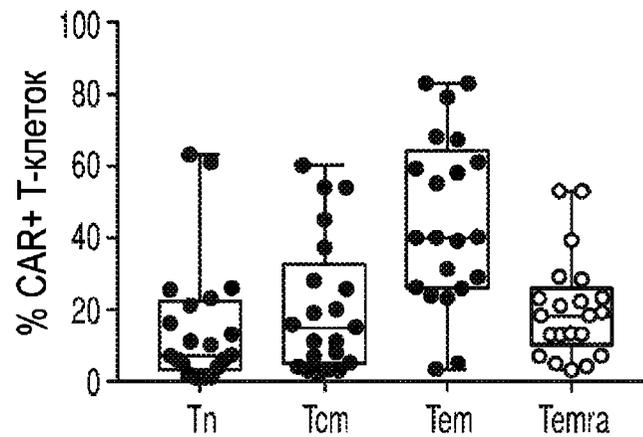
ФИГ. 32

Лекарственный продукт LCAR-B38M обогащен эффекторными Т-клетками памяти

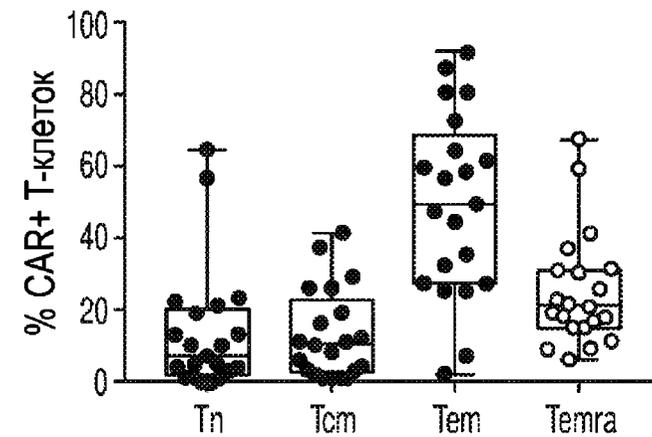
Соотношение CAR+ CD4: CD8



CAR+ Т-клетки



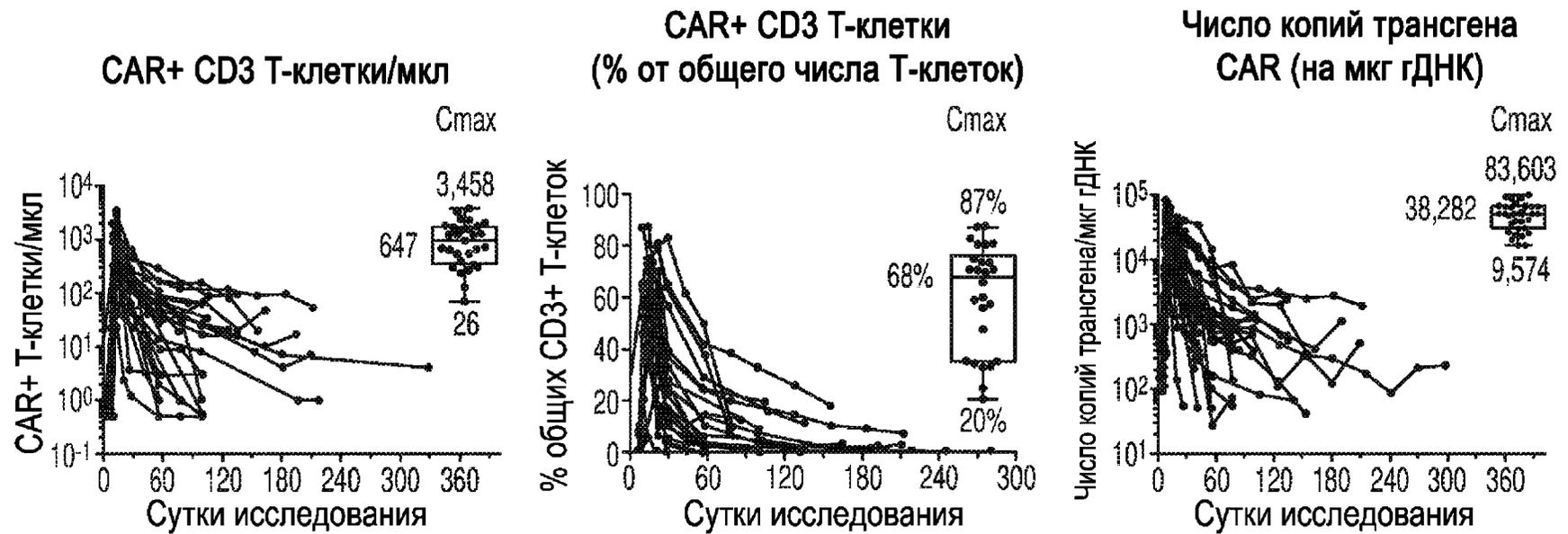
CAR- Т-клетки



- Медианная доля CAR+ Т-клеток в лекарственном продукте составляла 16% (диапазон 6-28%) от общего числа клеток

ФИГ. 33

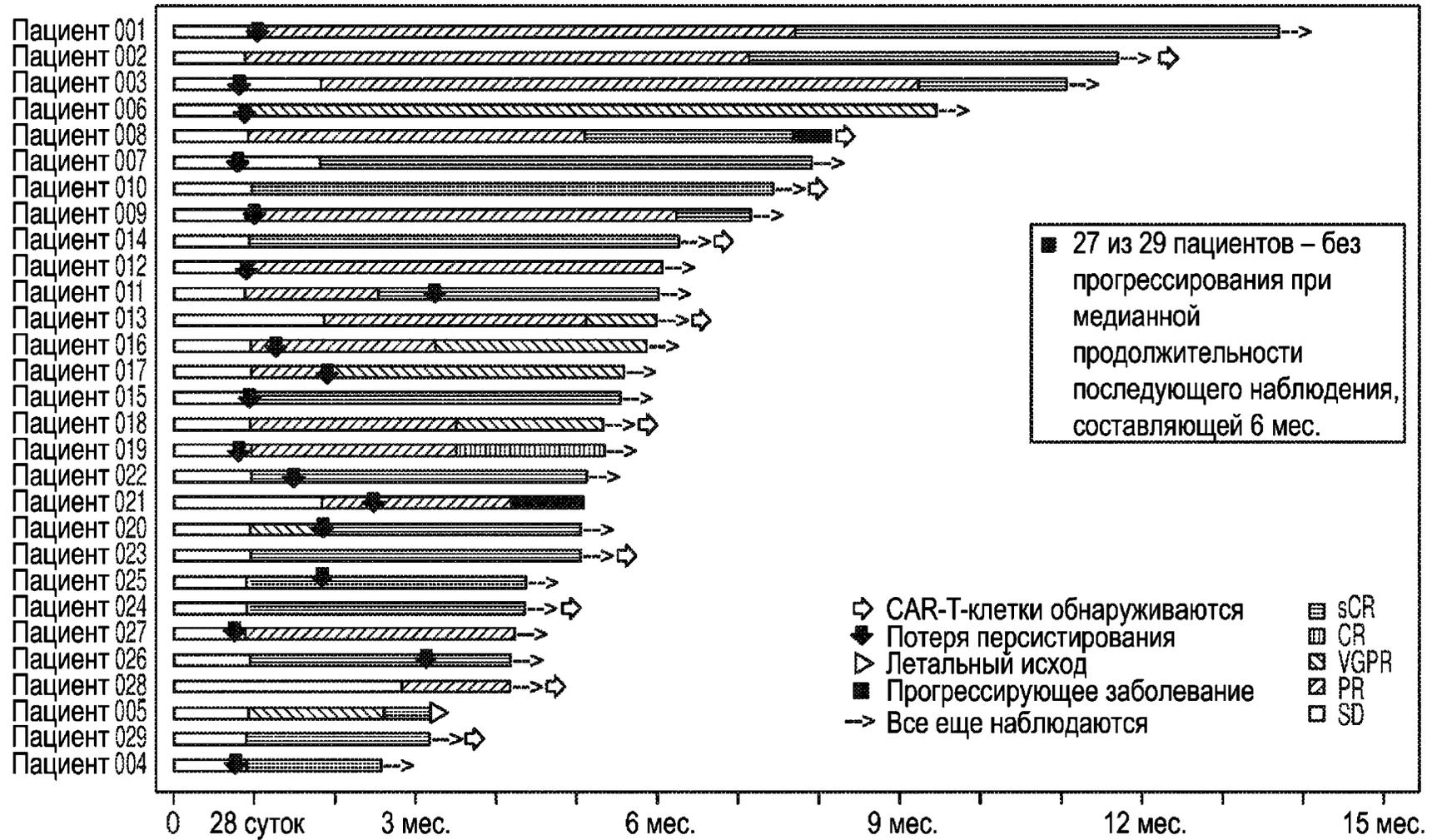
LCAR-B38M характеризуется вариабельным увеличением числа и персистированием



- Время пика увеличения числа (T_{max}) является постоянным среди пациентов
- У 18 из 28 пациентов число CAR+ T-клеток/мкл < НПКО (2 клетки/мкл) в момент времени 3 месяца в периоде последующего наблюдения

ФИГ. 34

Устойчивые ответы после потери персистенции LCAР-B38M в крови

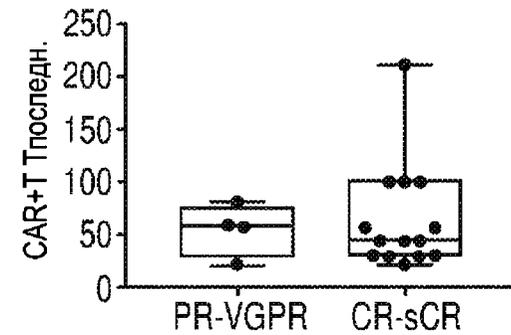
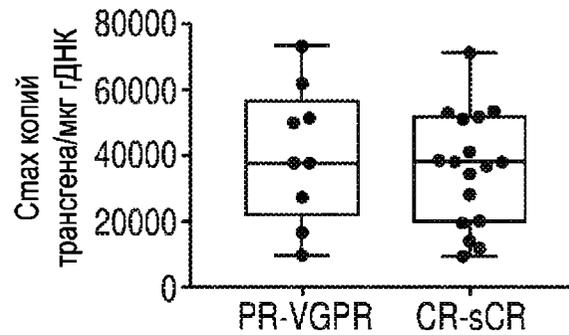
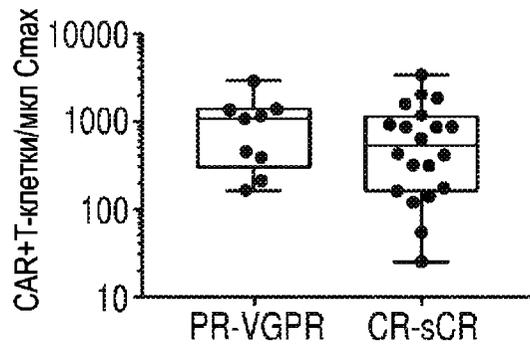


ФИГ. 35

Увеличение числа и персистенция не связаны с наиболее благоприятным ответом

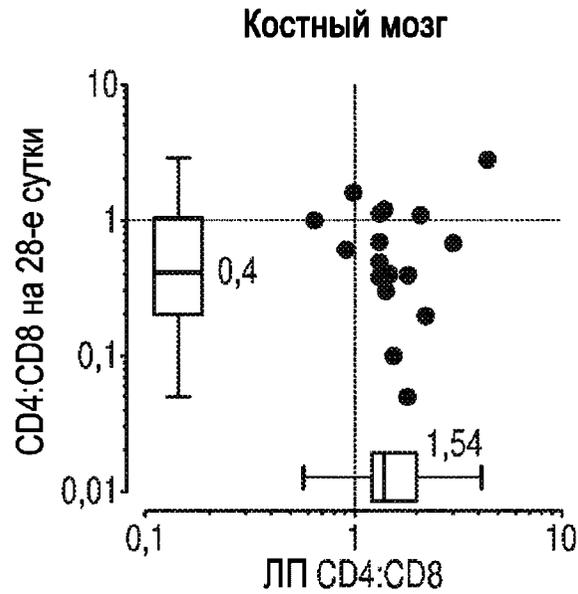
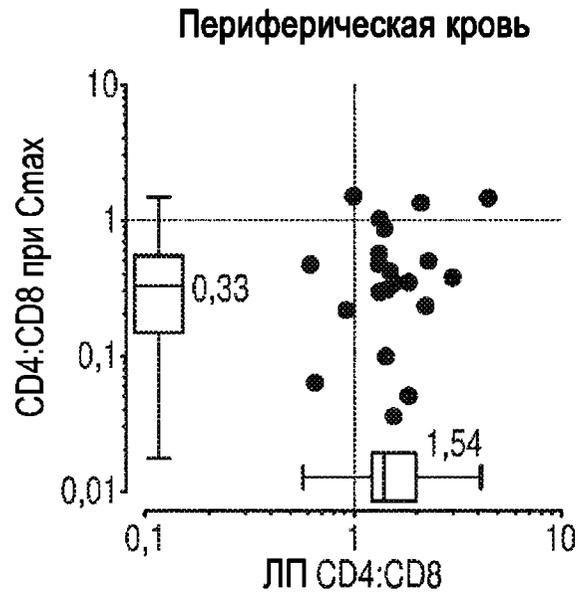
Увеличение числа CAR+ Т-клеток

Персистенция CAR+ Т-клеток (Т_{последн.})

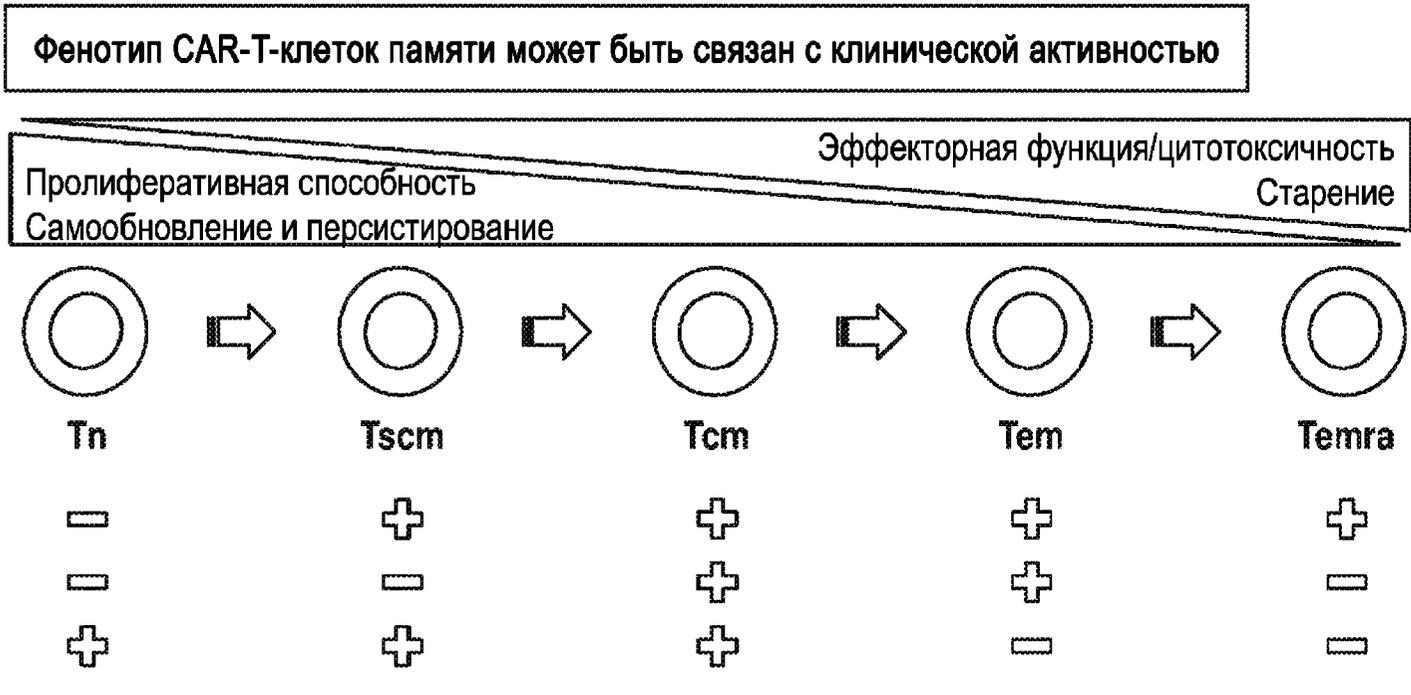


ФИГ. 36

LCAR-B38M: Предпочтительное увеличение числа CAR+ CD8 T-клеток в крови и костном мозге



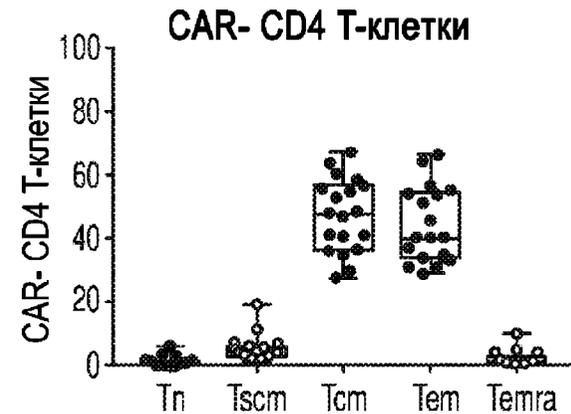
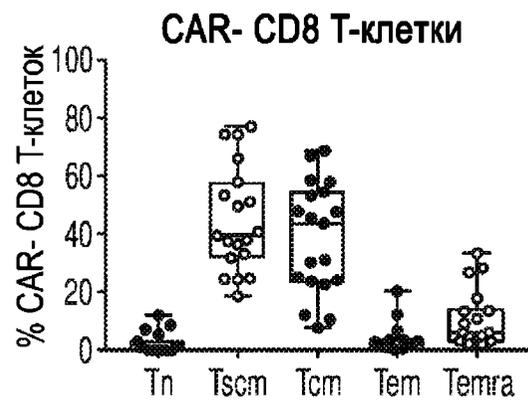
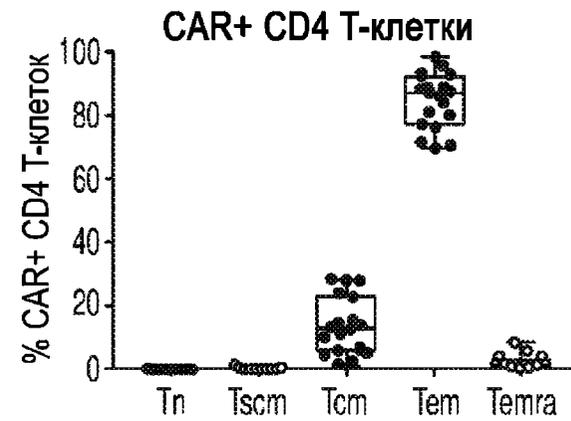
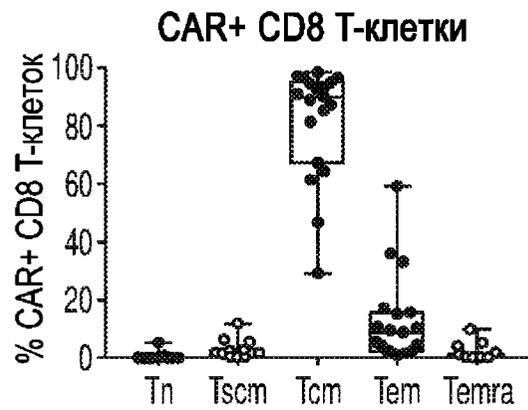
ФИГ. 37



▪ Лекарственные продукты, обогащенные Tscm и Tcm, гипотетически приводят к улучшенным клиническим ответам¹

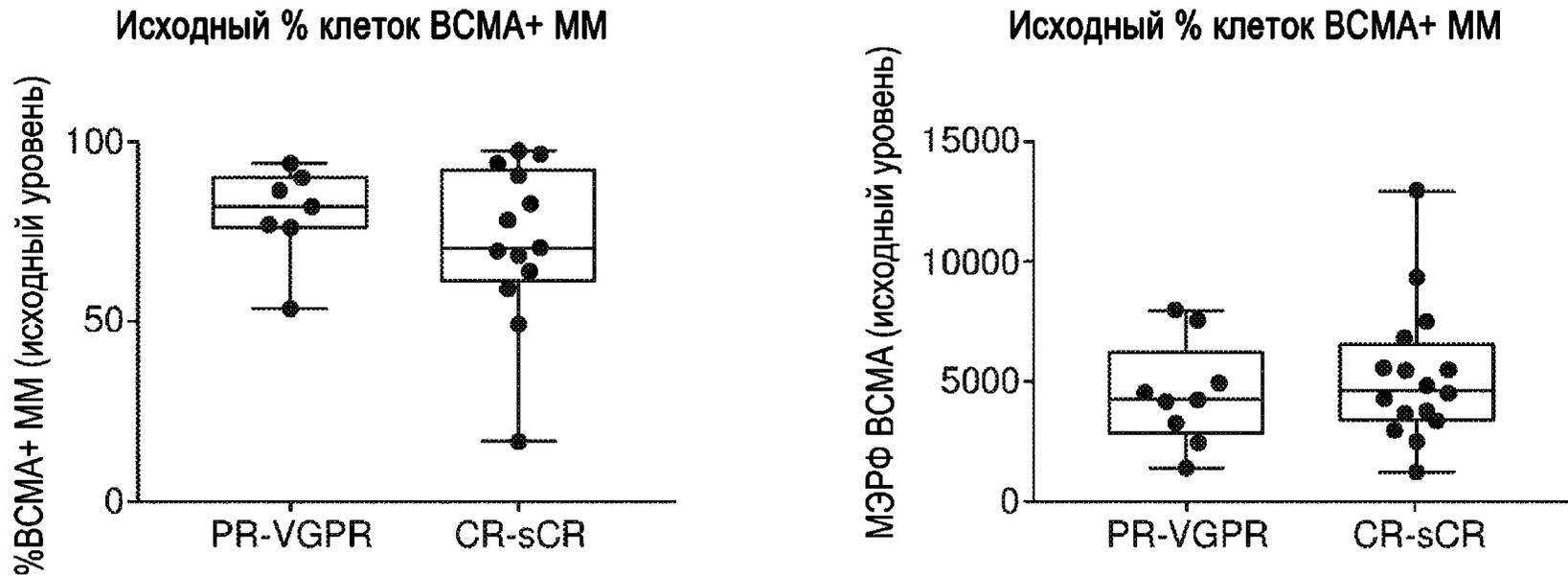
ФИГ. 38

LCAR-B38M демонстрирует предпочтительное увеличение числа центральных CD8 T-клеток памяти



ФИГ. 39

Ответы не зависят от исходного уровня экспрессии BCMA



- У пациентов наблюдались переменные уровни экспрессии BCMA на исходном уровне на основании оценки с помощью проточной цитометрии

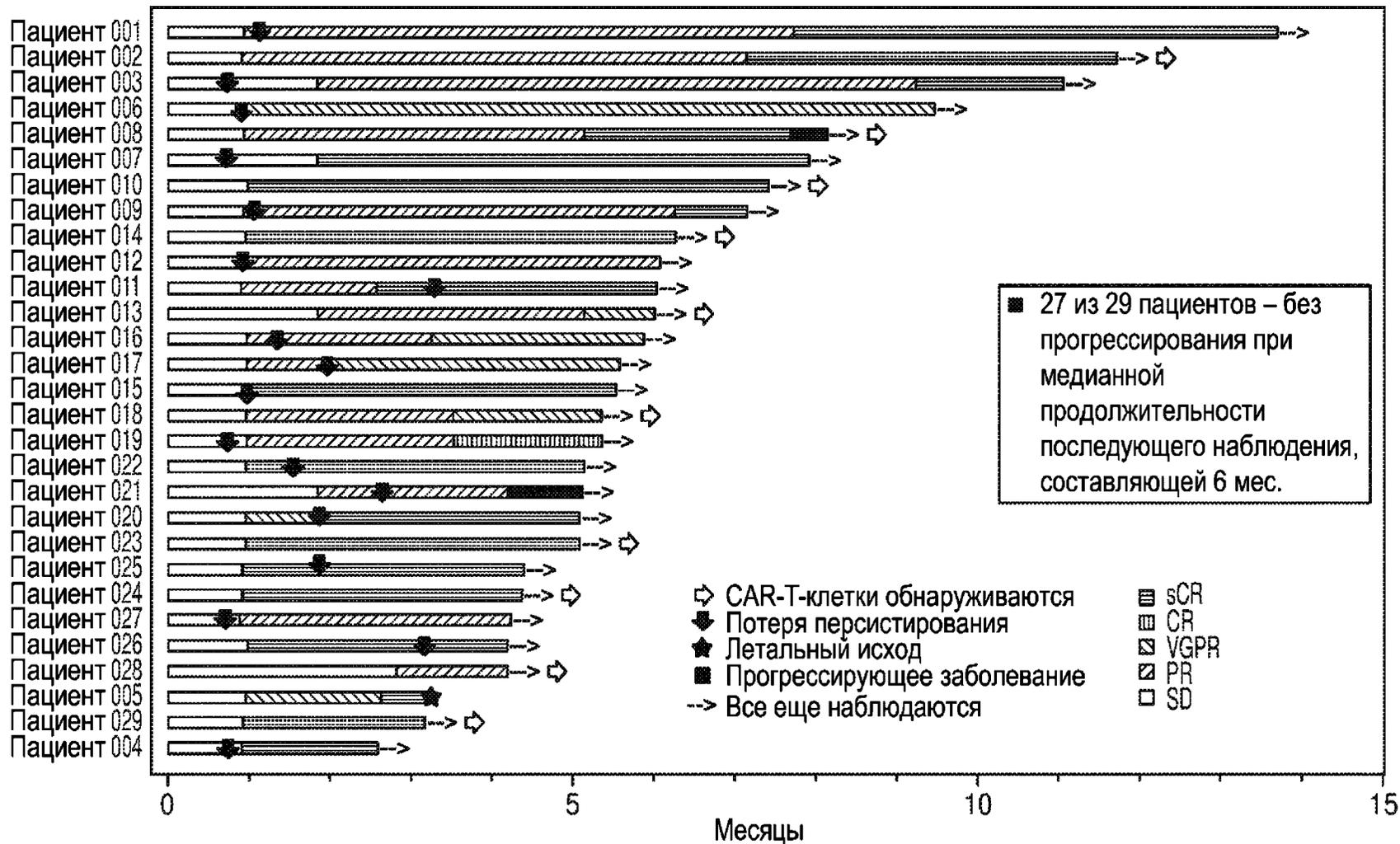
ФИГ. 40

Выводы для LCAR-B38M

- Увеличение числа LCAR-B38M CAR-T-клеток после инфузии (C_{max}) является высоковариабельным, и стабильные пики (T_{max}) наблюдаются около 10-х –14-х суток.
- У 18 из 28 пациентов число CAR+ T-клеток/мкл < НПКО (2 клетки/мкл) в момент времени 3 месяца в периоде последующего наблюдения
- Наиболее благоприятные ответы не зависят от пикового увеличения числа CD3 CAR-T-клеток и персистирования на периферии на момент времени отсечки данных
- Наиболее благоприятные ответы не зависят от уровня экспрессии BCMA в клетках MM
- LCAR-B38M представляет собой дифференцированное CAR-T-клеточное терапевтическое средство, которое является высокоактивным при относительно низкой дозе, потенциально связанное с предпочтительным и устойчивым увеличением числа CAR+ CD8 T-клеток, демонстрирующих фенотип клеток центральной памяти, *in vivo*.

ФИГ. 41

Устойчивые ответы после потери персистенции LCAR-B38M в крови



ФИГ. 42