

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292183** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.15

(22) Дата подачи заявки
2021.01.22

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) СПОСОБЫ ДОЗИРОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ Фолликулярной лимфомы и лимфомы маргинальной зоны при адоптивной клеточной терапии

(31) 62/965,774; 63/037,542; 63/068,975

(32) 2020.01.24; 2020.06.10; 2020.08.21

(33) US

(86) PCT/US2021/014775

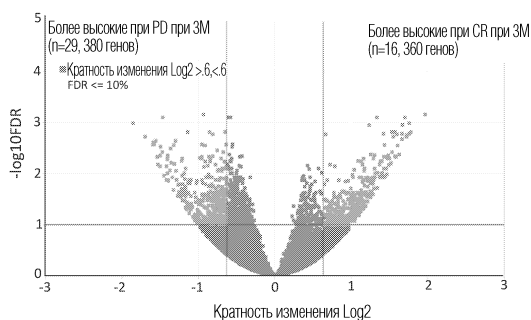
(87) WO 2021/151008 2021.07.29

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

(72) Изобретатель:
Фарацци Талия (US)

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

(57) В настоящем документе предложены способы введения дозы Т-клеток для лечения субъектов с вялотекущей неходжкинской лимфомой (NHL) и связанные с ней способы, композиции, применения и готовые изделия. Клетки экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), для таргетирования антигена лимфомы, такого как CD19. В некоторых вариантах осуществления способы предназначены для лечения фолликулярной лимфомы степени 1-3A (FL 1-3A) или лимфомы маргинальной зоны (MZL), в том числе у субъектов, ранее получавших интенсивное лечение, или субъектов с плохим прогнозом, таких как субъекты, у которых возник рецидив после лечения или которые невосприимчивы к лечению одной или несколькими предшествующими терапиями.



A1

202292183

202292183

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575094EA/032

СПОСОБЫ ДОЗИРОВАНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ Фолликулярной Лимфомы и Лимфомы МАРГИНАЛЬНОЙ ЗОНЫ ПРИ АДОПТИВНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/965,774, поданной 24 января 2020, озаглавленной «METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN ADOPTIVE CELL THERAPY», предварительной заявки США № 63/037,542, поданной 10 июня 2020, озаглавленной «METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN ADOPTIVE CELL THERAPY», и предварительной заявки США № 63/068,975, поданной 21 августа 2020, озаглавленной «METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN ADOPTIVE CELL THERAPY», содержание которых полностью включено посредством ссылки для всех целей.

Включение перечня последовательностей посредством ссылки

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием 735042023440SeqList.TXT, созданного 13 января 2021, размером 35356 байт. Информация перечня последовательностей в электронном формате полностью включена посредством ссылки.

Область техники

Настоящее описание в некоторых аспектах относится к адоптивной клеточной терапии, включающей введение доз клеток для лечения субъектов с индолентной неходжкинской лимфомой (NHL), включая субъектов с высоким риском, и родственными способам, композициям, применениям и готовым изделиям. Клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), для таргетирования антигена, такого как CD19, на клетки лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, индолентная лимфома представляет собой фолликулярную лимфому 1-3A степени (FL 1-3A), такую как рецидивирующая или трудно поддающаяся лечению FL. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние представляет собой лимфому маргинальной зоны (MZL), такую как рецидивирующая или трудно поддающаяся лечению MZL. В некоторых вариантах осуществления, субъект относится к определенной группе или подмножеству субъектов с FL 1-3A или MZL, таких как субъекты, получавшие интенсивное предварительное лечение, или субъекты с плохим прогнозом.

Уровень техники

Подтипы индолентных неходжкинских лимфом (NHL) представляют собой медленно растущие лимфомы, которые обычно лечат химиоиммунотерапевтическими

средствами, такими как анти-CD20 таргетная терапия или алкилирующие агенты. Фолликулярная лимфома является наиболее распространенным подтипом, на долю которого приходится от 10% до 20% всех случаев лимфомы. Лимфома маргинальной зоны составляет от 8% до 12% всех случаев В-клеточной NHL. Многие пациенты в конечном итоге рецидивируют или становятся невосприимчивыми к доступным методам лечения, а лечение второй, третьей и особенно четвертой линии ограничено. Необходима эффективная терапия для пациентов с FL 1-3A и MZL, у которых одна или несколько предшествующих терапий оказались неэффективными. Приведены способы и применения, отвечающие таким потребностям.

Сущность

В настоящем документе предложены способы лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии заболевания или состояния, которое представляет собой фолликулярную лимфому (FL) степени 1, 2 или 3A, где способ включает введение субъекту дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19, где: у субъекта имеется рецидив или невосприимчивость к лечению после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3A, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20-антителом и алкилирующим агентом; доза Т-клеток содержит от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В настоящем документе также предложено применение дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток для лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии заболевания, которое представляет собой рецидивирующую/трудно поддающуюся лечению (r/r) фолликулярную лимфому (FL) степени 1, 2 или 3A, где: Т-клетки дозы включают химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19; субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3A, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом; доза Т-клеток содержит от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; доза Т-клеток имеет отношение примерно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и доза составлена для введения в виде множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-

экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В настоящем документе также предложено применение дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии заболевания, которое представляет собой рецидивирующую/трудно поддающуюся лечению (r/r) фолликулярную лимфому (FL) степени 1, 2 или 3А, где: Т-клетки дозы включают химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19; субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20-антителом и алкилирующим агентом; доза Т-клеток содержит от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; доза Т-клеток имеет отношение приблизительно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и доза составлена для введения в виде множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна предшествующая линия терапии представляет собой одну предшествующую линию терапии.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения одной предшествующей линии терапии (POD24). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала одной предшествующей линии терапии после завершения одной предшествующей линии терапии (POD24). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения химиоиммунотерапевтической комбинированной терапии для лечения заболевания (POD24). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала лечения после завершения химиоиммунотерапевтической комбинированной терапии для лечения заболевания (POD24). В некоторых из таких вариантов осуществления, химиоиммунотерапевтическая комбинированная терапия включает ритуксимаб, циклофосамид, винкристин, доксорубицин и преднизолон (R-CHOP). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения лечения R-CHOP (POD24). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала лечения R-CHOP (POD24).

В некоторых из таких вариантов осуществления, химиоиммунотерапевтическая комбинированная терапия включает анти-CD20 моноклональное антитело и алкилирующий агент. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения лечения анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом (POD24). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала лечения анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом (POD24).

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и у него наблюдалось прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала одной предшествующей линии терапии, которая представляет собой анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (POD24). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и у него наблюдалось прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения одной предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (POD24).

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и он имеет по меньшей мере одно из следующего: симптомы, связанные с FL; угроза функции концевых органов, цитопения, вторичная к лимфоме или массивной лимфаденопатии; спленомегалия; и устойчивое прогрессирование заболевания в течение предшествующих шести месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта наблюдаются симптомы, связанные с FL. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется угроза функции концевых органов. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта наблюдаются симптомы, связанные с FL. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется цитопения, вторичная к лимфоме. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется массивная лимфаденопатия. В некоторых вариантах осуществления, массивная лимфаденопатия представляет собой одиночное образование >7 см или 3 или несколько образований >3 см. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется спленомегалия. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта наблюдается устойчивое прогрессирование заболевания в течение предшествующих шести месяцев или более.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна предшествующая линия терапии представляет собой две предшествующие линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, другая из двух предшествующих линий терапии выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или

аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K (PI3Ki). В некоторых вариантах осуществления, PI3Ki представляет собой иделагисиб, копанлисиб или дювелисиб.

В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него возник рецидив в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, предшествующая линия терапии представляет собой комбинированную терапию или монотерапию, включающую PI3Ki. В некоторых вариантах осуществления, другой из двух предшествующих линий терапии является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), и субъект имеет рецидив после HSCT.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него возник рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 терапией (невосприимчивость к анти-CD20). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению анти-CD20 терапией (невосприимчивость к анти-CD20). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 терапией (невосприимчивость к анти-CD20). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него возник рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 антителом. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению анти-CD20 антителом. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 антителом.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него возник рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 терапией и алкилирующим агентом. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 терапию и алкилирующий агент. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 терапию и алкилирующий агент.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после 2 или нескольких линий терапии или в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после 2 или нескольких линий терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20-антителом. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил поддерживающую терапию анти-CD20 антителом после двух предшествующих линий терапии, и субъект имеет рецидив во

время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил поддерживающую терапию анти-CD20 антителом, и субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20 антителом.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 моноклональное антитело представляет собой ритуксимаб или обинутузумаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 моноклональное антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин или хлорамбуцил. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой хлорамбуцил.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, необязательно аллогенной или аутологичной HSCT. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток представляет собой аллогенную HSCT. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, трансплантат гемопоэтических стволовых клеток представляет собой аутологичную HSCT.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна предшествующая терапия представляет собой две предшествующие линии терапии. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, другая из двух предшествующих линий терапии выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K, необязательно где ингибитор PI3K представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, другая из двух предшествующих линий терапии выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой иделализиб. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой копанлисиб. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет

собой дувелисиб.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна предшествующая терапия представляет собой три предшествующие линии терапии. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, каждая из двух других из трех предшествующих линий терапии независимо выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K, необязательно где ингибитор PI3K представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, каждая из двух других из трех предшествующих линий терапии независимо выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой иделализиб. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой копанлисиб. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PI3K представляет собой дувелисиб.

В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению анти-CD20 антителом. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения лечения анти-CD20 антителом. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения предшествующей линии терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил поддерживающую терапию анти-CD20 антителом после двух предшествующих линий терапии, и субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом или в течение шести месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20 антителом.

В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии, необязательно, после лечения комбинированной терапией или монотерапией PI3Ki. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения комбинированной терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения монотерапии PI3Ki.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения предшествующего курса терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения первой линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения второй линии терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив в течение 12 месяцев после завершения первой линии терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив в течение 12 месяцев после завершения второй линии терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения первой линии терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению в течение 12 месяцев после завершения второй линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, предшествующей линией терапии является лечение комбинированной терапией или монотерапией P13Ki. В некоторых вариантах осуществления, предшествующая линия терапии представляет собой монотерапию P13Ki. В некоторых вариантах осуществления, предшествующей линией терапии является лечение комбинированной терапией.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб или обинутузумаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин или хлорамбуцил. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой хлорамбуцил.

В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив по меньшей мере на один предшествующий курс терапии, и рецидив возникает после первоначального полного ответа (CR) или частичного ответа (PR) на предшествующую линию терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, рецидив возникает после первоначального полного ответа (CR) на предшествующую линию терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, рецидив возникает после первоначального частичного ответа (PR) на предшествующую линию терапии. В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению по меньшей мере, одним или

несколькими предшествующими видами терапии, и невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) или прогрессирующего заболевания (PD) после предшествующей линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) после предшествующей линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ прогрессирующего заболевания (PD) после предшествующей линии терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на одну предшествующую линию терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на две предшествующие линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на три предшествующие линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на более трех предшествующих линий терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к одной предшествующей линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к двум предшествующим линиям терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к трем предшествующим линиям терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к более чем трем предшествующим линиям терапии.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется по меньшей мере одно ПЭТ-положительное поражение и по меньшей мере одно поддающееся измерению узловое поражение или экстранодальное поражение, необязательно, где поддающееся измерению узловое поражение превышает 1,5 см по длинной оси независимо от короткой оси, и измеримое экстранодальное поражение превышает 1,0 см по длинной и короткой оси. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется по меньшей мере одно ПЭТ-положительное поражение и по меньшей мере одно поддающееся измерению узловое поражение или экстранодальное поражение. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, поддающееся измерению узловое поражение превышает 1,5 см по длинной оси независимо от короткой оси, и поддающееся измерению экстранодальное поражение превышает 1,0 см по длинной и короткой оси.

В настоящем документе также предложен способ лечения лимфомы маргинальной зоны (MZL), включающий введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) лимфомы маргинальной зоны (MZL), дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19, где: субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере двух предшествующих линий терапии для лечения MZL; доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; доза Т-клеток содержит соотношение приблизительно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и введение

включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

Также в настоящем документе предложено применение дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток для лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) лимфомы маргинальной зоны (MZL), где: Т-клетки дозы включают химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19; субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере двух предшествующих линий терапии для лечения MZL; доза Т-клеток содержит от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и доза составлена для введения множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В настоящем документе также предложено применение дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) лимфомы маргинальной зоны (MZL), где: Т-клетки дозы включают химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19; субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере двух предшествующих линий терапии для лечения MZL; доза Т-клеток содержит от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно; доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и доза составлена для введения множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, MZL представляет собой подтип, выбранный из экстранодальной MZL (ENMZL, преимущественно, желудочной), MZL селезенки (SMZL) и узловой MZL (NMZL). В некоторых вариантах осуществления, MZL является экстранодальной MZL (ENMZL, преимущественно, желудочной). В некоторых вариантах осуществления, MZL представляет собой MZL селезенки (SMZL). В некоторых вариантах осуществления, MZL представляет собой узловую MZL (NMZL).

В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию для лечения MZL или представляет собой трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух

предшествующих терапий представляет собой комбинированную системную терапию для лечения MZL. В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих терапий представляет собой трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию, и комбинированная системная терапия выбрана из комбинации ритуксимаба плюс циклофосфамида, доксорубина, винкристина и преднизолона (R-CHOP), или терапию анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой ритуксимаб плюс циклофосфамид, доксорубин, винкрестин и преднизолон (R-CHOP). В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию, которая представляет собой анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб или обинутузумаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин или хлорамбуцил. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин. В некоторых из таких вариантов осуществления, алкилирующий агент представляет собой хлорамбуцил.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих терапий представляет собой ритуксимаб и бендамустин или ритуксимаб и хлорамбуцил. В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии представляет собой ритуксимаб и бендамустин. В некоторых из предложенных вариантов осуществления по меньшей мере одна из по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии представляет собой ритуксимаб и хлорамбуцил.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется MZL селезенки (SMZL), и по меньшей мере, одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой спленэктомия. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется экстранодальная MZL (ENMZL), и антибиотик не является одной из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется ПЭТ не avidное заболевание с по меньшей мере одним поддающимся измерению узловым поражением более 2,0 см по длинной оси или по меньшей мере одним поддающимся

измерению экстранодальным поражением. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется ПЭТ не авидное заболевание с по меньшей мере одним поддающимся измерению узловым поражением размером более 2,0 см по длинной оси. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется ПЭТ не авидное заболевание с по меньшей мере одним поддающимся измерению экстранодальным поражением.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект не имеет FL степени 3B (FL3B). В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта нет признаков смешанной DLBCL и FL или трансформированной FL. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта нет признаков смешанной DLBCL и FL. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта нет признаков трансформированной FL. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект не имеет FL дуоденального типа по субклассификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект имеет рецидив по меньшей мере на один предшествующий курс терапии, и рецидив возникает после первоначального полного ответа (CR) или частичного ответа (PR) на предшествующую линию терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, рецидив возникает после первоначального полного ответа (CR) на предшествующую линию терапии. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, рецидив возникает после первоначального частичного ответа (PR) на предшествующую линию терапии. В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект невосприимчив к лечению по меньшей мере одним или несколькими предшествующими видами терапии, и невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) или прогрессирующего заболевания (PD) после предшествующей линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) после предшествующей линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ прогрессирующего заболевания (PD) после предшествующей линии терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на одну предшествующую линию терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на две предшествующие линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на три предшествующие линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив на более чем три предшествующие линии терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к одному предшествующему курсу терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к двум предшествующим линиям терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к трем предшествующим линиям терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к более чем трем

предшествующим линиям терапии.

В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект имеет общее состояние по оценке Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0 или 1. В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, субъект имеет общее состояние по ECOG 0. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет общее состояние по ECOG 1.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, перед введением дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток субъекту проводят противолимфомную терапию. В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, противолимфомная терапия завершается примерно за 7 дней до начала введения дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, противолимфомная терапия завершается примерно за 2-7 дней до начала введения дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток.

В некоторых из таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида. В некоторых из таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина. В некоторых из таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида. В некоторых из таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина и циклофосфамида. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе точно или примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$, необязательно, в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в дозе точно или примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно, в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней. В некоторых из таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в дозе точно или примерно 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 3 дней. В некоторых из таких вариантов осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 и флударабина в дозе точно или примерно 30 мг/м^2 , ежедневно, в течение 3 дней.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, CD19 представляет собой CD19 человека.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, химерный антигенный рецептор (CAR) содержит scFv, содержащий вариabельную область тяжелой цепи и вариabельную область легкой цепи антитела FMC63, спейсер, который содержит 15 аминокислот или менее и содержит шарнирную область иммуноглобулина или его модифицированную версию, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) и костимулирующую сигнальную область, которая представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия содержит формулу X_1PPX_2P , где X_1

представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин (SEQ ID NO: 58). В некоторых вариантах осуществления, X_1 представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления, X_1 представляет собой цистеин. В некоторых вариантах осуществления, X_1 представляет собой аргинин. В некоторых вариантах осуществления, X_2 представляет собой цистеин. В некоторых вариантах осуществления, X_2 представляет собой треонин. В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнир иммуноглобулина или его модифицированная версия представляет собой шарнир IgG1 или его модифицированную версию. В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнир иммуноглобулина или его модифицированная версия представляет собой шарнир IgG1. В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнир иммуноглобулина или его модифицированная версия представляет собой модифицированную версию шарнира IgG1. В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнир иммуноглобулина или его модифицированная версия представляет собой шарнир IgG4 или его модифицированную версию. В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнир иммуноглобулина или его модифицированная версия представляет собой шарнир IgG4. В некоторых из таких вариантов осуществления, шарнир иммуноглобулина или его модифицированная версия представляет собой модифицированную версию шарнира IgG4.

В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или варианте любой из вышеперечисленных, имеющей по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности. В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот. В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или варианте любой из вышеперечисленных, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34. В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: NO: 34 или варианте любой из вышеперечисленных, имеющей по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34. В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот. В некоторых из таких вариантов осуществления, спейсер

состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

В некоторых из таких вариантов осуществления, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. В некоторых из таких вариантов осуществления, трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO:8. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, трансмембранный домен состоит из последовательности аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых из таких вариантов осуществления, костимулирующий домен содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:12. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, костимулирующий домен содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, костимулирующий домен состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12. В некоторых из любых таких вариантах осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или представляет собой ее вариант, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:13, 14 или 15. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15. В некоторых из любых таких вариантах осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14. В некоторых из таких вариантов осуществления, сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15.

В некоторых из таких вариантов осуществления, scFv содержит последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 35, последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 55 и/или последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 56, и последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 38, последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 39 и/или последовательность CDRH3

SEQ ID NO: 54. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, scFv содержит последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 35, последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 55 и последовательность CDRL3 с SEQ ID NO: 56, и последовательность CDRH1 с SEQ ID NO: 38, последовательность CDRH2 с SEQ ID NO: 39 и последовательность CDRH3 с SEQ ID NO: 54. В некоторых любого из таких вариантов осуществления, scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), и последовательность CDRH1 DYGVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). В некоторых из таких вариантов осуществления, scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), и последовательность CDRH1 DYGVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). В некоторых из таких вариантов осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и V_L , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42. В некоторых из таких вариантов осуществления, scFv содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку от N-конца к С-концу, V_L , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и V_H , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, CAR содержит, по порядку от N-конца к С-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO: 1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO: 8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO: 12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), представленный в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет от примерно 5×10^7 CAR⁺ Т-клеток до примерно $1,1 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток, каждая включительно. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 5×10^7 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 6×10^7 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 7×10^7 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 8×10^7 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 9×10^7 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 1×10^8 CAR⁺ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток

составляет $1,1 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4+ и CD8+ Т-клеток составляет $1,2 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4+ и CD8+ Т-клеток составляет $1,3 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4+ и CD8+ Т-клеток составляет $1,4 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, доза CD4+ и CD8+ Т-клеток составляет $1,5 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток.

[illegible]

некоторых из предложенных вариантов осуществления, первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 30 минут. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 15 минут. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 10 минут. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 5 минут. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, первую композицию вводят перед второй композицией. В некоторых вариантах осуществления, первая композиция содержит CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторая композиция содержит CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, дозу CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток вводят внутривенно. В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные из образца субъекта. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, образец, из которого получены или выделены клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови. В некоторых вариантах осуществления, образец, из которого получают или выделяют клетки, представляет собой продукт афереза или лейкофереза или получен из него. В некоторых вариантах осуществления, образец получают от субъекта перед введением субъекту противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, образец для лейкофереза получают от субъекта примерно за четыре или пять недель до введения субъекту дозы CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток. В некоторых из таких вариантов осуществления, субъектом является человек.

В некоторых из любых предложенных вариантов осуществления, частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, пролеченных в соответствии с данным способом, составляет более чем точно или примерно 50%, более чем точно или примерно 60%, более чем точно или примерно 70% или более чем точно или примерно 80%. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, составляет более чем точно или примерно 50%. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, составляет более чем точно или примерно 60%. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, составляет более чем точно или примерно 70%. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, составляет более чем точно или примерно 80%. В некоторых из любых таких вариантов осуществления, CRR представляет собой долю субъектов с лучшим общим ответом (BOR) в течение до 24 месяцев полного

ответа (CR).

В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет FL 1, 2 или 3A степени, и CRR оценивается с помощью ПЭТ-КТ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет FL 1 степени, и CRR оценивается с помощью ПЭТ-КТ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет FL 2 степени, и CRR оценивается с помощью ПЭТ-КТ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, субъект имеет FL 3A степени, и CRR оценивается с помощью ПЭТ-КТ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется MZL, и CRR оценивают с помощью КТ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется MZL, и CRR оценивают с помощью МРТ. В некоторых из предложенных вариантов осуществления, у субъекта имеется MZL, и CRR оценивают с помощью КТ и МРТ.

Краткое описание чертежей

На **ФИГ. 1А** показаны дифференциальные профили генной экспрессии в биоптатах опухоли до лечения у субъектов, демонстрирующих полный ответ (CR) или прогрессирующее заболевание (PD) через 3 месяца после лечения, среди пациентов в исходной когорте.

На **ФИГ. 1В** показаны различные обогащенные наборы генов, ассоциированные с PD, через 3 месяца после лечения среди пациентов в исходной когорте, включая гены, более высоко экспрессированные в образцах клеточной линии диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) по сравнению с образцами клеточной линии фолликулярной лимфомы (FL; FL_DLBC_Like_DN).

На **ФИГ. 2А** показаны дифференциальные профили генной экспрессии в биоптатах опухоли до лечения у субъектов, демонстрирующих полный ответ (CR) или прогрессирующее заболевание (PD) через 3 месяца после лечения, среди пациентов в большей когорте.

На **ФИГ. 2В** показаны различные обогащенные наборы генов, ассоциированные с PD через 3 месяца после лечения среди пациентов в большей когорте, включая гены, более высоко экспрессированные при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (DLBCL) по сравнению с фолликулярной лимфомой (FL; DLBC_Like_vs_FL и SHIP_DLBC_Like_vs_Follicular_Lymphoma_UP).

На **ФИГ. 2С** показаны различные обогащенные наборы генов, связанные с исключением Т-клеток, среди соответствующих образцов до лечения и на 11 день после лечения, включая гены, более высоко экспрессированные при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (DLBCL) по сравнению с фолликулярной лимфомой (FL; DLBC_Like_vs_FL и SHIP_DLBC_Like_vs_Follicular_Lymphoma_UP).

На **ФИГ. 3** показана дифференциальная генная экспрессия между биоптатами опухоли FL и биоптатами опухоли DLBCL.

На **ФИГ. 4А** и **4В** показана дифференциальная экспрессия типовых генов EZH2

(ФИГ. 4А) и CD3ε (ФИГ. 4В) между опухолями FL и DLBCL.

На ФИГ. 5А и 5В (начальная когорта) и ФИГ. 5С (большая когорта) показаны оценки анализа обогащения набора генов одного образца (ssGSEA) между генами, уровень которых был повышен при DLBCL (обозначен как «DLBCL-подобный набор генов»; ФИГ. 5А) по сравнению с FL (обозначен как «FL-подобный набор генов»; ФИГ. 5В и 5С) и субъектов, у которых развился CR, или субъектов, у которых развилось PD, и показано, что субъекты, имеющие профили экспрессии опухолевых генов, более похожие на профили, наблюдаемые при FL, по сравнению с теми, которые наблюдаются при DLBCL, с большей вероятностью демонстрируют CR через 3 месяца после лечения.

На ФИГ. 5D показаны кривые выживаемости без прогрессирования (PFS) среди 74 субъектов с DLBCL по сравнению с 15 субъектами с самой высокой экспрессией FL-подобного гена и другими 59 субъектами.

Подробное описание

Предложены способы и применение сконструированных клеток (например, Т-клеток) и/или их композиций для лечения субъектов, страдающих заболеванием или состоянием, которое обычно представляет собой или включает рак или опухоль, такую как лейкоз или лимфома, в частности, В-клеточная злокачественная опухоль или неходжкинская лимфома (NHL). В конкретных вариантах осуществления любого из предоставленных способов, Т-клетки конструируют с химерным антигенным рецептором (CAR), который направлен против CD19. В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой В-клеточную лимфому. В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой фолликулярную лимфому (FL) степени 1-3А. В некоторых аспектах, заболевание или состояние представляет собой лимфому маргинальной зоны (MZL). В некоторых аспектах, способы и применения обеспечивают или позволяют достичь улучшенного ответа, и/или более устойчивых ответов, или эффективности, и/или сниженного риска токсичности или других побочных эффектов, например, в определенных группах субъектов, получающих лечение, по сравнению с некоторыми альтернативными способами. В некоторых вариантах осуществления, способы выгодны благодаря введению определенных количеств или относительных количеств сконструированных клеток, введению определенных соотношений конкретных типов клеток, лечению определенных групп пациентов, таких как пациенты с определенным профилем риска, стадированием и/или анамнезом предшествующего лечения, и/или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, способы и применения включают введение субъектам клеток, экспрессирующих генетически сконструированные (рекомбинантные) рецепторы клеточной поверхности при адоптивной клеточной терапии, которые обычно представляют собой химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), распознающие антиген, экспрессируемый, ассоциированный с и/или специфичный для лимфомы и/или типа клеток, из которых они получены. Клетки обычно вводят в составе композиции, составленной для введения; способы обычно включают введение

одной или нескольких доз клеток субъекту, где доза(ы) может включать конкретное количество или относительное количество клеток или сконструированных клеток и/или определенное соотношение или композиции двух или нескольких подтипов в композиции, такое как CD4 к CD8 Т-клеткам.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, популяции и композиции вводят субъекту, страдающему конкретным заболеванием или состоянием, которое необходимо лечить, например, с помощью адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, страдающего лимфомой или В-клеточным злокачественным новообразованием, таким как индолентная неходжкинская лимфома (NHL), дозой клеток, экспрессирующих антигенный рецептор (например, клеток, экспрессирующих CAR).

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают лечение конкретной группы или подмножества субъектов, например субъектов, у которых выявлено заболевание с высоким риском. В некоторых аспектах, способы лечат субъектов с плохим прогнозом вялотекущей NHL, такой как NHL с рецидивом или трудно поддающейся лечению (R/R) стандартной терапией и/или с плохим прогнозом. В некоторых аспектах, способы лечат субъектов с NHL, такой как FL G1-3A или MZL, с рецидивом или трудно поддающейся лечению (R/R) стандартной терапией. В некоторых аспектах, предложенные способы, композиции, применения и изделия обеспечивают улучшенные и превосходные ответы на доступные методы лечения. В некоторых вариантах осуществления, улучшенный или превосходный ответ сравнивают с текущим стандартом лечения (SOC).

CD19 представляет собой гликопротеин массой 95 кДа, присутствующий на В-клетках с раннего развития до дифференциации в плазматические клетки (Stamenkovic et al., J Exp Med. 1988; 168(3):1205-10). Он является членом суперсемейства иммуноглобулинов и действует как положительный регулятор рецептора В-клеток, снижая порог передачи сигналов для активации В-клеток (Brentjens et al., Blood. 2011; 118(18):4817-28; LeBien et al, Blood. 2008;112(5):1570-80). CD19 является привлекательной терапевтической мишенью, поскольку он экспрессируется большинством В-клеточных злокачественных новообразований, включая В-клеточную NHL (Davila et al., Oncoimmunology. 2012;(9):1577-83). Важно отметить, что CD19 не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках или на каких-либо нормальных тканях, кроме В-клеточной линии. Кроме того, CD19 не выделяется в кровотоки, что ограничивает побочные эффекты вне мишени (Shank et al., Pharmacotherapy. 2017;37(3):334-45).

В конкретных вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, основаны на применении CD19-направленной CAR Т-клеточной терапии, в которой CAR содержит CD19-направленный антигенсвязывающий домен scFv (например, из FMC63). CAR дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен из CD3зета, а также включает 4-1BB костимулирующий домен, который был связан с более низкой частотой синдрома высвобождения цитокинов

(CRS) и нейротоксичности (NT; например, неврологические явления (NE)) по сравнению с конструкциями, содержащими CD28 (Lu et al. *J Clin Oncol.* 2018; 36:3041). В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, включают подмножества CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, которые трансдуцируются и размножаются отдельно *in vitro* и вводятся в равных (примерно 1:1) целевых дозах. В некоторых вариантах осуществления, существует низкая вариабельность вводимых общих доз CD4⁺ и CD8⁺ CAR⁺ Т-клеток, двух параметров, связанных с повышенной токсичностью в предшествующих исследованиях (Neelapu et al., *N Engl Med.* 2017. 377:2531-44; Turtle et al., *Sci Transl Med.* 2016;8:355ra116; Hay et al., *Blood.* 2017;130:2295-306).

В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение клеток субъекту, выбранному или идентифицированному как имеющий определенный прогноз или риск В-клеточного злокачественного новообразования, такого как NHL, например, FL G1-3A или MZL. Лимфомы, такие как NHL, могут быть вариабельными заболеваниями. Некоторые пациенты с NHL могут выжить без лечения, в то время как другим может потребоваться немедленное вмешательство. В некоторых вариантах осуществления, способы, применения и изделия включают или используются для лечения субъектов, включая выбор или идентификацию конкретной группы или подмножества субъектов, например, на основе конкретных типов заболевания, диагностических критериев, предшествующего лечения и/или ответа на предшествующее лечение. В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, у которого возник рецидив после ремиссии после лечения одной или несколькими предшествующими терапиями или который стал невосприимчивым к ним; или субъекта, у которого имеется рецидив или невосприимчивость (R/R) к одной или нескольким предшествующим терапиям, например, к одной или нескольким линиям стандартной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, у которого возник рецидив после ремиссии после лечения двумя или несколькими предшествующими терапиями или который стал невосприимчивым к ним. В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, у которого имеется рецидив или невосприимчивость (R/R) к двум или нескольким предшествующим терапиям, например, к двум или нескольким линиям стандартной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, у которого возник рецидив после ремиссии после лечения тремя или несколькими предшествующими терапиями или который стал невосприимчивым к ним; или субъекта, у которого имеется рецидив или невосприимчивость (R/R) к трем или нескольким предшествующим терапиям, например, к трем или нескольким линиям стандартной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили терапией или терапевтическим агентом, таргетирующим заболевание или состояние, например, NHL, такую как FL G1-3A или MZL, до введения клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее подвергался трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), например, аллогенной HSCT

или аутологичной HSCT. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта был плохой прогноз после лечения стандартной терапией и/или он не достиг результата на одной или нескольких линиях предшествующей терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил лечение или ранее получал по меньшей мере или по меньшей мере примерно или примерно 1, 2, 3, 4 или более других видов терапии для лечения заболевания или нарушения, таких как FL G1-3A или MZL, отличных от противолимфомной терапии и/или дозы клеток, экспрессирующих антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, субъект проходил лечение или ранее получал терапию, которая включает агент, таргетирующий CD20 (например, анти-CD20 антитело), и алкилирующий агент.

Некоторые CD19-направленные CAR-T-клеточные терапии доступны для лечения В-клеточной лимфомы, включая аксикабтаген цилолеуцел (акси-цел) и тисагенлеклеуцел. В одном типовом исследовании, субъекты, получавшие акси-цел, достигли показателей полного ответа 54%, при этом 40% достигли стойкой ремиссии (медиана наблюдения 15,4 месяца) (Neelapu et al., *N Engl Med.* 2017. 377:2531-44). У большинства субъектов развился CRS (93%) и NE (64%), со средним временем до начала заболевания 2 и 5 дней, соответственно, и CRS ≥ 3 степени (критерии оценки Ли (Lee et al., *Blood.* 2014; 124:188-95) и NE возникали у 13% и 28%, соответственно, и 43% получали тоцилизумаб (27% получали кортикостероиды). В другом типовом исследовании, приблизительно треть пациентов, которые получали тисагенлеклеуцел, сохраняла стойкую ремиссию в течение 1 года (Schuster et al., *N Engl J Med.* 2019. 380:45-56). У большинства субъектов (58%) развился CRS, в то время как у 21% были NE. CRS ≥ 3 степени (критерии классификации Пенна, Porter et al., *J Hematol Oncol.* 2018;11:35) и NE были зарегистрированы у 22% и 12% пациентов, соответственно (Schuster et al., *N Engl J Med.* 2019. 380:45-56). Хотя благоприятный ответ наблюдался для лечения этих показаний, уровень токсичности оставался высоким. Кроме того, в настоящее время нет утвержденных CAR T-клеточных терапий для лечения пациентов с определенными подтипами лимфомы, включая пациентов с FL G1-3A или MZL, и в частности, у таких пациентов с определенными признаками высокого риска, такими как двойная невосприимчивость или прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после первоначального диагноза и/или начала лечения (POD24).

FL является наиболее распространенным подтипом индолентных неходжкинских лимфом (NHL), на долю которого приходится от 10% до 20% всех случаев лимфомы в западных странах (Международный союз по борьбе с раком [UICC], 2014; Miranda-Filho et al., *Cancer Causes Control.* 2010; 30(5):489-99). Лечение второй линии (2L) чаще всего включает те же методы лечения, которые используются в первой линии, в основном, схемы химиотерапии. После терапии 2L при FL, возможности для пациентов с r/r FL ограничены. В рекомендациях Национальной комплексной онкологической сети (NCCN, 2019) и Европейского общества медицинской онкологии (ESMO) (Dreyling, 2016) предполагается, что если длительная ремиссия была достигнута на первой линии терапии,

часто одну и ту же схему повторяют при лечении 2L, чаще всего у пациентов, получающих бендамустин плюс ритуксимаб (BR) при терапии первой линии, и реже у пациентов, получающих ритуксимаб, циклофосфамид, винкристин, доксорубицин и преднизолон (R-CHOP), из-за опасений по поводу кардиотоксичности. Терапия второй линии для тщательно отобранных пациентов может также включать аутологичную или аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT) (NCCN, 2019; Dreyling et al., 2016 *Ann Oncol.* 2016;27(83-v90). В настоящее время, отсутствует стандарт лечения FL четвертой линии и выше (4L+). В настоящее время для этой линии не одобрено ни одного препарата. Более того, к четвертой линии пациенты, как правило, исчерпали доступные варианты лечения. Прогрессирование заболевания приводит к сокращению интервалов между каждым лечением и отсутствие результата, предполагая, что пациенты, которые получили три предшествующих системных терапии во время рецидива или прогрессирования заболевания, будут составлять группу пациентов с высокой неудовлетворенной потребностью. Отсутствие доступных вариантов лечения в условиях невосприимчивости представляет собой значительную неудовлетворенную потребность, особенно в третьей линии и выше (3L+). Хотя прогноз для FL значительно улучшился за последние два десятилетия, FL остается неизлечимой (Kahl et al., *Blood.* 2016 Apr 28;127(17):2055-63).

Лимфома маргинальной зоны (MZL) является третьей наиболее распространенной гистологией NHL, на которую приходится от 8% до 12% всех случаев В-клеточной NHL (Swerdlow et al., 2016; *Blood*, 30:84-91; Al-Hamadani et al., *Am J Hematol.*, 2015;90(9):790-5). Описаны три подтипа: экстранодальная MZL (ENMZL, в основном желудочная), селезеночная MZL (SMZL) и узловая MZL (NMZL). Пациенты с MZL часто недопредставлены или исключены из исследований других индолентных NHL, учитывая их гетерогенность. Более того, токсичность, связанная с лечением, может ограничивать возможности для пожилых пациентов (средний возраст 67 лет), и клиническое течение MZL также неоднородно, при этом узловая диссеминированная MZL связана с худшим прогнозом по сравнению с другими подтипами (Denlinger et al., *Cancer Manag Res.* 2018;10:615-24). Ибрутиниб является обычной терапией для MZL, так что при терапии третьей линии (3L) многие пациенты с MZL, вероятно, будут получать ибрутиниб, и, таким образом, пациенты, у которых две предшествующие линии терапии не дали результата, считаются популяцией с высокой неудовлетворенной потребностью. Другие варианты лечения включают комбинацию леналидомида и ритуксимаба в 2L+ MZL.

Имеющиеся данные указывают на высокую неудовлетворенную потребность в дополнительных терапевтических вариантах, обеспечивающих благоприятный профиль пользы/риска и длительный ответ, который не удовлетворяется с помощью доступных терапий для субъектов второй линии (2L), третьей линии (3L) или четвертой линии и выше (4L+) вялотекущей FL 1-3A степени. Кроме того, для более редких подтипов NHL, включая MZL, доступны ограниченные варианты лечения. Эти результаты указывают на важные пробелы в лечении R/R NHL, особенно среди субъектов с признаками высокого

риска FL G1-3A или MZL, а также на необходимость улучшения существующих методов лечения. В настоящем документе представлены варианты осуществления, которые могут удовлетворить такие потребности.

В конкретных вариантах осуществления, предложенные способы можно использовать для лечения конкретных подтипов NHL или групп высокого риска, таких как пациенты с двойной невосприимчивостью к лечению или имеющие POD24, у которых доступные варианты лечения остаются ограниченными. В некоторых случаях, доступные терапии, включая другие CAR T-клеточные терапии, могут быть связаны с высоким риском токсичности. В некоторых аспектах, цитокин-ассоциированная токсичность, такая как CRS и нейротоксичность, наблюдалась при CAR T-клеточной терапии (Bonifant et al., *Mol Ther Oncolytics*. 2016; 3:16011; Turtle et al., *J Clin Invest*. 2016; 126(6):2123-38). Например, существующая CAR T-клеточная терапия ассоциирована с тяжелой токсичностью, связанной с CAR T-клетками, включая синдром высвобождения цитокинов (CBQ) и неврологические явления (NE), которые могут ограничивать введение в специализированных лечебных центрах (Стратегия оценки и снижения рисков Yescarta). (REMS) Gilead Pharma September 10, 2019; Стратегия оценки и снижения рисков Kymriah (REMS) Novartis September 10, 2019) и влияют на использование у трудно поддающихся лечению пациентов. Терапия CAR T-клетками с благоприятным профилем польза/риск может позволить более широкое включение подгрупп субъектов, включая популяции пациентов с высоким риском.

Наблюдения, представленные в настоящем документе, поддерживают лечение субъектов с заболеванием высокого риска с помощью CD19-направленной CAR T-клеточной терапии в соответствии с представленными способами. Например, субъекты с FL степени 1-3A или MZL, и пациенты с определенными признаками высокого риска, такими как двойная невосприимчивость или прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после первоначального диагноза и/или начала лечения (POD24), могут лечиться в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы можно использовать для лечения субъектов, которые предварительно подвергались интенсивному лечению (например, одной, двум, трем, четырем или более предшествующим терапиям для лечения заболевания).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, предложенные способы, готовые изделия и/или композиции могут иметь преимущества по сравнению с другими доступными способами или решениями или подходами для лечения, такими как адоптивная клеточная терапия. В частности, среди предложенных вариантов осуществления, есть такие, которые предлагают лечение субъектов с R/R FL G1-3A и R/R MZL. В конкретных вариантах осуществления, среди субъектов с R/R FL G1-3A, субъекты имеют двойной статус невосприимчивости или прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после первоначального диагноза и/или начала лечения (POD24).

Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены посредством ссылки для всех

целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была включена посредством ссылки по отдельности. Если определение, изложенное в настоящем документе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ посредством ссылки, определение, изложенное в настоящем документе, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящий документ посредством ссылки..

Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описываемый объект.

I. СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЕ CD19-ТАРГЕТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ИНДОЛЕНТНОЙ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ (FL) СТЕПЕНИ 1-3А И ЛИМФОМЕ МАРГИНАЛЬНОЙ ЗОНЫ (MZL)

В настоящем документе предложены способы лечения, которые включают введение сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки. Также предложены способы и применения сконструированных клеток (например, Т-клеток) и/или их композиций, включая способы лечения субъектов с R/R FL G1-3A или R/R MZL, которые включают введение сконструированных клеток и/или их композиций. В некоторых аспектах, также предложены применения сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки, для лечения R/R FL G1-3A или R/R MZL. В некоторых аспектах, применение сконструированных клеток или композиций, содержащих сконструированные клетки, такие как сконструированные Т-клетки, соответствует любому из способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, способы и применения включают введение субъектам клеток, экспрессирующих генетически сконструированные (рекомбинантные) рецепторы клеточной поверхности при адоптивной клеточной терапии, которые обычно представляют собой химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), распознающие антиген, экспрессируемый, ассоциированный с и/или специфичный для лимфомы и/или типа клеток, из которых они получены. Клетки обычно вводят в составе композиции, составленной для введения. В конкретных вариантах осуществления, способы включают введение субъекту одной или нескольких доз клеток, которые включают определенное количество или относительное количество клеток или сконструированных клеток, например, определенное соотношение или композиции из двух или нескольких подтипов в пределах композиции, например, CD4 к CD8 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки или содержащие их композиции вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. Применение включает применение сконструированных клеток или композиций в таких способах и методах лечения, и при получении лекарственного средства для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления,

способы осуществляются путем введения сконструированных клеток или композиций, содержащих их, субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, способы таким образом лечат заболевание, состояние или нарушение у субъекта.

Общие способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в связи с предлагаемыми способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238, выданной Gruenberg et al; патенте США № 4,690,915, выданном Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*. 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol*. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, популяции и композиции вводят субъекту, страдающему индолентной NHL, которую необходимо лечить, например, с помощью адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых аспектах, NHL можно стадировать на основе классификации Лугано (см., например, Cheson et al., (2014) *JCO* 32(27):3059-3067; Cheson, B.D. (2015) *Chin Clin Oncol* 4(1):5). В некоторых случаях, стадии обозначаются римскими цифрами с I по IV (1-4), и лимфомы ограниченной стадии (I или II), поражающие орган вне лимфатической системы (экстранодальный орган), обозначаются буквой E. Стадия I представляет собой вовлечение одного узла или группы соседних узлов, либо одиночное экстранодальное поражение без вовлечения узлов (IE). Стадия 2 представляет собой вовлечение двух или нескольких узловых групп на одной стороне диафрагмы, или стадии I или II по протяженности узлов с ограниченным непрерывным экстранодальным поражением (IIE). Стадия III представляет собой вовлечение узлов по обеим сторонам диафрагмы или узлов над диафрагмой с вовлечением селезенки. Стадия IV представляет собой вовлечение в дополнительные несмежные экстралимфатические поражения. Кроме того, «массивная лимфаденопатия» может использоваться для описания крупных опухолей грудной клетки, в частности для II стадии. Степень заболевания определяется с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и компьютерной томографии (КТ) при авидных лимфомах и КТ при не авидных гистологиях. В некоторых из любых вариантов осуществления, во время или до введения дозы клеток, субъект, подлежащий лечению в соответствии с предложенными вариантами осуществления, имеет положительное по позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) заболевание.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, имеющего R/R FL G1-3A или R/R MZL, дозой клеток, экспрессирующих антигенный рецептор (например, клеток, экспрессирующих CAR). В конкретных вариантах осуществления, способ включает введение субъекту дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток, где каждая доза Т-клеток содержит химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту 18 лет или больше. В некоторых

вариантах осуществления, если субъект ранее получал CD19-таргетную терапию, у субъекта должно быть подтверждено наличие CD19-положительной лимфомы после завершения предшествующей CD19-таргетной терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется гистологически подтвержденное заболевание в течение 6 месяцев после скрининга. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет адекватную функцию органа и сосудистый доступ.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет общее состояние по оценке Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG), равное 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления, индикатор общего состояния Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) можно использовать для оценки или выбора субъектов для лечения, например, субъектов, у которых были плохие результаты предшествующего лечения (см., например, Oken et al., (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655). Шкала общего состояния ECOG описывает уровень функционирования пациента с точки зрения его способности заботиться о себе, повседневной активности и физических способностей (например, ходьба, работа и т. д.). В некоторых вариантах осуществления, общее состояние ECOG, равное 0, указывает, что субъект может выполнять обычную деятельность. В некоторых аспектах, субъекты с общим состоянием ECOG 1 демонстрируют некоторые ограничения в физической активности, но субъект полностью передвигается. В некоторых аспектах, пациенты с общим состоянием ECOG 2 более чем на 50% проводят амбулаторно. В некоторых случаях, субъект с общим состоянием ECOG 2 также может быть способен к самообслуживанию; см., например, Sørensen et al., (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775. Критерии, отражающие общее состояние ECOG, описаны в **Таблице 1** ниже:

Таблица 1. Критерии общего состояния ECOG	
Оценка	Общее состояние ECOG
0	Полная активность, способность выполнять все функции до заболевания без ограничений
1	Ограничения в физической нагрузке, амбулаторный статус и способность выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую домашнюю работу, работу в офисе
2	Амбулаторный статус и способность к самообслуживанию, но невозможность выполнять какую-либо работу; на ногах более 50% времени бодрствования
3	Способность лишь к ограниченному уходу за собой; ограниченность кроватью или креслом более 50% часов бодрствования
4	Полная инвалидность; отсутствие возможности самообслуживания; полная ограниченность кроватью или креслом

5	Смерть
---	--------

Предложенные способы предназначены для лечения субъектов, у которых возник рецидив или невосприимчивость (R/R) к предшествующей терапии. В некоторых аспектах, субъект имеет рецидив после первоначального полного ответа (CR) или частичного ответа (PR) на предшествующую терапию. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению по меньшей мере одним или несколькими предшествующими видами терапии, и невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) или прогрессирующего заболевания (PD) после предшествующей терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту не менее 18 лет. В конкретных вариантах осуществления, предложенные способы могут приводить к благоприятным результатам и низким показателям токсичности в группе пожилых субъектов, в том числе у субъектов старше 60 лет или старше.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают фиксированное дозирование, например, общее количество CAR+ клеток, общее количество CAR+CD8+ Т-клеток и/или CAR+CD4+ Т-клеток, например, для введения точной или фиксированной дозы такого(их) типа(ов) клеток каждой из групп субъектов, получающих лечение, включая субъектов с колеблющимся весом. Таким образом, предложенные способы включают способы, в которых доза клеток представляет собой базовую дозу клеток или фиксированную дозу клеток, так что доза клеток не привязана к или не зависит от площади поверхности тела или весу субъекта. В некоторых вариантах осуществления, такие способы сводят к минимуму или уменьшают вероятность введения слишком большого количества клеток субъекту, что может увеличить риск токсического исхода, связанного с введением CAR-Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток составляет от примерно 5×10^7 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), до примерно $1,1 \times 10^8$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно 5×10^7 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно 6×10^7 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно 7×10^7 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно $0,75 \times 10^8$ CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно 8×10^7 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно 9×10^7 Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно 1×10^8 Т-клеток,

экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно $1,1 \times 10^8$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит точно или примерно $1,5 \times 10^8$ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR). В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки в дозе включают $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток представляет собой количество таких клеток, которые являются жизнеспособными клетками.

В контексте адоптивной клеточной терапии, введение данной «дозы» включает введение данного количества или числа клеток в виде одной композиции и/или однократное непрерывное введение, например, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, а также включает введение данного количества или числа клеток в виде разделенной дозы или в виде множества композиций, представленных в виде нескольких индивидуальных композиций или инфузий, в течение определенного периода времени, например, не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах, доза представляет собой однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, вводимое или начатое в один момент времени. Однако, в некоторых контекстах, дозу вводят в виде многократных инъекций или вливаний в течение периода не более трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или путем многократных вливаний в течение одного дня.

Таким образом, в некоторых аспектах, клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы вводят во множестве композиций, совместно содержащих клетки дозы.

В некоторых вариантах осуществления, термин «дробная доза» относится к дозе, разделенной таким образом, что ее вводят в течение более чем одного дня. Этот тип дозирования охватывается настоящими способами и считается разовой дозой.

Таким образом, доза клеток может быть введена в виде дробной дозы, например, дробной дозы, вводимой в течение времени. Например, в некоторых вариантах осуществления, доза может быть введена субъекту в течение 2 дней или более 3 дней. Типовые способы дробного дозирования включают введение 25% дозы в первый день и введение оставшихся 75% дозы во второй день. В других вариантах осуществления, 33% дозы можно вводить в первый день, и оставшиеся 67% во второй день. В некоторых аспектах, 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят во второй день и 60% дозы вводят в третий день. В некоторых вариантах осуществления, дробную дозу не распределяют более чем на 3 дня.

В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы можно вводить путем введения множества композиций или растворов, таких как первая и вторая, необязательно больше, каждый из которых содержит некоторое количество клеток дозы. В некоторых аспектах, множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно в течение определенного

периода времени. Например, популяции или подтипы клеток могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или популяции, обогащенные $CD8^+$ и $CD4^+$, соответственно, например, $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетками, каждые индивидуально, включая клетки, генетически сконструированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или дозы, например введение множества клеточных композиций, включает введение клеточных композиций по отдельности. В некоторых аспектах, отдельные введения осуществляют одновременно или последовательно в любом порядке. В конкретных вариантах осуществления, отдельные введения осуществляют последовательно, путем введения в любом порядке первой композиции, содержащей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и второй композиции, содержащей другую дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза содержит первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 48 часов друг от друга, например, с интервалом не более 36 часов друг от друга или с интервалом не более 24 часов друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа или не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут и не более 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа или не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом менее 2 часов.

В некоторых композициях, первая композиция, например, первая композиция дозы, содержит $CD4^+$ Т-клетки. В некоторых композициях, первая композиция, например первая композиция дозы, содержит $CD8^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию вводят перед второй композицией. В конкретных вариантах осуществления, $CD8^+$ Т-клетки вводят перед $CD4^+$ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза или состав клеток включает определенное или целевое соотношение $CD4^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), к $CD8^+$ клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор (например, CAR), и/или $CD4^+$ клеток к $CD8^+$ клеткам, соотношение которых необязательно составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах, введение композиции или дозы с целевым или желаемым соотношением различных клеточных

популяций (таким как соотношение $CD4^+:CD8^+$ или соотношение $CAR^+CD4^+:CAR^+CD8^+$, например, 1:1) включает введение клеточной композиции, содержащей одну из популяций, и затем введение отдельной клеточной композиции, содержащей другую из популяций, где введение находится в целевом или желаемом соотношении или приблизительно соответствует ему. В некоторых аспектах, введение дозы или композиции клеток в определенном соотношении приводит к улучшенному размножению, жизнестойкости и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

А. Индолентная фолликулярная лимфома (FL) степени 1-3А

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают лечение конкретной группы или подмножества субъектов с фолликулярной лимфомой (FL). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет FL степени 1-3А, включая субъектов с рецидивирующей/трудно поддающейся лечению FL G1-3А. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают субъекта, страдающего заболеванием, которое представляет собой индолентную фолликулярную лимфому (FL). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет заболевание FL 1 степени. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет заболевание FL 2 степени. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет заболевание FL 3А степени.

В конкретных аспектах, способ, представленный в настоящем документе, включает введение субъекту дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, где каждая доза Т-клеток содержит химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19. Такие CAR-Т-клетки и способы их получения описаны в разделе II.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают введение от точно или примерно $2,5 \times 10^7$ до точно или примерно $1,5 \times 10^8$, например, от примерно 5×10^7 до точно или примерно 1×10^8 рекомбинантных Т-клеток, экспрессирующих рецептор (например, CAR^+ Т-клеток), таких как доза Т-клеток, включая $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки, вводимая в определенном соотношении, как описано в настоящем документе, например, в соотношении точно или примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,4 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,3 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,2 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,1 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит

дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,0 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 9×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 8×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 7×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 6×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит соотношение примерно 1:1 CD4+ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR-экспрессирующим Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, вводимая доза представляет собой точное, или базовое, или фиксированное количество CAR+ Т-клеток, или точное, или базовое, или фиксированное количество конкретного типа CAR+ Т-клеток, таких как CD4+CAR+ Т-клетки и/или CD8+CAR+ Т-клетки, и/или количество любых из таких клеток, которое находится в пределах заданной степени дисперсии, например, не более, + или - (плюс или минус, в некоторых случаях обозначается как $\pm$), 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15% по сравнению с таким точным, базовым или фиксированным числом. В некоторых вариантах осуществления, такое базовое или фиксированное количество клеток составляет точно или примерно $2,5 \times 10^7$ всего CAR+ Т-клеток или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток, 5×10^7 всего CAR+ Т-клеток или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток, или 1×10^8 всего CAR+ Т-клеток, или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы состоят или по существу состоят из CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы состоят или по существу состоят из CD3+ CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы состоят или состоят по существу из CD4+CAR+ Т-клеток и CD8+CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы не содержат или по существу не содержат CD3-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы не содержат или по существу не содержат CAR-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы не содержат или по существу не содержат CD3-CAR-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, количество клеток в дозе включает или состоит из или по существу состоит из $2,5 \times 10^7$ CAR+ Т-клеток, например $1,25 \times 10^7$ CD4+CAR+ Т-клеток и $1,25 \times 10^7$ CD8+CAR+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, доза включает или состоит из или по существу состоит из 5×10^7 CAR+ Т-клеток, например, $2,5 \times 10^7$ CD4+CAR+ Т-клеток и $2,5 \times 10^7$ CD8+CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза включает или состоит или по существу состоит из 1×10^8 CAR+ Т-клеток, например, $0,5 \times 10^8$ CD4+CAR+ Т-клеток и $0,5 \times 10^8$ CD8+CAR+ Т-

клеток. В некоторых аспектах, количество вводимых клеток находится в пределах определенной степени отклонения от таких чисел в вышеупомянутых вариантах осуществления, например, в пределах плюс или минус ($\pm$) 5, 6, 7, 8, 9 или 10%, например, в пределах плюс-минус 8% по сравнению с таким(и) количеством(ами) клеток. В некоторых аспектах, доза находится в диапазоне, в котором наблюдается корреляция (необязательно линейная зависимость) между количеством таких клеток (например, общим количеством CAR+ Т-клеток или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток) и одним или несколькими исходами, свидетельствующими о терапевтическом ответе или его продолжительности (например, вероятности достижения ремиссии, полной ремиссии и/или конкретной продолжительности ремиссии) и/или продолжительности любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую CD8+ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4+ CAR-экспрессирующие Т-клетки, в соответствии с дозой в любом из вышеупомянутых вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения, если у субъекта имеется фолликулярная лимфома (FL) степени 1-3А. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения при наличии ПЭТ-положительного заболевания с по меньшей мере одним ПЭТ-положительным поражением и по меньшей мере одним поддающимся измерению узловым или экстранодальным поражением в двух перпендикулярных измерениях. В некоторых вариантах осуществления, узловые поражения более 1,5 см по длинной оси. В некоторых вариантах осуществления, экстранодальные поражения имеют размер $>1,0$ см по длинной и короткой оси. В некоторых вариантах осуществления, FL демонстрирует или ассоциирована с опухолевыми фолликулами, которые демонстрируют ослабленные зоны мантии, потерю поляризации и/или отсутствие ощутимых макрофагов тела. В некоторых вариантах осуществления, FL ассоциирована со смесью centroцитов и centroбластов. В некоторых вариантах осуществления, FL не связана с centroцитами.

В некоторых вариантах осуществления, FL включает лимфатические узлы и/или селезенку, костный мозг, периферическую кровь и другие экстранодальные участки. В некоторых вариантах осуществления, FL включает лимфатические узлы. В некоторых аспектах, типовые признаки, связанные с FL, включают описанные в Choi et al. (2018) Arch Pathol Lab Med 142:1330-1340; Luminari et al., (2012) Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 34:54-59 и Salles (2007) ASH Education Book, 2007:216-25. В некоторых аспектах, в случае FL, типовые параметры, используемые для оценки степени бремени заболевания, включают такие параметры, как уровни гемоглобина (например, <12 г/дл или <10 г/дл), скорость оседания эритроцитов (СОЭ), уровень лактатдегидрогеназы (LDH) и уровень $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2M$), генная экспрессия, однонуклеотидные полиморфизмы (SNP; например, в IL-8, IL-2, IL-12B и IL1RN), экспрессия мРНК и экспрессия белка (например,

CD68, STAT1, FOXP3, CD57). (Salles (2007) ASH Education Book, 2007:216-25). В случае FL, степень или тяжесть заболевания можно оценить по системе стадирования Анн Арбор, опухолевой массе, массивной лимфаденопатии, количеству узловых или экстранодальных очагов заболевания и/или поражению костного мозга.

В некоторых вариантах осуществления, FL представляет собой степень 1. В некоторых вариантах осуществления, FL степени 1 демонстрирует или ассоциируется с более чем 5 центробластами в поле зрения при высоком увеличении (HPF). В некоторых вариантах осуществления, FL представляет собой степень 2. В некоторых вариантах осуществления, FL степени 2 демонстрирует или ассоциируется с более чем 6 и менее чем 15 центробластами в поле зрения при высоком увеличении (HPF). В некоторых вариантах осуществления, FL представляет собой степень 3А. В некоторых вариантах осуществления, FL степени 3А демонстрирует или ассоциируется с более чем 15 центробластами в поле зрения при высоком увеличении (HPF). В некоторых вариантах осуществления, FL связан с коэкспрессией CD10, BCL6 и BCL2 в фолликулах. В некоторых вариантах осуществления, FL связан с или характеризуется реаранжировками t(14;18)/IGH-BCL2 и/или BCL6. В некоторых вариантах осуществления, FL ассоциирован с транслокацией t(14;18)(q32;q21). В некоторых аспектах, транслокация t(14;18)(q32;q21) ставит экспрессию BCL2 под контроль энхансера тяжелого локуса иммуноглобулина (Ig) (IGH). В некоторых аспектах, t(14;18) выявляется примерно в 90% FL 1 и 2 степени и от 60 до 70% FL степени 3.

В связи с неоднородностью клинического курса больных FL, одной из задач лечения FL является выявление пациентов с высоким риском, нуждающихся в альтернативных вариантах лечения. Было выявлено несколько факторов пациента, которые ассоциированы с заболеванием повышенного риска. После первоначального лечения пациентов с впервые выявленным диагнозом химиоиммунотерапевтической схемой, такой как R-CHOP, примерно у 25% пациентов наступает прогресс в течение 24 месяцев (Casulo et al. Blood. 2015;125(1):40-7). У пациентов с прогрессированием заболевания в течение 24 месяцев (POD24), 5-летняя общая выживаемость (OS) составляет 50%, тогда как у пациентов без POD24, 5-летняя OS составляет 90%. POD24 является важным прогностическим фактором выживания (Casulo, Br J Haematol. 2019;186(4):513-23). Дополнительные 2L популяции с неудовлетворенной потребностью включают пациентов, которые невосприимчивы к некоторым основным методам лечения FL, т.е. анти-CD20 антителам и/или алкилирующим агентам. Пациенты с особенно высоким риском включают тех, которые имеют двойную невосприимчивость как к анти-CD20 антителу, так и к алкилирующему агенту. Поскольку терапия на основе ритуксимаба является стандартом лечения, у пациентов с невосприимчивостью к или имеющих рецидив заболевания на ранней стадии после анти-CD20 терапии, исходы неблагоприятные. Время до прогрессирования и предшествующая терапия (например, комбинированная терапия, HSCT) также являются элементами, определяющими риск неэффективности лечения при FL. Предложенные способы включают лечение субъектов,

которые относятся к группе высокого риска. В некоторых вариантах осуществления представленных способов, группы высокого риска пациентов с индолентной FL степени 1-3A в 2L и последующих линиях терапии включают POD24, не поддающиеся лечению ритуксимабом и популяции с двойной невосприимчивостью.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной или нескольких других предшествующих терапий, таких как по меньшей мере две предшествующие терапии по меньшей мере три предшествующие терапии или по меньшей мере четыре предшествующие терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной или нескольких других предшествующих терапий, таких как одна предшествующая терапия, две предшествующие терапии, три предшествующие терапии или четыре предшествующие терапии. Соображения и показания для лечения рецидивирующего/не поддающегося лечению (r/r) или прогрессирующего заболевания включают, среди прочих факторов, модифицированные критерии Группы исследований фолликулярных лимфом (GELF), которые включают: симптомы, связанные с FL (не ограничиваясь симптомами группы B); угрозу функции конечных органов; цитопению, вторичную по отношению к лимфоме; массивную лимфаденопатию (одиночное образование >7 см или 3 и несколько образований >3 см); спленомегалию; и устойчивое прогрессирование в течение по меньшей мере 6 месяцев (Национальная комплексная онкологическая сеть (NCCN) (NCCN, 2019).

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления, трансплантат представляет собой аллогенную или аутологичную HSCT.

В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него возник рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения по меньшей мере одной предшествующей линии терапии, которая представляет собой химиоиммунотерапевтическую комбинированную терапию для лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления, химиоиммунотерапевтическая комбинированная терапия независимо выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K, например, где ингибитор PI3K представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб. В некоторых вариантах осуществления, предшествующая линия терапии представляет собой химиоиммунотерапевтическую комбинированную терапию, включающую анти-CD20 моноклональное антитело и алкилирующий агент.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии для лечения заболевания, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной

предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения заболевания, где одна предшествующая линия терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после по меньшей мере двух предшествующих линий терапии для лечения заболевания, где по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после двух предшествующих линий терапии для лечения заболевания, где по меньшей мере одна из двух предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после по меньшей мере трех предшествующих линий терапии для лечения заболевания, где по меньшей мере одна из по меньшей мере трех предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после трех предшествующих линий терапии для лечения заболевания, где по меньшей мере одна из трех предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 терапией и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 терапию и алкилирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 терапию и алкилирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к лечению или у него возник рецидив во время или в течение 6 месяцев после завершения лечения анти-CD20 терапией. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят поддерживающую терапию анти-CD20 антителом после завершения курса терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после 2 или нескольких линий терапии или в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после предшествующей линии терапии или в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии.

Примеры анти-CD20 антител в вышеупомянутых вариантах осуществления, могут включать, но не ограничены ими, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб (также

известный как GA101 или RO5072759), вельтузумаб, обинутузумаб, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), окаратузумаб (также известный как AME-133v или окаратузумаб) и Pro131921 (Genentech). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело содержит ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело содержит обинутузумаб. Типовые алкилирующие агенты в вышеупомянутых вариантах осуществления, включают, но не ограничены ими, циклофосфамид, декарбазин, мелфалан, ифосфамид, темозоломид и бендамустин. В некоторых вариантах осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза и после завершения предшествующей линии терапии, такой как химиоиммунотерапевтическая схема. После первоначального лечения пациентов с впервые выявленным диагнозом по химиоиммунотерапевтической схеме, такой как R-CHOP, примерно у 25% пациентов наступает прогрессирование в течение 24 месяцев (Casulo, 2015). У пациентов с прогрессированием заболевания в течение 24 месяцев (POD24), 5-летняя общая выживаемость (OS) составляет 50%, тогда как у пациентов без POD24, 5-летняя OS составляет 90%. POD24 является важным прогностическим фактором выживания (Casulo, Br J Haematol. 2019;186(4):513-23). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала лечения после завершения химиоиммунотерапевтической комбинированной терапии для лечения заболевания (POD24). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения химиоиммунотерапевтической комбинированной терапии для лечения заболевания (POD24).

В некоторых вариантах осуществления, когорту субъектов с FL лечат в соответствии с любым из способов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов, которые имеют рецидив или невосприимчивость к одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3A, где одна предшествующая линия терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов, имеющих (i) прогрессирующее заболевание в течение 24 месяцев с момента постановки диагноза FL (POD24), в течение 24 месяцев после начала одной предшествующей линии терапии (POD24) или и того, и другого, и (ii) получавших одну предшествующую линию терапии в течение шести месяцев после первоначального диагноза FL у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов, которые имеют одно или несколько из следующих: (i) симптомы, связанные с; (ii) угрозу функции конечных органов, цитопению, вторичную по отношению к лимфоме, или массивную лимфаденопатию; (iii) спленомегалию; и (iv) устойчивое

прогрессирование заболевания в течение по меньшей мере 6 месяцев. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов с рецидивом или невосприимчивостью к одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где одна предшествующая линия терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом; и (i) имеющих прогрессирующее заболевание в течение 24 месяцев после постановки диагноза FL (POD24), в течение 24 месяцев после начала одной предшествующей линии терапии (POD24) или и того, и другого, и получил одну предшествующую линию терапии в течение шести месяцев после первоначального диагноза FL у субъекта; или (ii) имеющих один или несколько симптомов, связанных с FL; угрозу функции конечных органов, цитопению, вторичную по отношению к лимфоме или массивной лимфаденопатии; спленомегалию; и устойчивое прогрессирование заболевания в течение не менее 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с FL, не ограничиваются симптомами В. В некоторых вариантах осуществления, массивная лимфаденопатия представляет собой одиночное образование >7 см или 3 или более образований >3 см.

В некоторых вариантах осуществления, когорту субъектов с FL лечат в соответствии с любым из способов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов с рецидивом или невосприимчивостью к двум предшествующим линиям терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где одна из двух предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов, которые (i) имеют рецидив или не поддающееся лечению заболевание в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии (например, первой предшествующей линии терапии или второй предшествующей линии терапии) и ранее получали комбинированные терапии; (ii) имеют рецидив после HSCT и/или (iii) соответствуют определению двойной невосприимчивости. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов (i), которые имеют рецидив или невосприимчивы к двум предшествующим линиям терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где одна из двух предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом; и (ii) которые имели рецидив или не поддающееся лечению заболевание в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии (например, первой предшествующей линии терапии или второй предшествующей линии терапии) и ранее получали комбинированную терапию; имеют рецидив после HSCT и/или соответствуют определению двойной невосприимчивости. В некоторых вариантах осуществления, монотерапия PI3Ki является предшествующей терапией. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет двойную невосприимчивость, если субъект (i) невосприимчив к системной линии терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент; (ii) имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения предшествующей линии системной терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент; и/или (iii) имеет рецидив во

время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом, проводимой после двух предшествующих линий или терапии, или в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20 антителом, проводимой после двух предшествующих линий или терапии.

В некоторых вариантах осуществления, когорту субъектов с FL лечат в соответствии с любым из способов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов с рецидивом или невосприимчивостью к трем или нескольким (например, трем) предшествующим линиям терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3A, где одна из трех или нескольких предшествующих линий терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления, HSCT представляет собой одну из трех или нескольких предшествующих линий терапии. В некоторых вариантах осуществления, когорта FL включает субъектов с двойной невосприимчивостью. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет двойную невосприимчивость, если субъект (i) невосприимчив к системной линии терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент; (ii) имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения предшествующей линии системной терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент; и/или (iii) имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом, проводимой после двух предшествующих линий или терапии, или в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20 антителом, проводимой после двух предшествующих линий или терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект не имеет FL степени 3B (FL3B). В некоторых вариантах осуществления, у субъекта нет признаков смешанной DLBCL и FL или трансформированной FL. В некоторых вариантах осуществления, субъект не имеет подкласса FL дуоденального типа согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

В. Лимфома маргинальной зоны (MZL)

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают лечение конкретной группы или подмножества субъектов с лимфомой маргинальной зоны (MZL). В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется рецидивирующая/не поддающаяся лечению MZL.

MZL представляет собой гетерогенное В-клеточное злокачественное новообразование, возникающее в результате трансформации В-клеток, которые созревают во вторичных лимфоидных фолликулах перед перемещением в маргинальные зоны лимфоидных тканей, ассоциированных со слизистой оболочкой (MALT), селезенку или лимфатические узлы. В некоторых вариантах осуществления, MZL демонстрирует или ассоциирована с лимфоцитами маргинальной зоны, характеризующимися гипермутированными генами IgV. В некоторых вариантах осуществления, лимфоциты маргинальной зоны демонстрируют или ассоциированы с ran-B+; CD5-/++; CD10-; CD23-;

CD11c+/-; cyIg+(40% клеток), sIgM+ яркая; sIgD-иммунофенотип.

Описаны три подтипа: экстранодальная MZL (ENMZL, в основном желудочная), селезеночная MZL (SMZL) и узловая MZL (NMZL). В некоторых аспектах, субъект имеет экстранодальную MZL. В некоторых аспектах, экстранодальная MZL может быть обнаружена в MALT желудочно-кишечного тракта, щитовидной железы, молочной железы, легких, селезенки и/или других участках MALT. В некоторых вариантах осуществления, в желудке может быть обнаружена экстранодальная MZL. В некоторых аспектах, экстранодальная MZL демонстрирует или ассоциирована со слиянием транслокации t(11:18)(q21;q21)/API2/MLT. В некоторых аспектах, экстранодальная MZL демонстрирует или ассоциирована со слиянием транслокации t(14:18)(q32;q21)/IgH/MLT1. В некоторых аспектах, экстранодальная MZL демонстрирует или ассоциирована со слиянием t(3:14)/IgH/FOXP1. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет MZL селезенки, при этом заболевание первоначально выявляют только в селезенке, костном мозге и/или крови. В некоторых вариантах осуществления, MZL селезенки демонстрирует или ассоциирован с ассоциированными со спленоомегалией циркулирующими ворсинчатыми лимфоцитами. В некоторых аспектах, MZL селезенки демонстрирует или ассоциирован с делециями 7q. В некоторых аспектах, делеция охватывает область от 7q32.1 до 7q32-3. В некоторых аспектах, MZL селезенки демонстрирует или ассоциирована с транслокациями 7q. В некоторых аспектах, транслокация сосредоточена вокруг области 7q22-q32. В некоторых аспектах, MZL селезенки демонстрирует или ассоциирована с трисомией 3. В некоторых аспектах, MZL селезенки демонстрирует или ассоциирована с трисомией 12. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет узловую MZL, где лимфома сначала ограничена лимфатическими узлами, костным мозгом и/или кровью (Swerdlow et al., (2016) Blood, 30:84-91).

В конкретных аспектах способ, представленный в настоящем документе, включает введение субъекту дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток, где каждая доза Т-клеток содержит химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19. Такие CAR-Т-клетки и способы их получения описаны в разделе II.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы включают введение от точно или примерно $2,5 \times 10^7$ до точно или примерно $1,5 \times 10^8$, например, от примерно 5×10^7 до точно или примерно 1×10^8 рекомбинантных Т-клеток, экспрессирующих рецептор (например, CAR+ Т-клеток), например, дозы Т-клеток, включая CD4+ и CD8+ Т-клетки, вводимой в определенном соотношении, как описано в настоящем документе, например, в соотношении точно или примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,1 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7

CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,0 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 9×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 8×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 7×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит дозу от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно 6×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеток содержит соотношение приблизительно 1:1 CD4+ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR-экспрессирующим Т-клеткам. В конкретных вариантах осуществления, вводимая доза представляет собой точное, или базовое, или фиксированное количество CAR+ Т-клеток, или точное, или фиксированное, или фиксированное количество конкретного типа CAR+ Т-клеток, таких как CD4+CAR+ Т-клетки и/или CD8+CAR+ Т-клетки, и/или количеством любых из таких клеток, которое находится в пределах заданной степени отклонения, например, не более, + или - (плюс или минус, в некоторых случаях обозначается как $\pm$), 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15% по сравнению с таким точным, базовым или фиксированным количеством. В некоторых вариантах осуществления, такое базовое или фиксированное количество клеток составляет примерно $2,5 \times 10^7$ всего CAR+ Т-клеток или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток, 5×10^7 всего CAR+ Т-клеток или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток, или 1×10^8 всего CAR+ Т-клеток, или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество клеток в дозе включает или состоит из или по существу состоит из $2,5 \times 10^7$ CAR+ Т-клеток, например $1,25 \times 10^7$ CD4+CAR+ Т-клеток и $1,25 \times 10^7$ CD8+CAR+ Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, доза включает или состоит из или по существу состоит из 5×10^7 CAR+ Т-клеток, например, $2,5 \times 10^7$ CD4+CAR+ Т-клеток и $2,5 \times 10^7$ CD8+CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза включает или состоит из или по существу состоит из 1×10^8 CAR+ Т-клеток, например, $0,5 \times 10^8$ CD4+CAR+ Т-клеток и $0,5 \times 10^8$ CD8+CAR+ Т-клеток. В некоторых аспектах, количество вводимых клеток находится в пределах определенной степени отклонения от таких чисел в вышеупомянутых вариантах осуществления, например, в пределах плюс или минус ($\pm$) 5, 6, 7, 8, 9 или 10%, например, в пределах плюс или минус 8% по сравнению с таким(и) количеством(ами) клеток. В некоторых аспектах, доза находится в диапазоне, в котором наблюдается корреляция (необязательно линейная зависимость) между количеством таких клеток (например, общим количеством CAR+ Т-клеток или CD8+ и/или CD4+ CAR+ Т-клеток) и одним или несколькими исходами, свидетельствующими о терапевтическом ответе или его продолжительности (например, вероятностью достижения ремиссии, полной ремиссией и/или конкретной

продолжительностью ремиссии) и/или продолжительности любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций содержит первую композицию, содержащую CD8+ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4+ CAR-экспрессирующие Т-клетки, в соответствии с дозой в любом из вышеупомянутых вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения, если субъект имеет MZL. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения при наличии гистологически подтвержденного заболевания. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения при наличии заболевания, подтвержденного КТ. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения, если имеется заболевание, подтвержденное ПЭТ. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения при наличии ПЭТ не avidного заболевания. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбран для лечения, если субъект имеет по меньшей мере одно поддающееся измерению узловое поражение размером более 2,0 см по длинной оси. В некоторых вариантах осуществления, у пациента имеется по меньшей мере одно поддающееся измерению узловое поражение. В некоторых вариантах осуществления, у пациента имеется по меньшей мере одно поддающееся измерению экстранодальное поражение.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере двух предшествующих линий терапии для лечения MZL. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после двух предшествующих линий терапии для лечения MZL. Предшествующая(ие) линия(и) терапии может включать любую терапию, которая используется для лечения MZL. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько предшествующих линий терапии выбраны из лечения CD20-таргетной терапией (например, анти-CD20 антителом, таким как ритуксимаб или обинутумаб), ибрутинибом или трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых случаях HSCT является аллогенной. В некоторых случаях HSCT является аутологичной.

В конкретных вариантах осуществления, субъект ранее получал курс терапии, представляющий собой комбинированную химиоиммунотерапевтическую терапию, которая включает CD20-таргетную терапию (например, анти-CD20 антитело). В некоторых вариантах осуществления, комбинация представляет собой комбинированную системную терапию. Среди субъектов, получающих лечение, есть субъекты, у которых рецидив или невосприимчивость к лечению комбинированной системной терапией для лечения MZL. В некоторых вариантах осуществления, комбинированная системная терапия включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой моноклональное антитело. В

некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD20 антитело представляет собой обинутузумаб. Примеры алкилирующих агентов включают, но не ограничены ими, циклофосфамид, хлорамбуцил, декарбазин, мелфалан, ифосфамид, темозоломид и бендамустин. В некоторых вариантах осуществления, алкилирующий агент представляет собой бендамустин. В некоторых вариантах осуществления, алкилирующий агент представляет собой хлорамбуцил. В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили ритуксимабом и бендамустином. В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили ритуксимабом и хлорамбуцилом. В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили обинутузумабом и бендамустином. В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили обинутузумабом и хлорамбуцилом.

В некоторых вариантах осуществления, предшествующей линией терапии является ритуксимаб плюс циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизолон (R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению ритуксимабом в сочетании с циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном (R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению леналидомидом и ритуксимабом.

В некоторых вариантах осуществления, предшествующей терапией является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив или невосприимчивость к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил аллогенную HSCT, и у него возник рецидив или он невосприимчив к ней. В некоторых вариантах осуществления, субъект ранее получил аутологичную HSCT, и у него возник рецидив или он невосприимчив к ней.

В некоторых вариантах осуществления, когорту субъектов MZL лечат в соответствии с любым из способов, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, когорты MZL включает субъектов с рецидивом или невосприимчивостью к двум предшествующим линиям терапии для лечения MZL, где по меньшей мере одна линия предшествующей терапии представляла собой комбинированную системную терапию, терапию анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом или HSCT. В некоторых вариантах осуществления, субъекта имеет рецидив после HSCT. В некоторых вариантах осуществления, MZL представляет собой MZL селезенки, и одной из двух предшествующих линий терапии является спленэктомия. В некоторых вариантах осуществления, MZL является экстранодальной MZL, и антибиотики не являются одной из двух предшествующих линий терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет MZL селезенки, и по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих терапий представляет собой спленэктомию. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет MZL селезенки, и по меньшей мере одна из двух предшествующих терапий представляет собой спленэктомию. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет экстранодальную

MZL (ENMZL), и антибиотик не является одной из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет экстранодальную MZL (ENMZL), и антибиотик не является одной из двух предшествующих линий терапии.

С. Ответ, эффективность и выживание

В некоторых вариантах осуществления, введение в соответствии с предложенными способами эффективно лечит субъекта, несмотря на то, что субъект стал резистентным к другой терапии. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полной ремиссии (CR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают объективного ответа (OR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или по меньшей мере примерно 50% субъектов, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 60% субъектов, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 70% субъектов, по меньшей мере или по меньшей мере примерно 80% субъектов или по меньшей мере или по меньшей мере примерно 90% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают CR и/или достигают объективного ответа (OR). В некоторых вариантах осуществления, критерии, оцениваемые для эффективного лечения, включают общую частоту ответа (ORR; также известную в некоторых случаях как объективную частоту ответа), полный ответ (CR; также известный в некоторых случаях как полная ремиссия), продолжительность ответа (DOR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и/или общую выживаемость (OS).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% субъектов, получавших лечение в соответствии со способами, представленными в настоящем документе, достигают полной ремиссии (CR; также известной в некоторых случаях как полный ответ), демонстрируют выживаемость без прогрессирования (PFS) и/или общую выживаемость (OS) в течение более точно или примерно 3 месяцев, 6 месяцев или 12 месяцев или более 13 месяцев или приблизительно 14 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, в среднем, субъекты, получавшие лечение в соответствии с данным способом, демонстрируют медиану PFS или OS более чем точно или примерно 6 месяцев, 12 месяцев или 18 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет PFS или OS после терапии в течение по меньшей мере точно или примерно 6, 12, 18 или более месяцев или дольше.

В некоторых вариантах осуществления, субъекты, получающие лечение в соответствии с предложенными способами, демонстрируют CRR по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах осуществления, доля пациентов с полным объективным

ответом (CRR) рассчитывается как доля субъектов с лучшим общим ответом (BOR) до 12 месяцев, до 18 месяцев, до 24 месяцев, до 36 месяцев или дольше.

В некоторых аспектах, частота ответов у субъектов, таких как субъекты с NHL, основана на критериях Лугано. (Cheson et al., Blood. 2016;128(21):2489-96.). В некоторых аспектах, для оценки ответа используют любой из клинических, гематологических и/или молекулярных способов. В некоторых аспектах, ответ, оцениваемый с использованием критериев Лугано, включает использование позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ)-компьютерной томографии (КТ) и/или КТ в зависимости от ситуации. Оценки ПЭТ-КТ могут дополнительно включать использование фтордезоксиглюкозы (FDG) для FDG-авидных лимфом. В некоторых аспектах, когда ПЭТ-КТ будет использоваться для оценки ответа в FDG-авидных гистологиях, может использоваться 5-балльная шкала. В некоторых отношениях, 5-балльная шкала включает следующие критерии: 1, нет поглощения выше фона; 2, поглощение $\leq$ средостения; 3, поглощение $>$ средостения, но $\leq$ печени; 4, поглощение умеренно $>$ печени; 5, поглощение заметно выше, чем в печени и/или новых поражениях; X, новые области поглощения вряд ли связаны с лимфомой.

В некоторых аспектах, полный ответ, описанный с использованием критериев Лугано, включает полный метаболический ответ и полный радиологический ответ в различных измеряемых очагах. В некоторых аспектах, эти очаги включают лимфатические узлы и внелимфатические узлы, где CR описывается как оценка 1, 2 или 3 с или без остаточной массой по 5-балльной шкале при использовании ПЭТ-КТ. В некоторых аспектах, экстранодальные очаги с высоким физиологическим поглощением или с активацией в селезенке или костном мозге (например, с химиотерапией или миелоидными колониестимулирующими факторами), поглощение может быть больше, чем в нормальном средостении и/или печени. В этом случае можно сделать вывод о полном метаболическом ответе, если поглощение в очагах начального поражения не больше, чем в окружающих нормальных тканях, даже если ткань имеет высокое физиологическое поглощение.

В некоторых аспектах, ответ оценивают в лимфатических узлах с помощью КТ, где CR описывается как отсутствие внелимфатических очагов заболевания, и узлы/узловые образования-мишени должны регрессировать до $\leq 1,5$ см в наибольшем поперечном диаметре поражения (LDi). Дополнительные очаги оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать на отсутствие признаков FDG-авидного заболевания в костном мозге, и оценка на основе КТ должна указывать на нормальную морфологию. Другие очаги могут включать оценку увеличения органа, которое должно регрессировать до нормы. В некоторых аспектах, оцениваются неизмеряемые поражения и новые поражения, которые в случае CR должны отсутствовать (Chesson et al., Blood. 2016 Nov 24;128(21):2489-96).

В некоторых аспектах, частичный ответ (PR; также известный в некоторых случаях как частичная ремиссия), описанный с использованием критериев Лугано, включает частичный метаболический и/или радиологический ответ в различных измеряемых очагах.

В некоторых аспектах, эти очаги включают лимфатические узлы и экстралимфатические очаги, где PR описывается как оценка 4 или 5 со сниженным поглощением по сравнению с исходным уровнем и остаточной(ыми) массой(ами) любого размера при использовании ПЭТ-КТ. В середине, такие результаты могут указывать на отвечающее заболевание. В конце лечения, такие результаты могут свидетельствовать об остаточной болезни.

В некоторых аспектах, ответ оценивают в лимфатических узлах с помощью КТ, где PR описывается как $\geq 50\%$ снижение SPD до 6 измеримых узлов-мишеней и экстранодальных очагов. Если поражение слишком маленькое для измерения на КТ, в качестве значения по умолчанию назначается 5 мм x 5 мм; если поражение больше не видно, значение равно 0 мм x 0 мм; для узла > 5 мм x 5 мм, но меньшего, чем обычно, для расчета используются фактические измерения. Другие очаги оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна показать остаточное поглощение выше, чем поглощение в нормальном костном мозге, но сниженное по сравнению с исходным уровнем (допускается диффузное поглощение, совместимое с реактивными изменениями после химиотерапии). В некоторых аспектах, если имеются стойкие фокальные изменения в костном мозге в контексте узлового ответа, следует рассмотреть вопрос о дальнейшей оценке с помощью МРТ или биопсии, или интервального сканирования. В некоторых аспектах, дополнительные очаги могут включать оценку увеличения органа, где длина селезенки должна регрессировать более чем на 50% по сравнению с нормой. В некоторых аспектах, оцениваются неизмеряемые поражения и новые поражения, которые в случае PR должны отсутствовать/быть нормальными, регрессировать, но не увеличиваться. Отсутствие ответа/стабильное заболевание (SD) или прогрессирующее заболевание (PD) также можно измерить с помощью оценок на основе ПЭТ-КТ и/или КТ. (Chessen et al., Blood. 2016 Nov 24;128(21):2489-96).

В некоторых отношениях выживаемость без прогрессирования (PFS) описывается как период времени во время и после лечения заболевания, такого как рак, когда субъект живет с заболеванием, но не ухудшается. В некоторых аспектах, объективный ответ (OR) описывается как измеримый ответ. В некоторых аспектах, частота объективного ответа (ORR; также известная в некоторых случаях как общая частота ответа) описывается как доля пациентов, достигших CR или PR. В некоторых аспектах, общая выживаемость (OS) описывается как промежуток времени либо с даты постановки диагноза, либо с начала лечения заболевания, такого как рак, в течение которого субъекты, у которых диагностировано заболевание, все еще живы. В некоторых аспектах, бессобытийная выживаемость (EFS) описывается как период времени после окончания лечения рака, в течение которого субъект остается свободным от определенных осложнений или явлений, которые лечение должно было предотвратить или отсрочить. Эти события могут включать возвращение рака или появление определенных симптомов, таких как боль в костях от рака, который распространился на кости, или смерть.

В некоторых вариантах осуществления, мера продолжительности ответа (DOR) включает время от регистрации ответа опухоли до прогрессирования заболевания. В

некоторых вариантах осуществления, параметр для оценки ответа может включать устойчивый ответ, например ответ, который сохраняется по прошествии определенного периода времени с начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, стойкий ответ определяется частотой ответов приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, ответ является устойчивым в течение более 3 месяцев или более 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления, способ снижает бремя заболевания или состояния, например, количество опухолевых клеток, размер опухоли, продолжительность выживания пациента или бессобытийная выживаемость, в большей степени и/или в течение большего периода времени, по сравнению со снижением, которое наблюдалось бы при использовании сравнимого способа с использованием альтернативной схемы дозирования, такой как схема, при которой субъект получает одно или несколько альтернативных терапевтических средств, и/или схема, при которой субъект не получает дозу клеток и/или противолимфомный агент в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. В некоторых аспектах, оценивают выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, наличие или продолжительность бессобытийной или бессимптомной выживаемости или безрецидивной выживаемости. В некоторых вариантах осуществления, оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, указана мера бремени заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, бессобытийная выживаемость или общая выживаемость субъекта улучшаются с помощью способов по сравнению с другими способами, например, способами, в которых субъект получает один или несколько альтернативных терапевтических агентов, и/или способами, в которых субъект не получает дозу клеток и/или противолимфомный агент в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. Например, в некоторых вариантах осуществления, бессобытийная выживаемость или вероятность для субъектов, пролеченных указанными способами, через 6 месяцев после введения дозы составляет более чем примерно 40%, более чем примерно 50%, более чем примерно 60%, более чем примерно 70%, больше примерно 80%, больше примерно 90% или больше примерно 95%. В некоторых аспектах, общая выживаемость составляет более чем примерно 40%, более чем примерно 50%, более чем примерно 60%, более чем примерно 70%, более чем примерно 80%, более чем примерно 90% или более чем примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления, субъект, получающий лечение указанными способами, демонстрирует бессобытийную выживаемость, безрецидивную выживаемость или выживаемость по меньшей мере до 6 месяцев или по меньшей мере до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления, время до прогрессирования улучшается, например, время до прогрессирования составляет более чем точно или примерно 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

В некоторых вариантах осуществления, после лечения данным способом,

вероятность рецидива снижается по сравнению с другими способами, например, способами, при которых субъект получает один или несколько альтернативных терапевтических агентов, и/или способом, при котором субъект не получает дозу клеток и/или противолимфомный агент в соответствии с предложенными способами и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. Например, в некоторых вариантах осуществления, вероятность рецидива через 6 месяцев после первой дозы составляет менее примерно 80%, менее примерно 70%, менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20% или менее примерно 10%.

В некоторых случаях, определяют фармакокинетику вводимых клеток, например адоптивно перенесенных клеток, для оценки доступности, например биодоступности вводимых клеток. Способы определения фармакокинетики адоптивно перенесенных клеток могут включать забор периферической крови у субъектов, которым вводили сконструированные клетки, и определение количества или доли сконструированных клеток в периферической крови. Подходы к отбору и/или выделению клеток могут включать использование антител, специфичных к химерному антигенному рецептору (CAR) (например, Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): 177ra38) белка L (Zheng et al., *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29), эпитопных меток, таких как последовательности Strep-Tag, вводимых непосредственно в определенные сайты в CAR, где связывающие реагенты для Strep-Tag используют для непосредственной оценки CAR (Liu et al. (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; публикация международной заявки на патент № WO 2015095895), и моноклональных антител, которые специфически связываются с полипептидом CAR (см. публикацию международной заявки на патент № WO 2014190273). Внешние маркерные гены в некоторых случаях могут быть использованы в связи со сконструированной клеточной терапией, чтобы обеспечить обнаружение или селекцию клеток, и в некоторых случаях, также способствовать самоуничтожению клеток. Усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt) в некоторых случаях может коэкспрессироваться с представляющим интерес трансгеном (CAR или TCR) в трансдуцированных клетках (см., например, патент США № 8,802,374). EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbix®), или другим терапевтическим анти-EGFR антителом, или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, сконструированных с помощью конструкции EGFRt и другого рекомбинантного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR) и/или для элиминации или разделения клеток, экспрессирующих рецептор. См. патент США № 8,802,374 и Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434).

В некоторых вариантах осуществления, количество CAR⁺ Т-клеток в биологическом образце, полученном от пациента, например, в крови, можно определить через некоторое время после введения клеточной терапии, например, для определения фармакокинетики клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество CAR⁺ Т-

клеток, необязательно CAR⁺ CD8⁺ Т-клеток и/или CAR⁺ CD4⁺ Т-клеток, обнаруживаемых в крови субъекта или у большинства субъектов, получавших лечение таким способом, составляет более 1 клетка на мкл, более 5 клеток на мкл или более 10 клеток на мкл. В некоторых вариантах осуществления, количество CAR⁺ Т-клеток в биологическом образце, полученном от пациента, например крови, можно определить с помощью ПЦР для трансгена CAR.

D. Токсичность

В некоторых вариантах осуществления, у субъектов, получающих лечение в соответствии с любым из предложенных способов, оценивают один или несколько признаков или симптомов токсичности, которые могут быть связаны с введенными клетками. Введение адоптивной Т-клеточной терапии, такой как лечение Т-клетками, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы, может вызывать токсические эффекты или исходы, такие как синдром высвобождения цитокинов и нейротоксичность. В некоторых примерах, такие эффекты или исходы параллельны высоким уровням циркулирующих цитокинов, которые могут лежать в основе наблюдаемой токсичности.

В некоторых аспектах, токсический исход представляет собой или связан с или указывает на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелый CRS (sCRS). CRS, например, sCRS, может возникать в некоторых случаях после адоптивной Т-клеточной терапии и введения субъектам других биологических продуктов. См. Davila et al., *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013).

Как правило, CRS вызывается преувеличенным системным иммунным ответом, опосредованным, например, Т-клетками, В-клетками, NK-клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут высвобождать большое количество медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут вызывать острый воспалительный ответ и/или индуцировать повреждение эндотелия органов, что может привести к микроваскулярной утечке, сердечной недостаточности или смерти. Тяжелый, опасный для жизни CRS может привести к легочной инфильтрации и повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови. Другие тяжелые, опасные для жизни токсические эффекты могут включать сердечную токсичность, респираторный дистресс, неврологическую токсичность и/или печеночную недостаточность. В некоторых аспектах, лихорадка, особенно высокая лихорадка ($\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ или $\geq 101,3^{\circ}\text{F}$), связана с CRS или его риском. В некоторых случаях, признаки или симптомы CRS имитируют инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, инфекция также рассматривается у субъектов с симптомами CRS, и можно проводить мониторинг с помощью посевов и проводить эмпирическую терапию антибиотиками. Другие симптомы, связанные с CRS, могут включать сердечную дисфункцию, респираторный дистресс-синдром взрослых, почечную и/или печеночную недостаточность, коагулопатии, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и синдром капиллярной утечки.

CRS можно лечить с помощью противовоспалительной терапии, такой как анти-IL-

6 терапия, например, анти-IL-6 антитело, например, тоцилизумаб, или антибиотики или другие агенты, как описано. Исходы, признаки и симптомы CRS известны и включают описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, если конкретное введение влияет или не влияет на данный исход, признак или симптом, связанный с CRS, могут быть указаны конкретные исходы, признаки и симптомы и/или их количество или степень.

В контексте введения клеток, экспрессирующих CAR, CRS обычно возникает в течение двух недель после инфузии клеток, экспрессирующих CAR. См. Abramson et al., *J Clin Onc.* 2018;36(15_suppl):7505. В некоторых случаях, CRS возникает менее чем через 3 дня или более чем через 21 день после инфузии CAR T-клеток. Частота и сроки развития CRS могут быть связаны с исходным уровнем цитокинов или опухолевой массой во время инфузии. Обычно CRS включает повышенные сывороточные уровни интерферона (IFN)- γ , фактора некроза опухоли (TNF)- α и/или интерлейкина (IL)-2. Другими цитокинами, которые могут быстро индуцироваться при CRS, являются IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10.

Типовые исходы, связанные с CRS, включают лихорадку, дрожь, озноб, гипотензию, одышку, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), энцефалопатию, повышение активности ALT/AST, почечную недостаточность, сердечные нарушения, гипоксию, неврологические нарушения и смерть. Неврологические осложнения включают делирий, судорожную активность, спутанность сознания, трудности с подбором слов, афазию и/или притупление сознания. Другие исходы, связанные с CRS, включают утомляемость, тошноту, головную боль, судороги, тахикардию, миалгии, сыпь, синдром острой сосудистой утечки, нарушение функции печени и почечную недостаточность. В некоторых аспектах, CRS связан с увеличением одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногенемией или гепатоспленомегалией. Другие типовые признаки или симптомы, связанные с CRS, включают гемодинамическую нестабильность, фебрильную нейтропению, повышение уровня С-реактивного белка (CRP) в сыворотке крови, изменения параметров свертывания крови (например, международного нормализованного отношения (INR), протромбинового времени (PTI) и/или фибриногена), изменения функции сердца и других органов и/или абсолютного количества нейтрофилов (ANC).

В некоторых вариантах осуществления, исходы, связанные с CRS, включают одно или несколько из: постоянной лихорадки, например, лихорадки определенной температуры, например, выше точно или примерно 38 градусов Цельсия, в течение двух или более, например, трех или более, например, четырех или более дней или не менее трех дней подряд; лихорадки выше точно или примерно 38 градусов Цельсия; повышения уровня цитокинов, такого как максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере точно или примерно 75, по сравнению с уровнями по меньшей мере двух цитокинов до лечения (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из гамма-интерферона (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли

альфа (TNF α)), или максимального кратного изменения, например, по меньшей мере точно или примерно 250, по меньшей мере для одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере одного клинического признака токсичности, такого как гипотензия (например, измеренная по меньшей мере одним внутривенным вазоактивным прессором); гипоксии (например, уровня кислорода (PO $_2$) в плазме ниже или примерно 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, притупление чувствительности и судороги). В некоторых вариантах осуществления, одновременно с CRS может наблюдаться нейротоксичность (NT).

Типовые исходы, связанные с CRS, включают повышенные или высокие уровни в сыворотке одного или нескольких факторов, включая цитокины и хемокины, и другие факторы, связанные с CRS. Типовые исходы дополнительно включают увеличение синтеза или секреции одного или нескольких таких факторов. Такой синтез или секреция может осуществляться Т-клеткой или клеткой, взаимодействующей с Т-клеткой, такой как врожденная иммунная клетка или В-клетка.

Были разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS для прогнозирования того, какие пациенты с большей вероятностью будут подвержены риску развития sCRS (см. Davilla et al. Science Translational Medicine. 2014; 6(224):224ra25; Abramson et al., J Clin Onc. 2018;36(15_suppl):7505). Факторы включают лихорадку, гипоксию, гипотензию, неврологические изменения, повышенные уровни в сыворотке воспалительных цитокинов, таких как набор из семи цитокинов (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и GM-CSF), вызванное лечением повышение которых может хорошо коррелировать как с опухолевой массой до лечения, так и с симптомами sCRS. В некоторых вариантах осуществления, критерии, отражающие степень CRS, подробно описаны в **Таблице 2** ниже.

Таблица 2. Критерии градации синдрома выброса цитокинов					
	Симптомы/ признаки	Синдром выделения цитокинов (CRS) 1 степени (легкий)	CRS 2 степени (умеренный)	CRS 3 степени (тяжелый)	CRS 4 степени (опасный для жизни)
			Степень CRS определяется наиболее тяжелым симптомом (исключая лихорадку)		
Жизненно важные	Температура $\geq 38,5^{\circ}\text{C}/101,3^{\circ}\text{F}$	Да	Любой	Любой	Любой

Таблица 2. Критерии градации синдрома выброса цитокинов					
признаки	Симптомы/ признаки	Синдром выделения цитокинов (CRS) 1 степени (легкий)	CRS 2 степени (умеренный)	CRS 3 степени (тяжелый)	CRS 4 степени (опасный для жизни)
	Степень CRS определяется наиболее тяжелым симптомом (исключая лихорадку)				
	Систолическое артериальное давление (SBP) ≤ 90 мм рт.ст.	Н/Д	Отвечает на внутривенное (в/в) введение жидкостей или одну низкую дозу вазопрессора	Нужна высокая доза или несколько вазопрессоров	Опасно для жизни
	Потребность в кислороде для достижения насыщения кислородом (SaO ₂) >90%	Н/Д	Доля вдыхаемого кислорода (FiO ₂) <40%	FiO ₂ $\geq 40\%$	Нуждается в ИВЛ
Органная токсичность		Н/Д	2 степень	3 степень или трансаминат 4 степени	4 степень (исключая трансаминит)

В некоторых вариантах осуществления, терапия высокими дозами вазопрессоров включает лечение, описанное в **Таблице 3** ниже.

Таблица 3. Высокие дозы вазопрессоров (все дозы требуются в течение ≥ 3 часов)	
Вазопрессор	Доза
Монотерапия норэпинефрином	≥ 20 мкг/мин
Монотерапия дофамином	≥ 10 мкг/кг/мин
Монотерапия фенилэфрином	≥ 200 мкг/мин
Монотерапия эпинефрином	≥ 10 мкг/мин
Если на вазопрессине	Эквивалент вазопрессина+норэпинефрина (NE) ≥ 10

	мкг/мин ^a
Если на комбинированных вазопрессорах (не вазопрессин)	Эквивалент норэпинефрина ≥ 20 мкг/мин ^a
^a Уравнение эквивалента вазопрессора в испытании VASST: Эквивалентная доза норэпинефрина = [норэпинефрин (мкг/мин)] + [дофамин (мкг/кг/мин) ÷ 2] + [эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин) ÷ 10]	

В некоторых вариантах осуществления, токсический исход представляет собой тяжелый CRS. В некоторых вариантах осуществления, токсический исход представляет собой отсутствие тяжелого CRS (например, умеренный или легкий CRS).

В некоторых вариантах осуществления, можно измерить лихорадку и/или уровни С-реактивного белка (CRP). В некоторых вариантах осуществления, сывороточные факторы, связанные с CRS, или исходы, связанные с CRS, включают повышение уровня и/или концентрации воспалительных цитокинов и/или хемокинов, включая Flt-3L, фракталкин, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерлейкин-1 бета (IL-1 β), IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, гамма-интерферон (IFN- γ), воспалительный белок макрофагов (MIP)-1, MIP-1, sIL-2R α или фактор некроза опухоли альфа (TNF α). В некоторых вариантах осуществления, фактор или результат включает С-реактивный белок (CRP). В некоторых вариантах осуществления, субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, не имеют CRS. В некоторых вариантах осуществления, показатель CRS включает показатель CRP и другой фактор, указывающий на CRS.

В некоторых вариантах осуществления, исходы, связанные с тяжелым CRS или CRS 3 степени или выше, например 4 степени или выше, включают одно или несколько из: постоянной лихорадки, например, лихорадки определенной температуры, например, выше точно или примерно 38 градусов Цельсия, в течение двух или нескольких дней, например, трех или нескольких, например, четырех или нескольких дней или по меньшей мере трех дней подряд; лихорадка выше точно или примерно 38 градусов по Цельсию; повышение уровня цитокинов, такое как максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере точно или примерно 75, по сравнению с уровнями по меньшей мере двух цитокинов до лечения (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из гамма-интерферона (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF α)), или максимального кратного изменения, например, по меньшей мере в точно или примерно 250 по меньшей мере для одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере, одного клинического признака токсичности, такого как гипотензия (например, измеренная по меньшей мере, одним внутривенным вазоактивным прессором); гипоксия (например, уровень кислорода (PO₂) в плазме ниже или примерно 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменение психического состояния, притупление чувствительности и судороги). В некоторых вариантах осуществления, тяжелый CRS включает CRS, требующий лечения или ухода в

отделении интенсивной терапии (ICU).

В некоторых вариантах осуществления, CRS, такой как тяжелый CRS, включает комбинацию (1) персистирующей лихорадки (лихорадки по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех дней) и (2) уровня CRP в сыворотке, по меньшей мере, точно или примерно 20 мг/дл. В некоторых вариантах осуществления, CRS включает гипотензию, требующую применения двух или нескольких вазопрессоров, или дыхательную недостаточность, требующую искусственной вентиляции легких. В некоторых вариантах осуществления, дозу вазопрессоров увеличивают при втором или последующем введении.

В некоторых вариантах осуществления, тяжелая форма CRS или CRS 3 степени включает повышение активности аланинаминотрансферазы, повышение активности аспартатаминотрансферазы, озноб, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункцию левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или тремор. В некоторых вариантах осуществления, тяжелую форму CRS лечат дополнительными терапиями, истощающими Т-клетки, такими как циклофосфамид (Brudno et al., Blood. 2016; 127(26):3321-30).

Может быть указан метод измерения или обнаружения различных исходов.

В некоторых аспектах, токсический исход связан или связан с нейротоксичностью. В некоторых вариантах осуществления, симптомы, связанные с клиническим риском нейротоксичности, включают спутанность сознания, делирий, афазию, экспрессивную афазию, оглушение, миоклонус, летаргию, измененное психическое состояние, конвульсии, судорожную активность, судороги (необязательно, подтвержденные электроэнцефалограммой (ЭЭГ)), повышенные уровни бета-амилоида (A β), повышенные уровни глутамата и повышенные уровни кислородных радикалов. В некоторых вариантах осуществления, нейротоксичность оценивается в зависимости от степени тяжести (например, с использованием шкалы оценок 1-5 (см., например, Национальный институт рака - Общие критерии токсичности, версия 5.00 (NCI CTCAE, версия 5.0)).

В некоторых случаях, неврологические симптомы могут быть самыми ранними симптомами sCRS. В некоторых вариантах осуществления, неврологические симптомы появляются через 5-7 дней после инфузии клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, продолжительность неврологических изменений может составлять от 3 до 23 дней. В некоторых случаях восстановление неврологических изменений происходит после исчезновения других симптомов sCRS. В некоторых вариантах осуществления, лечение анти-IL-6 и/или стероидом(ами) не ускоряет время или степень разрешения неврологических изменений.

В некоторых вариантах осуществления, тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность степени 3 или выше, как указано в **Таблице 4**.

Таблица 4: Типовые критерии оценки нейротоксичности	
Оценка	Описание симптомов

1 Бессимптомная или легкая	Временный или легкий дискомфорт; отсутствие ограничений в деятельности; не требуется медицинского вмешательства/терапии
2 Умеренная	Наличие симптомов, которые ограничивают инструментальные действия по самообслуживанию (ADL), такие как приготовление пищи, покупка продуктов или одежды, использование телефона, управление деньгами
3 Тяжелая	Наличие симптомов, ограничивающих ADL самообслуживание, такое как купание, одевание и раздевание, самостоятельный прием пищи, пользование туалетом, прием лекарств
4 Опасная для жизни	Симптомы, угрожающие жизни и требующие срочного вмешательства
5 Фатальная	Смерть

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько вмешательств или агентов для лечения токсичности, таких как таргетизирующая токсичность терапия, вводят во время или сразу после того, как субъект определен или подтвержден (например, впервые определен или подтвержден) как демонстрирующий устойчивую лихорадку, например, при измерении в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько таргетизирующих токсичность терапий вводят в течение определенного периода времени после такого подтверждения или определения, например, в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов.

В некоторых вариантах осуществления, полученный ответ, наблюдаемый у субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций, связан с низким риском какой-либо токсичности или низким риском тяжелой токсичности у большинства леченных субъектов. В некоторых вариантах осуществления, более или более примерно 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80% или 90% или более субъектов, леченных в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, не проявляют какой-либо степени CRS или какой-либо степени нейротоксичности (NT). В некоторых вариантах осуществления, более или более примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более субъектов, леченных в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, не имеют тяжелый CRS или CRS степени 3 или выше. В некоторых вариантах осуществления, более или более примерно 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%

или более субъектов, леченных в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, не проявляют тяжелой нейротоксичности или нейротоксичности 3 степени или выше, например, нейротоксичности 4 или 5 степени.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере точно или примерно 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов, леченных в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, не проявляют раннего начала CRS или нейротоксичности и/или не проявляют начала CRS ранее, чем через 1 день, 2 дня, 3 дня или 4 дня после начала введения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере точно или примерно 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% субъектов, леченных в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, не проявляют нейротоксичность ранее, чем через 3 дня, 4 дня, 5 дней, шесть дней или 7 дней после начала введения. В некоторых аспектах, медиана начала нейротоксичности у субъектов, леченных в соответствии с предложенными способами и/или предложенными готовыми изделиями или композициями, находится на уровне или после среднего пика или среднего времени до разрешения CRS у субъектов, леченных в соответствии со способом. В некоторых случаях медиана начала нейротоксичности среди субъектов, леченных в соответствии со способом, больше, чем точно или примерно 8, 9, 10 или 11 дней.

II. КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ И СКОНСТРУИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия (*например*, Т-клеточная терапия) для применения в соответствии с предложенными способами комбинированной терапии включает введение сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (*например*, CAR), предназначенные для распознавания и/или специфического связывания с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, таким как г/г/FL степени 1-3A или г/г/MZL, включая такие заболевания или состояния, которые демонстрируют признаки высокого риска. В конкретных вариантах осуществления, антиген, который связывается или распознается рекомбинантным рецептором (*например*, CAR), представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, связывание с антигеном приводит к ответу, такому как иммунный ответ против такого антигена. В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат или сконструированы таким образом, чтобы содержать рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR). Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, обычно включает внеклеточный антиген (или лиганд), связывающий домен, специфичный к антигену, который связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах, посредством линкеров и/или трансмембранного(ых) домена(ов). В некоторых аспектах, сконструированные клетки предложены в виде фармацевтических композиций и составов, подходящих для введения субъектам, *например*, для адоптивной клеточной терапии. Также предложены терапевтические

способы введения клеток и композиций субъектам, *например*, пациентам.

В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляется путем первой стимуляции клеток, например, путем его комбинации со стимулом, вызывающим ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, *например*, измеряемый по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

А. Химерные антигенные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления предложенных способов и применений, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат один или несколько доменов, объединяющих лигандсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность в отношении желаемого антигена (например, опухолевого антигена) с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть активирующего внутриклеточного домена, такого как домен активации Т-клеток, обеспечивающий первичный сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен для облегчения эффекторных функций. При специфическом связывании с молекулой, например, антигеном, рецептор обычно доставляет в клетку иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-трансдуцированный сигнал, тем самым стимулируя иммунный ответ, таргетирующий заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, химерные рецепторы, будучи генетически модифицированными в иммунных клетках, могут модулировать активность Т-клеток и, в некоторых случаях, могут модулировать дифференциацию или гомеостаз Т-клеток, что приводит к получению генетически модифицированных клеток с улучшенной продолжительностью жизни, выживаемостью и/или жизнестойкостью *in vivo*, например, для использования в методах адоптивной клеточной терапии.

Примеры антигенных рецепторов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки включают описанные, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикации патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ ,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118, и заявке на европейский патент № EP2537416 и/или описанные Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012

October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах, антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США №: 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, описанные в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США № 7,446,190, патент США № 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; and Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177). См. также WO 2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США №: 7,446,190 и патент США №: 8,389,282.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), со специфичностью в отношении определенного антигена (или маркера, или лиганда), такого как антиген, экспрессируемый на поверхности определенного типа клетки. В некоторых вариантах осуществления, антиген, который таргетирует рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления, он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

Антигены, таргетируемые рецепторами, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, антиген, таргетируемый рецептором, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В конкретных аспектах, антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, любой из таких антигенов представляет собой антигены, экспрессируемые на В-клетках человека.

Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, который представляет собой антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой часть молекулы антитела, как правило, вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела, например, фрагмент scFv антитела. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb), такое как sdFv, нанотело, V_{HN} и V_{NAR} . В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельные области антитела, соединенные гибким линкером.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv или V_H домен) специфически распознает антиген, такой как

CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются производными или являются вариантом антител или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с CD19. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, которое связывает CD19, представляет собой антитело мыши, такое как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело человека, например, как описано в публикации патента США № US 2016/0152723.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен включает V_H и/или V_L , полученные из FMC63, которые в некоторых аспектах, могут представлять собой scFv. FMC63 обычно относится к моноклональному антителу IgG1 мыши, индуцированному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человека (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит CDR-H1 и CDR-H2, представленные в SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно, и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 40 или 54, и CDR-L1, представленные в SEQ ID NO: 35, и CDR-L2, представленные в SEQ ID NO: 36 или 55, и последовательности CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 37 или 56. В некоторых вариантах осуществления, антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:35, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:36 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:37 и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:38, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:39 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:40, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63, представленную в SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи FMC63, представленную в SEQ ID NO:42, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер представлен в SEQ ID NO:59. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv

кодируется последовательностью нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO:57, или последовательностью, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:57. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:43, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:43.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен включает V_H и/или V_L , полученные из SJ25C1, которые в некоторых аспектах, могут представлять собой scFv. SJ25C1 представляет собой моноклональное антитело IgG1 мыши, индуцированное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 происхождения человека (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 47-49, соответственно, и последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID. NOS: 44-46, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления, svFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 SEQ ID NO:44, последовательность CDR-L2 SEQ ID NO:45 и последовательность CDR-L3 SEQ ID NO:46 и/или или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 SEQ ID NO:47, последовательность CDR-H2 SEQ ID NO:48 и последовательность CDR-H3 SEQ ID NO:49, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи SJ25C1, представленную в SEQ ID NO:50, и переменную область легкой цепи SJ25C1, представленную в SEQ ID NO:51, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности. В некоторых вариантах осуществления, переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер представлен в SEQ ID NO:52. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит, по порядку V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:53, или последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO:53.

Термин «антитело» используется в настоящем документе в самом широком смысле

и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, $F(ab')_2$ фрагменты, Fab фрагменты, Fv фрагменты, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (*например*, sdAb, sdFv, нанотело, V_HH или V_{NAR}) или их фрагменты. Термин охватывает генетически сконструированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, *например*, биспецифические антитела, диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как включающий его функциональные фрагменты антител. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD. В некоторых аспектах, CAR представляет собой биспецифический CAR, например, содержащий два антигенсвязывающих домена с разными специфичностями.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, $F(ab')_2$, Fv или фрагмент одноцепочечного Fv (scFv)). В других вариантах осуществления, константная область тяжелой цепи антитела выбрана, *например*, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, *например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (*например*, IgG1 человека). В другом варианте осуществления, константная область легкой цепи антитела выбрана, *например*, из каппа или лямбда, в частности, каппа.

Известно, что термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», синонимичные терминам «гиперварибельная область» или «HVR», в некоторых случаях относятся к несмежным последовательностям аминокислот в переменных областях антител, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, имеется три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Известно, что «каркасные области» и «FR» в некоторых случаях относятся к не-CDR частям переменных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, имеется четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая

схемы, описанные Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации “Kabat”); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации “Chothia”); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745.” (схема нумерации “Contact”); Lefranc MP et al., “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации “IMGT”); Honegger A and Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации “Aho”); и Martin et al., “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (схема нумерации “AbM”).

Границы данного CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация как для схемы Kabat, так и для схемы Chothia, основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, где вставки обозначаются буквами вставки, например, «30a», и в некоторых антителах появляются делеции. В этих двух схемах определенные вставки и делеции («инделлы») размещаются в разных позициях, что приводит к дифференциальной нумерации. Схема Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом похожа на схему нумерации Chothia. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, основанный на схеме, используемой программным обеспечением для моделирования антител AbM компании Oxford Molecular.

В **Таблице 5** ниже перечислены типовые границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированные схемами Kabat, Chothia, AbM и Contact, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков приведена с использованием обеих схем нумерации Kabat и Chothia. FR расположены между CDR, например, с FR-L1, расположенным перед CDR-L1, FR-L2, расположенным между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3, расположенным между CDR-L2 и CDR-L3, и так далее. Следует отметить, что, поскольку показанная схема нумерации Kabat размещает вставки в H35A и H35B, конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием показанного соглашения о нумерации Kabat варьируется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 5. Границы CDR по разным схемам нумерации				
CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96

CDR-H1 (нумерация Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32...34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (нумерация Chothia ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1 - Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948

Таким образом, если не указано иное, «CDR» или «определяющая комплементарность область» или отдельные указанные CDR (*например*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такие как варибельная область, следует рассматривать как охватывающую (или конкретную) определяющую комплементарность область, как определено любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. Например, когда указано, что конкретная CDR (*например*, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной V_H или V_L области аминокислотной последовательности, подразумевается, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (*например*, CDR-H3) в пределах варибельной области, как определено любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления, указаны конкретные последовательности CDR. Типовые последовательности CDR предложенных антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что предоставленное антитело может включать CDR, как описано в соответствии с любой из других вышеупомянутых схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области техники.

Аналогичным образом, если не указано иное, FR или отдельные указанные FR (*например*, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такие как его варибельная область, следует понимать как охватывающую (или конкретную) каркасную область, как определено любой из известных схем. В некоторых случаях, указана схема идентификации конкретных CDR, FR или FR или CDR, такой как CDR, как определено методом Kabat, Chothia, AbM или Contact, или другими известными схемами. В других случаях, приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

Термин «варибельная область» или «варибельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела обычно имеют сходную структуру, где каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. (См., *например*, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с

использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_H или V_L , соответственно (см., *например*, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)).

Среди предложенных антител есть фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, F_v , Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; переменные участки тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные V_H одиночные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антитела представляют собой фрагменты одноцепочечных антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv.

Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела обычно имеют сходную структуру, где каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR. (См., *например*, Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_H или V_L , соответственно. См., *например*, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывается с антигеном, таким как онкомаркер или антиген клеточной поверхности таргетируемой клетки или заболевания, например опухолевой клетки или раковой клетки, такой как любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем документе или известных. Примеры однодоменных антител включают sdFv, наноантитела, V_{HN} или V_{NAR} .

Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антитела представляют собой рекомбинантно продуцируемые фрагменты, такие как фрагменты, содержащие структуры, которые не встречаются в природе, такие как фрагменты с двумя или несколькими областями или цепями антител, соединенными

синтетическими линкерами, *например*, пептидными линкерами, и/или которые не могут быть продуцированы путем ферментативного расщепления встречающихся в природе интактных антител. В некоторых вариантах осуществления, фрагменты антител представляют собой scFv.

«Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR получены из CDR нечеловеческого происхождения, и все или по существу все аминокислотные остатки FR получены из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую от антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела нечеловеческого происхождения относится к варианту антитела нечеловеческого происхождения, которое подверглось гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности по отношению к человеку, при сохранении специфичности и аффинности родительского антитела нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (*например*, антитела, из которого получены остатки CDR), *например*, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, *например*, химерный антигенный рецептор, включает внеклеточную часть, содержащую один или несколько доменов связывания лиганда (*например*, антигена), такую как антитело или его фрагмент, и одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическим сигнальным доменом или областью). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, *например*, CAR, дополнительно включает спейсер и/или трансмембранный домен или часть. В некоторых аспектах, спейсер и/или трансмембранный домен может связывать внеклеточную часть, содержащую домен, связывающий лиганд (*например*, антиген), и внутриклеточную(ые) сигнальную(ые) область(и) или домен(ы).

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина или ее вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, *например*, шарнирная область IgG4, и/или область C_H1/C_L и/или Fc. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть относится к IgG человека, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит спейсерной областью между компонентом распознавания антигена, *например*, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, обеспечивающую повышенную отвечаемость клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В некоторых примерах, длина спейсера составляет точно или примерно 12 аминокислот или не более 12 аминокислот. Примеры спейсеров включают

спейсеры, содержащие по меньшей мере примерно от 10 до 229 аминокислот, примерно от 10 до 200 аминокислот, примерно от 10 до 175 аминокислот, примерно от 10 до 150 аминокислот, примерно от 10 до 125 аминокислот, примерно от 10 до 100 аминокислот, примерно от 10 до 75 аминокислот, примерно от 10 до 50 аминокислот, примерно от 10 до 40 аминокислот, примерно от 10 до 30 аминокислот, примерно от 10 до 20 аминокислот или примерно от 10 до 15 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная область содержит примерно 12 аминокислот или менее, примерно 119 аминокислот или менее или примерно 229 аминокислот или менее. Примеры спейсеров включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, или шарнир IgG4, связанный с доменом C_H3. Примеры спейсеров включают, но не ограничены ими, спейсеры, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или номер публикации международной патентной заявки WO2014031687.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, например, только шарнирный спейсер, представленный в SEQ ID NO: 1, и кодируемый последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и/или C_H3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, такой как представлен в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, такой как представлен в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсер представляет собой или содержит последовательность, богатую глицином-серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления, константная область или часть представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, или по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

В некоторых аспектах, спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который (а) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или содержит примерно 15 аминокислот или менее, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, шарнира IgG4 или его модифицированной версии, и/или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет длину точно или примерно 12 аминокислот и/или содержит или состоит из всего или

части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4 или его модифицированной версии; или (d) состоит или содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 3-5, 27-34 или 58, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ними, или (e) содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X_2 представляет собой цистеин или треонин.

В некоторых вариантах осуществления, антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, прямо или косвенно связанный с внеклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. Например, в некоторых аспектах, антигенраспознающий домен (например, внеклеточный домен) обычно связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антиген-рецептор, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, химерный рецептор содержит трансмембранный домен, связанный или слитый между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным сигнальным доменом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами.

В одном варианте осуществления, используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других белков поверхности мембраны, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен, в некоторых вариантах осуществления, происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен, в некоторых аспектах, происходит от любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие из (*т.е.* содержащие по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и)) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB) или CD154. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления, является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах, триплет фенилаланина, триптофана и валина будет обнаружен на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связь

осуществляется с помощью линкеров, спейсеров и/или трансмембранных доменов. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28 или ее вариант. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рецептора, *например*, CAR, представляет собой трансмембранный домен CD28 человека или его вариант, *например*, трансмембранный домен из 27 аминокислот CD28 человека (№ доступа: P10747.1), или представляет собой трансмембранный домен, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления, часть рекомбинантного рецептора, содержащая трансмембранный домен, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере, или по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, *например*, CAR, включает по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты, такие как внутриклеточная сигнальная область или домен. Активация Т-клеток, в некоторых аспектах, описывается как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах, CAR включает один или оба таких сигнальных компонента. Среди внутриклеточных сигнальных областей есть такие, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал через один только костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления, присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, *например*, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, *например*, дублет глицин-серин, который образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

В некоторых вариантах осуществления, при лигировании CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточная сигнальная область CAR активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки,

например Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, например, секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, усеченная часть внутриклеточной сигнальной области компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используется вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, *например*, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах, также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с таким рецептором для инициации передачи сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, обладающую такой же функциональной способностью. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают цитоплазматические последовательности области или домена, которые участвуют в обеспечении костимулирующего сигнала.

В некоторых аспектах, CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают последовательности, полученные из CD3 дзета-цепи, FcR гамма, CD3 гамма, CD3 дельта и CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления, цитоплазматическая(ие) сигнальная(ые) молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления, рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь TCR CD3, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, CD3 дзета цепь. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающая часть связана с одним или несколькими клеточными сигнальными модулями. В некоторых вариантах осуществления, клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых вариантах осуществления, рецептор, например, CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных молекул, таких как Fc рецептор γ , CD8альфа, CD8бета, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc рецептором γ и CD8альфа, CD8бета, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная (или

цитоплазматическая) сигнальная область содержит цепь CD3 человека, необязательно, CD3 дзета-стимулирующий сигнальный домен или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 ζ человека (№ доступа: P20963. 2) или сигнальный домен CD3 дзета, как описано в патенте США № 7,446,190 или патенте США № 8,911,993. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

В контексте природного TCR, полная активация обычно требует не только передачи сигналов через TCR, но также костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, для стимуляции полной активации, в CAR также включен компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления, CAR не включает компонент для генерации костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах, дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или другие костимулирующие рецепторы. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает костимулирующую область или домен CD28 или 4-1BB, например, CD28 человека или 4-1BB человека.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область или домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такой как его домен из 41 аминокислоты и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или его функциональный вариант или его часть, такой как 42-аминокислотный цитоплазматический домен из 4-1BB человека (№ доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такой как аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 12, или аминокислотная последовательность, которая имеет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых аспектах, один и тот же CAR включает как первичные (или активирующие) цитоплазматические сигнальные области, так и костимулирующие сигнальные компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, активирующий домен включен в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, экспрессированные на одной и той же клетке (см. WO 2014/055668). В некоторых аспектах, клетки включают один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетки дополнительно включают ингибиторные CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфичного для заболевания или состояния, при котором активирующий сигнал, доставляемый через таргетирующий заболевание CAR, ослабляется или ингибируется связыванием ингибиторного CAR с его лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

В некоторых вариантах осуществления, два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибирующий сигнал к клетке, так что лигирование одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, но лигирование второго ингибиторного рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR (iCAR). Такую стратегию можно использовать, например, для снижения вероятности нецелевых эффектов в контексте, в котором активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, и ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессирован на нормальных клетках, но не на клетках заболевания или состояния.

В некоторых аспектах, химерный рецептор представляет собой или включает ингибиторный CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такой как усиленный ITAM- и/или костимулирующий ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются компоненты, обнаруженные на молекулах иммунных контрольных точек, включая рецепторы PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах, сконструированная клетка включает ингибиторный CAR, включающий сигнальный домен такой ингибиторной молекулы или производный от нее, так что он служит для ослабления ответа клетки, например, индуцируемого активирующим и/или костимулирующим CAR.

В некоторых случаях, CAR называют CAR первого, второго и/или третьего

поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения представляет собой CAR, который обеспечивает исключительно индуцируемый CD3-цепью сигнал при связывании антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения, в некоторых аспектах, представляет собой CAR, который включает несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления, CAR включает один или несколько, *например*, два или несколько, костимулирующих доменов и домен активации, *например*, первичный домен активации, в цитоплазматической части. Примеры CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления, антигенный рецептор дополнительно включает маркер и/или клетки, экспрессирующие CAR, или другой антигенный рецептор дополнительно включает суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора. В некоторых аспектах, маркер включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, рецептор NGFR или эпидермального фактора роста, такой как усеченная версия такого рецептора клеточной поверхности (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в опубликованной заявке на патент № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая T2A линкерная последовательность.

Типовой полипептид для усеченного EGFR (например, tEGFR) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. Типовая линкерная последовательность T2A содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6 или 17, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, не встречающийся в природе на Т-клетках или не обнаруживаемый в природе на поверхности Т-клеток, или его часть. В некоторых вариантах осуществления, молекула представляет собой чужеродную молекулу, например

чужеродный белок, т.е. такой, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, в которую клетки будут адоптивно перенесены.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого действия, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для селекции успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой приходится сталкиваться *in vivo*, такую как костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую описанное в настоящем документе антитело или его фрагмент. В некоторых аспектах, химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его фрагмент включает scFv или однодоменное V_H антитело, и внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах, внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен дзета цепи CD3-дзета (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления, цепь CD3-дзета представляет собой цепь CD3-дзета человека. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, CD28 представляет собой CD28 человека. В некоторых вариантах осуществления, 4-1BB представляет собой 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, *например*, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFv, например, специфичное для CD19, такое как любой из описанных выше, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область и/или одна или несколько константных областей молекулы тяжелой цепи, такой как спейсер, содержащий Ig-шарнир, трансмембранный домен, содержащий весь или

часть трансмембранного домена, происходящего из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, происходящий из CD28, и сигнальный домен CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, *например*, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант и сигнальную часть CD3 дзета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такую как молекула Ig человека, такая как шарнир Ig, *например* шарнир IgG4, такой как спейсер, состоящий только из шарнира. В некоторых вариантах осуществления, CAR включает антитело или фрагмент, такой как scFv, *например*, специфичный для CD19, такой как любой из описанных выше, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих Ig-шарнир, трансмембранный домен, происходящий из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, происходящий из 4-1BB, и сигнальный домен CD3 дзета.

В конкретных вариантах осуществления любого из представленных способов, CAR содержит, по порядку от N-конца к С-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO: NO:1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO: 8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO: 12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), представленный в SEQ ID NO: 13.

В. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, клетки, *например* Т-клетки, генетически сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, конструирование осуществляют путем введения полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантный рецептор. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды.

В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых аспектах, сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, полученный из нативного полипептида. В других аспектах, сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или не нативный сигнальный пептид, такой как типовой сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, представленный в SEQ ID NO: 25, и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, *например*, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Неограничивающие типовые примеры сигнальных пептидов включают, *например*, сигнальный пептид альфа-цепи

GMCSFR, представленный в SEQ ID NO: 25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24, или сигнальный пептид CD8-альфа, представленный в SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, функционально связанный с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах, полинуклеотид содержит два, три или несколько промоторов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора.

В некоторых случаях, когда молекулы нуклеиновой кислоты кодируют две или несколько различных полипептидных цепей, *например*, рекомбинантный рецептор и маркер, каждая из полипептидных цепей может кодироваться отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Например, предложены две отдельные нуклеиновые кислоты, каждая из которых может быть индивидуально перенесена или введена в клетку для экспрессии в клетке. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связаны с одним и тем же промотором и необязательно разделены внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, вызывающий проскок рибосомы, который необязательно представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие маркер, и нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствуют или встроены в разных местах генома клетки. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, вводят в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

В некоторых вариантах осуществления, таких как те, где полинуклеотид содержит первую и вторую последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности, кодирующие каждую из различных полипептидных цепей, могут быть функционально связаны с промотором, который может быть одинаковым или разным. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который управляет экспрессией двух или нескольких различных полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, *см. например*, патент США № 6,060,273). В некоторых вариантах осуществления, транскрипционные единицы можно сконструировать как бицистронную единицу, содержащую IRES (внутренний участок посадки рибосомы), который обеспечивает коэкспрессию генных продуктов (*например*, кодирование маркера и кодирование рекомбинантного рецептора) с помощью сообщения от одного промотора.

Альтернативно, в некоторых случаях, один промотор может управлять экспрессией РНК, которая содержит, в одной открытой рамке считывания (ORF), два или три гена (*например*, кодирующие маркер и кодирующие рекомбинантный рецептор), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (*например*, последовательностями 2A) или сайт узнавания протеазой (*например*, фурин). Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который либо во время (в случае 2A), либо после трансляции процессируется в отдельные белки. В некоторых случаях, пептид, такой как T2A, может вызывать протекание рибосомы (протекание рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим нижестоящим пептидом (*см.*, например, de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) и de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Известны различные элементы 2A. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в описанных в настоящем документе способах и системах, без ограничения, последовательностей 2A из вируса ящура (F2A, *например*, SEQ ID NO: 21), вируса ринита лошадей A (E2A, *например*, SEQ ID NO: 20), вирус Thosa asigna (T2A, *например*, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиньи (P2A, *например*, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в публикации патента США № 20070116690.

Любой из описанных в настоящем документе рекомбинантных рецепторов может кодироваться полинуклеотидами, содержащими одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или расположениях. Например, один, два, три или несколько полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или несколько различных полипептидов, *например*, рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления, один вектор или конструкция содержит маркер, кодирующий последовательность нуклеиновой кислоты, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, *например*, CAR. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, находится ниже нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер.

В некоторых вариантах осуществления, осто́в вектора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько маркеров. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько маркеров представляют собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер селекции.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для обнаружения клеток, в которые были введены с полинуклеотидом, *например*, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, маркер трансдукции может указывать или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный

маркер представляет собой белок, который предназначен для совместной экспрессии на клеточной поверхности с рекомбинантным рецептором, *например*, CAR. В конкретных вариантах осуществления, такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который был модифицирован таким образом, чтобы иметь незначительную или отсутствующую активность. В некоторых вариантах осуществления, суррогатный маркер кодируется тем же полинуклеотидом, который кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно разделенный внутренним участком посадки рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает прорыв рибосомы, такой как последовательность 2A, такая как T2A, P2A, E2A или F2A. Внешние маркерные гены могут, в некоторых случаях, использоваться в связи со сконструированными клетками, чтобы обеспечить обнаружение или селекцию клеток, и в некоторых случаях, также способствовать самоубийству клеток.

Примеры суррогатных маркеров могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые являются не функциональными и не трансдуцируют или не способны трансдуцировать сигнал или сигнал, обычно трансдуцируемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не способны или не способны к интернализации. Примеры усеченных полипептидов клеточной поверхности, включая усеченные формы факторов роста или других рецепторов, таких как усеченный рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, типовая последовательность tEGFR, представленная в SEQ ID NO: 7 или 16) или простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbix®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, созданных с помощью конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для элиминации или разделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. патент США № 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах, маркер, *например*, суррогатный маркер, включает весь или часть (*например*, усеченную форму) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, *например*, усеченный CD19 нечеловеческого происхождения или рецептор эпидермального фактора роста (*например*, tEGFR).

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсложенный GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок

(BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT). Примеры светоизлучающих репортерных генов включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, придающий резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам, придающий резистентность к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит ген резистентности к пуромицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к бластицидину, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к генетицину или ген резистентности к зеоцину или их модифицированную форму.

В некоторых вариантах осуществления, молекула представляет собой чужеродную молекулу, например чужеродный белок, т.е. такой, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, в которую клетки будут адоптивно перенесены.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого действия, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для селекции успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой приходится сталкиваться *in vivo*, такой как костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, *например*, T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в публикации PCT № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Типовой полипептид для усеченного EGFR (*например*, tEGFR) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7 или 16, или аминокислотную

последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперсложенный GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Примеры светоиспускающих репортерных генов включают люциферазу (*luc*), β -галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления, маркер представляет собой маркер селекции. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, придающий резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой ген резистентности к антибиотикам, придающий резистентность к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, маркер селекции представляет собой или содержит ген резистентности к пуромицину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к бластицидину, ген резистентности к неомицину, ген резистентности к генетицину или ген резистентности к зеоцину или их модифицированную форму.

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

В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет длинную

терминальную повторяющуюся последовательность (LTR), *например*, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза Молони мыши (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) или вирус некроза селезенки (SFFV). Большинство ретровирусных векторов происходят от ретровирусов мыши. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают вирусы, происходящие из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления, экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Был описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (*например*, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109).

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

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (*см.*, *например*, Chicaybam et al. (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 and Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (*см.*, *например*, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; and Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию фосфатом кальция (*например*, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с помощью частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, *например*, в публикации международной патентной заявки № WO2014055668 и патенте США № 7,446,190.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, *например*, Т-клетки, могут быть трансфицированы либо во время, либо после размножения, *например*, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желаемого рецептора можно осуществить с помощью любого подходящего ретровирусного вектора, например. Генетически модифицированная клеточная популяция

затем может быть освобождена от начального стимула (например, анти-CD3/анти-CD28 стимула) и впоследствии стимулирована вторым типом стимула, *например*, через введенный *de novo* рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственного (перекрестно-сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (*например*, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в рамках нового рецептора (*например*, путем распознавания константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 или Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

В некоторых случаях, можно использовать вектор, который не требует активации клеток, *например*, Т-клеток. В некоторых таких случаях, клетки можно отбирать и/или трансдуцировать до активации. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток, и в некоторых случаях, одновременно или во время по меньшей мере части культивирования.

Среди дополнительных нуклеиновых кислот, *например*, гены для введения представляют собой гены для повышения эффективности терапии, например, путем стимуляции жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для обеспечения генетического маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делая клетку восприимчивой к отрицательной селекции *in vivo*, как описано Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); и Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al., описывающие использование бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных путем слияния доминантного положительного селектируемого маркера с отрицательным селектируемым маркером. См., *например*, Riddell et al., патент США № 6,040,177, столбцы 14-17.

Клетки и подготовка клеток для генной инженерии. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, *т.е.* обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в конструируемой клетке и/или в организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты представляют собой не встречающиеся в природе, такие как, нуклеиновая кислота, не найденная в природе, в том числе содержащая химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества разных типов клеток.

Клетки обычно представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки, происходящие из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного

или адаптивного иммунитета, *например*, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т клетки и/или NK-клетки. Другие типовые клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки обычно представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4⁺-клетки, CD8⁺-клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для способности к дифференциации, экспансии, рециркуляции, локализации и/или жизнестойкости, антигенной специфичности, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркерным или цитокиновым профилем секреции и/или степенью дифференциации. Что касается субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. К числу способов относятся готовые способы. В некоторых аспектах, таких как готовые технологии, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток у субъекта, их подготовку, обработку, культивирование и/или конструирование и повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток есть наивные Т -клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, мукозные инвариантные Т-клетки (MAIT), встречающиеся в природе и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22 клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, *т.е.* обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который,

например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или в организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты имеют неприродное происхождение, например, нуклеиновая кислота не встречается в природе, в том числе содержит химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества разных типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления, подготовка сконструированных клеток включает одну или несколько стадий культивирования и/или подготовки. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, *например*, полученный или производный от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект, от которого выделяют клетку, является субъектом, страдающим заболеванием или состоянием, или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будет назначена клеточная терапия. Субъектом в некоторых вариантах осуществления, является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют.

Соответственно, клетки в некоторых вариантах осуществления, являются первичными клетками, *например*, первичными клетками человека. Образцы включают образцы тканей, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одной или нескольких стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (*например*, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубация. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, прошедшим обработку. Биологические образцы включают, но не ограничены ими, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая полученные из них обработанные образцы.

В некоторых аспектах, образец, из которого получают или выделяют клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или представляет собой или получен из продукта афереза или лейкоафереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, кишечную лимфоидную ткань, мукозальную лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган и/или полученные из них клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, *например*, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления, клетки происходят из клеточных линий, *например*, Т-клеточных линий. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, получены из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата, отличного от человека,

и свиньи.

В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток включает одну или несколько стадий подготовки и/или разделения клеток на не аффинной основе. В некоторых примерах, клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к определенным компонентам.

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, *например*, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствует кальций, и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют в полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, процессоре клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют путем фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, после промывания клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте Перколл или Фиколл.

В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, *например*, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение в некоторых аспектах, включает разделение клеток и клеточных популяций на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно

маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с таким маркером, за которой обычно следуют стадии промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связавшиеся с реагентами, сохраняются для дальнейшего использования, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняются клетки, не связавшиеся с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняются для дальнейшего использования. В некоторых аспектах, отрицательная селекция может быть особенно полезной, когда нет доступных антител, которые специфически идентифицируют тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогичным образом, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно отобранная фракция с одной стадии подвергается другой стадии разделения, такой как последующая положительная или отрицательная селекция. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощать клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждое из которых специфично для маркера, предназначенного для отрицательной селекции. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах, конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, *например*, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют методами положительной или отрицательной селекции.

Например, CD3⁺, CD28⁺ Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием анти-CD3/анти-CD28-конъюгированных магнитных микроносителей (*например*, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления, выделение осуществляется путем обогащения конкретной клеточной популяции путем положительной селекции или истощения конкретной клеточной популяции путем отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления, положительная или отрицательная селекция осуществляется путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно селектированных клетках, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки выделяют из образца PBMC путем отрицательной селекции маркеров, экспрессированных на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадия селекции CD4⁺ или CD8⁺ используется для разделения CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ могут быть дополнительно отсортированы на субпопуляции с помощью положительной или отрицательной селекции по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени на одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD8⁺ клетки дополнительно обогащены или истощены наивными, центральными памяти, эффекторными памяти и/или стволовыми клетками центральной памяти, например, путем положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{CM}) проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долговременной выживаемости, размножения и/или приживления трансплантата после введения, что, в некоторых аспектах, является особенно устойчивым в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) Blood, 117:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, сочетание Т_{CM}-обогащенных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L⁺, так и в CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. PBMC могут быть обогащены или обеднены фракциями CD62L⁻ CD8⁺ и /или CD62L⁺ CD8⁺, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательной селекции клеток, экспрессирующих или высокоэкспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение популяции CD8⁺, обогащенной Т_{CM} клетками, осуществляют путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14,

CD45RA, и положительным отбором или обогащением клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{СМ}) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, селективированных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительной селекции на основе на CD62L. Такие селекции, в некоторых аспектах, осуществляют одновременно, и в других аспектах, осуществляют последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах, ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую при получении популяции или субпопуляции CD8⁺ клеток, также используется для создания популяции или субпопуляции CD4⁺ клеток, так что как положительные, так и отрицательные фракции из разделения на основе CD4, сохраняются и используются на последующих стадиях способов, необязательно, после одной или нескольких дополнительных стадий положительной или отрицательной селекции.

В конкретном примере, образец PBMC или другого образца лейкоцитов подвергают селекции CD4⁺ клеток, при этом сохраняют как отрицательные, так и положительные фракции. Отрицательная фракция затем подвергается отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19 и положительной селекции на основе маркера, характерного для Т-клеток центральной памяти, таких как CD62L или CCR7, где положительная и отрицательная селекция осуществляются в любом порядке.

CD4⁺ Т-хелперные клетки сортируются на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления, наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ клетки центральной памяти представляют собой CD62L⁺ и CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки CD4⁺ представляют собой CD62L⁻ и CD45RO⁻.

В одном примере, для обогащения CD4⁺ клеток путем отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитный микроноситель или парамагнитный микроноситель, чтобы обеспечить разделение клеток для положительной и/или отрицательной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием методов иммуномагнитного (или аффинно-магнитного) разделения (рассмотрено в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах, образец или композицию клеток, подлежащих отделению, инкубируют с небольшим, намагничиваемым или магниточувствительным материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные

микроносители (*например*, такие как микроносители Dynabeads® или MACS®). Магниточувствительный материал, *например* частица, обычно прямо или косвенно присоединен к партнеру по связыванию, *например*, антителу, которое специфически связывается с молекулой, *например* поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно разделить, *например*, которые желательно отрицательно или положительно селективировать.

В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или микроноситель содержат магниточувствительный материал, связанный со специфическим связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует много хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в способах магнитной сепарации. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патент США № 4,452,773 и в описании европейского патента EP 452342 B, которые настоящим включены посредством ссылки. Частицы коллоидного размера, такие как описанные в Owen, патент США № 4,795,698, и Liberti et al., патент США № 5,200,084, являются другими примерами.

Инкубацию обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые присоединены к магнитной частице или микроносителю, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле, и те клетки, к которым присоединены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. При положительной селекции, сохраняются клетки, притянутые к магниту; при отрицательной селекции сохраняются клетки, которые не притянуты (не меченые клетки). В некоторых аспектах, комбинация положительной и отрицательной селекции выполняется на одной и той же стадии селекции, при этом положительные и отрицательные фракции сохраняются и подвергаются дальнейшей обработке или подвергаются дополнительным стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы прикрепляются к клеткам посредством покрытия первичных антител, специфичных к одному или нескольким маркерам. В некоторых вариантах осуществления, клетки, а не микроносители, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным для типа клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (*например*, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы, покрытые стрептавидином, используются в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии подлежат инкубации, культивированию и/или конструированию; в некоторых аспектах, частицы оставляют прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, из клеток удаляют намагничиваемые или магниточувствительные частицы. Способы удаления из клеток намагничиваемых частиц известны и включают, *например*, использование конкурирующих не меченых антител и намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, селекция на основе аффинности осуществляется посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS®) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS®) способны к высокочистой селекции клеток с прикрепленными к ним намагниченными частицами. В некоторых вариантах осуществления, MACS® работает в режиме, при котором частицы-мишени и не мишени последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные частицы элюируются. Затем, после того как эта первая стадия элюирования завершена, вещества, которые были захвачены магнитным полем и которым не позволили элюироваться, высвобождаются каким-либо образом, чтобы их можно было элюировать и восстанавливать. В некоторых вариантах осуществления, клетки, не являющиеся мишенями, помечены и удалены из гетерогенной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение осуществляется с использованием системы, устройства или аппарата, который выполняет одну или несколько стадий выделения, подготовки клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления способов. В некоторых аспектах, система используется для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для сведения к минимуму ошибок, действий пользователя и/или загрязнения. В одном примере, система представляет собой систему, описанную в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003, или US 20110003380 A1.

В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат выполняет одну или несколько, *например* все, стадий выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или аппаратом, что позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS® (Miltenyi Biotec), например, для автоматического

разделения клеток на клиническом уровне в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер, в некоторых аспектах, управляет всеми компонентами инструмента и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитной сепарации, в некоторых аспектах, включает в себя подвижный постоянный магнит и держатель для селекционной колонки. Перистальтический насос регулирует скорость потока по всему набору трубок и вместе с пережимными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывную суспензию клеток.

Система CliniMACS®, в некоторых аспектах, использует намагничиваемые частицы, связанные с антителами, которые поставляются в стерильном, апиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами, клетки промывают для удаления избыточных частиц. Пакет для подготовки клеток затем соединяется с набором трубок, который, в свою очередь, соединяется с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки остаются в колонке, а не меченые удаляются с помощью серии промывок. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования в способах, описанных в настоящем документе, являются не мечеными и не сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования с описанными в настоящем документе способами, являются мечеными и сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy® в некоторых аспектах, оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy® также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток путем распознавания макроскопических слоев исходного клеточного продукта. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на эритроциты, лейкоциты и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy® может также включать встроенную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, *например*, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигеном и длительное культивирование клеток. Входные порты могут обеспечить стерильное удаление и пополнение среды, и клетки можно контролировать с

помощью встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 117:72-82, и Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) с помощью проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные на множественные маркеры клеточной поверхности, переносят в потоке жидкости. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) посредством сортировки в препаративном масштабе (сортировка флуоресцентно-активированных клеток, FACS). В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. В обоих случаях, клетки могут быть помечены множественными маркерами, что позволяет выделить хорошо определенных субпопуляций Т-клеток высокой чистоты.

В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию помечены одним или несколькими определяемыми маркерами для облегчения разделения для положительной и/или отрицательной селекции. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах, разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, осуществляют в потоке жидкости, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и /или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с проточной цитометрической системой обнаружения. Такие способы позволяют проводить положительную и отрицательную селекцию одновременно на основе нескольких маркеров.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации клеток до или после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления, стадия замораживания и последующего размораживания удаляет гранулоциты и, до некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах, можно использовать любой из множества известных растворов и параметров замораживания. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% альбумина сыворотки человека (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем его разводят средой 1:1, так что конечная концентрация ДМСО и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки обычно замораживают до -80°C со скоростью 1°C в минуту и хранят в паровой фазе

резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культуру, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в сосуде для культивирования, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, пакет или другой контейнер для культуры или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для подготовки клеток к генной инженерии, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора.

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

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

В некоторых аспектах, инкубацию проводят в соответствии с методами, такими как описаны в патенте США № 6,040,177 Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножаются путем добавления к иницирующей культивирование композиции питающих клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), (*например*, так, чтобы

полученная популяция клеток содержала по меньшей мере примерно 5, 10, 20 или 40 или более питающих клеток РВМС на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции, подлежащей размножению); и инкубации культуры (*например*, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся питающие клетки могут содержать питающие клетки РВМС, облученные гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления, РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне примерно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере примерно 25 градусов Цельсия, обычно по меньшей мере примерно 30 градусов Цельсия и обычно, точно или примерно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне примерно от 6000 до 10000 рад. Питающие клетки LCL, в некоторых аспектах, представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам по меньшей мере примерно 10:1.

В вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают стимулированием наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов антигеном. Например, антигенспецифические Т-клеточные линии или клоны могут быть созданы для антигенов цитомегаловируса путем выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимулирования клеток *in vitro* тем же антигеном.

С. Способы конструирования клеток

В конкретных вариантах осуществления, сконструированные клетки получают с помощью процесса, который создает выходную композицию обогащенных Т-клеток из одной или нескольких исходных композиций и/или из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, выходная композиция содержит клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR, такой как анти-CD19 CAR. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходных композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии, например терапии аутологичными клетками. В некоторых вариантах осуществления, выходная композиция представляет собой композицию обогащенных CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, процесс создания или продуцирования сконструированных клеток представляет собой процесс, который включает некоторые или все стадии: сбор или получение биологического образца; выделение, селекцию или обогащение вводимых клеток из биологического образца; криоконсервацию и хранение исходных клеток; размораживание и/или инкубирование введенных клеток в

стимулирующих условиях; конструирование стимулированных клеток для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивирование сконструированных клеток, например, до порогового количества, плотности или размножения; составление культивируемых клеток в выходной композиции; и/или криоконсервирование и хранение составленных выходных клеток до тех пор, пока клетки не будут высвобождены для инфузии и/или не будут пригодны для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, процесс осуществляется с использованием двух или нескольких вводимых композиций обогащенных Т-клеток, таких как отдельная композиция CD4⁺ и отдельная композиция CD8⁺, которые отдельно обрабатываются и конструируются из одного и того же исходного или начального биологического образца и повторно вливаются обратно субъекту в определенном соотношении, например, соотношении 1:1 CD4⁺ к CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные Т-клетки представляют собой или включают сконструированные Т-клетки, например, Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

В конкретных вариантах осуществления, выходную композицию сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), получают из начальной и/или исходной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, вводимая композиция представляет собой композицию из обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4⁺ Т-клеток и/или обогащенных CD8⁺ Т-клеток (далее также называемых композициями обогащенных Т-клеток, композициями обогащенных CD4⁺ Т-клеток и композициями обогащенных CD8⁺ Т-клеток, соответственно). В некоторых вариантах осуществления, композиция, обогащенная CD4⁺ Т-клетками, содержит по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD4⁺ Т-клеток.. В конкретных вариантах осуществления, композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток содержит 100% CD4⁺ Т-клеток, содержит примерно 100% CD4⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных Т-клеток включает или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8⁺ Т-клеток и/или не содержит CD8⁺ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток состоят по существу из CD4⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция, обогащенная CD8⁺ Т-клетками, содержит по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD8⁺ Т-клеток, или содержит или содержит примерно 100% CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток включает или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4⁺ Т-клеток и/или не содержит CD4⁺ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток состоят в основном из CD8⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, способ получения сконструированных

клеток может дополнительно включать одно или несколько из следующего: активацию и/или стимуляцию клеток, например, клеток вводимой композиции; генетическое конструирование активированных и/или стимулированных клеток, например, для введения полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, путем трансдукции или трансфекции; и/или культивирование сконструированных клеток, например, в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению. В конкретных вариантах осуществления, предложенные способы можно использовать в связи со сбором, сбором и/или составлением выходных композиций, полученных после инкубации, активации, стимуляции, конструирования, трансдукции, трансфекции и/или культивирования клеток.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как те, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, как описано, используемые в соответствии с предложенными способами и применениями, производятся или создаются с помощью процесса отбора, выделения, активации, стимулирования, размножения, культивирования и/или составления клеток. В некоторых вариантах осуществления, такие способы включают любые из описанных.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как те, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, как описано, используемые в соответствии с предложенными способами и применениями, продуцируют или создают типовыми процессами, как описано, например, в WO 2019/089855 и WO 2015/164675.

В некоторых из любых вариантов осуществления, типовые способы создания, продуцирования или производства сконструированных клеток, таких как те, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, как описано, или композиции, содержащей такие клетки, такой как композиция, содержащая сконструированные CD4⁺ Т-клетки и сконструированные CD8⁺ Т-клетки, каждая из которых экспрессирует один и тот же анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), включают подвергание обогащенных CD4⁺ и обогащенных CD8⁺ клеточных популяций, по отдельности, стадиям процесса. В некоторых аспектах типового процесса создания или производства сконструированных клеток, клетки CD4⁺ и CD8⁺ выбирают по отдельности из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), например, полученных с помощью лейкофереза, с получением отдельных клеточных композиций, обогащенных CD4⁺ и CD8⁺. В некоторых аспектах, такие клетки можно криоконсервировать. В некоторых аспектах, композиции CD4⁺ и CD8⁺ могут быть впоследствии разморожены и отдельно подвергнуты стадиям стимуляции, трансдукции и размножения.

В некоторых аспектах типового процесса создания или производства сконструированных клеток, размороженные клетки CD4⁺ и CD8⁺ стимулируют по отдельности, например, в присутствии покрытых парамагнитным полистиролом микроносителей, связанных с анти-CD3 и анти-CD28 антителами (например, при соотношении микроносителей к клеткам 1:1). В некоторых аспектах, стимуляцию проводят в среде, содержащей рекомбинантный IL-2 человека, рекомбинантный IL-15 человека и N-ацетилцистеин (NAC). В некоторых аспектах, среды для культивирования

клеток CD4⁺ также могут включать рекомбинантный IL-7 человека.

В некоторых аспектах иллюстративного процесса создания или производства сконструированных клеток, после введения микроносителей, клетки CD4⁺ и CD8⁺ отдельно трансдуцируют лентивирусным вектором, кодирующим один и тот же CAR, такой как один и тот же анти-CD19 CAR. В некоторых аспектах, CAR может содержать анти-CD19 scFv, полученный из антитела мыши, спейсер иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых аспектах, вектор может кодировать усеченный рецептор, который служит суррогатным маркером для экспрессии CAR, который связан с конструкцией CAR последовательностью T2A. В некоторых аспектах иллюстративного процесса, клетки трансдуцируют в присутствии 10 мкг/мл сульфата протамина.

В некоторых аспектах типового процесса создания или производства сконструированных клеток, после трансдукции гранулы удаляют из клеточных композиций под воздействием магнитного поля. В некоторых аспектах, клеточные композиции CD4⁺ и CD8⁺ культивируют отдельно для размножения при постоянном перемешивании и переносе кислорода с помощью биореактора (например, биореактора Xuri™ W25). В некоторых случаях, в среду добавляют полоксамер. В некоторых аспектах, клеточные композиции как CD4⁺, так и CD8⁺ культивируют в присутствии IL-2 и IL-15. В некоторых аспектах, клеточная среда CD4⁺ также включает IL-7. В некоторых случаях, каждую из клеток CD4⁺ и CD8⁺ перед сбором культивируют до 4-кратного размножения. В некоторых аспектах, через один день после достижения порога, клетки из каждой композиции можно отдельно собирать, формировать и криоконсервировать. В некоторых аспектах, типовые способы получения, продуцирования или производства сконструированных клеток, таких как те, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, как описано, или композиции, содержащей такие клетки, такой как композиция, содержащая сконструированные CD4⁺ Т-клетки и сконструированные CD8⁺ Т-клетки клетки, каждая из которых экспрессирует один и тот же анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR), включают клетки, описанные в **Таблице 6** ниже.

Таблица 6: Типовой способ получения CD4⁺ и CD8⁺ CAR-Т-клеток		
Стадия	CD4⁺ клетки	CD8⁺ клетки
Стимуляция (день 1-2)	• микроносители, конъюгированные с анти-CD3/CD28 антителами • Соотношение микроносителей к клеткам 1:1 • среды: IL-2, IL-7, IL-15 и NAC	• микроносители, конъюгированные с анти-CD3/CD28 антителами • Соотношение микроносителей к клеткам 1:1 • среды: IL-2, IL-15 и NAC
Трансдукция	• трансдукционный адъювант	• трансдукционный адъювант

(день 2-5)	(например, 10 мкг/мл протамина сульфата)	(например, 10 мкг/мл протамина сульфата)
Удаление микроносителя (день 5*)	• удаление магнитных микроносителей	• удаление магнитных микроносителей
Размножение (день 5* - Сбор)	• биореактор с качающимся движением и/или непрерывное перемешивание • среды: IL-2, IL-7, IL15 и поллоксамер	• биореактор с качающимся движением и/или непрерывное перемешивание • среды: IL-2, IL-15 и поллоксамер

*Приблизительно

В других аспектах, другой типовой способ создания, продуцирования или производства сконструированных клеток или композиции, содержащей такие клетки, включает процесс, который отличается от приведенного выше типового процесса тем, что НАС не добавляют в среду во время стимуляции; среда для клеток CD4⁺ не содержит IL-2; клетки стимулируют при соотношении микроносителей к клеткам 3:1; клетки трансдуцируют с более высокой концентрацией сульфата протамина; удаление микроносителей происходит примерно на 7 день; и размножение проводят в статическом режиме, т.е. без постоянного перемешивания или перфузии (например, полунепрерывной и/или ступенчатой перфузии) и без поллоксамера.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD4⁺ Т-клеток и по меньшей мере одну отдельную композицию обогащенных CD8⁺ Т-клеток выделяют, селективируют, обогащают или получают из одного биологического образца, например, образца PBMC или других лейкоцитов от одного и того же донора, такого как пациент или здоровый индивидуум. В некоторых вариантах осуществления, отдельная композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток и отдельная композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток, например, были изначально выделены, селектированы и/или обогащены из одного и того же биологического образца, например, из одного биологического образца, полученного, собранного и/или взятого у одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец сначала подвергают селекции CD4⁺ Т-клеток, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции, и отрицательную фракцию дополнительно подвергают селекции CD8⁺ Т-клеток. В других вариантах осуществления, биологический образец сначала подвергают селекции CD8⁺ Т-клеток, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции, и отрицательную фракцию дополнительно подвергают селекции CD4⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы селекции осуществляют, как описано в международной публикации РСТ № WO2015/164675. В некоторых вариантах осуществления, способы селекции осуществляют, как описано в

международной публикации PCT № WO 2019/089855. В некоторых аспектах, биологический образец сначала подвергается положительной селекции в отношении CD8+ Т-клеток для получения по меньшей мере одной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток, и отрицательная фракция подвергается положительной селекции в отношении CD4+ Т-клеток для создания по меньшей мере одной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, так что по меньшей мере одна композиция обогащенных CD8+ Т-клеток и по меньшей мере одна композиция обогащенных CD4+ Т-клеток представляют собой отдельные композиции из одного и того же биологического образца, например, от одного и того же пациента-донора или здорового индивидуума. В некоторых аспектах, две или несколько отдельных композиций обогащенных Т-клеток, где, например, по меньшей мере одна представляет собой композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одна представляет собой отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток от одного и того же донора, замораживают по отдельности, например, криозащищают или криоконсервируют в криоконсервирующей среде.

В некоторых аспектах, две или несколько отдельных композиций обогащенных Т-клеток, где, например, по меньшей мере одна представляет собой композицию обогащенных CD4+ Т-клеток и по меньшей мере одна представляет собой отдельную композицию обогащенных CD8+ Т-клеток из одного и того же биологического образца, активируют и/или стимулируют путем контакта со стимулирующим реагентом (например, путем инкубации с магнитными микроносителями, конъюгированными с CD3/CD28, для активации Т-клеток). В некоторых аспектах, каждая из активированных/стимулированных клеточных композиций сконструирована, трансдуцирована и/или трансфицирована, например, с использованием вирусного вектора, кодирующего рекомбинантный белок (например, CAR), для экспрессии одного и того же рекомбинантного белка в CD4+ Т-клетках и CD8+ Т-клетках каждой клеточной композиции. В некоторых аспектах, способ включает удаление стимулирующего реагента, например, магнитных микроносителей, из клеточной композиции. В некоторых аспектах, клеточную композицию, содержащую сконструированные CD4+ Т-клетки, и клеточную композицию, содержащую сконструированные CD8+ Т-клетки, культивируют отдельно, например, для раздельного размножения в них популяций CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную композицию после культивирования собирают и/или собирают, и/или готовят, например, путем промывания клеточной композиции в буфере для состава. В некоторых вариантах осуществления, клеточную композицию, содержащую CD4+ Т-клетки, и клеточную композицию, содержащую CD8+ Т-клетки, замораживают, например, подвергают криозащите или криоконсервируют в криоконсервирующей среде. В некоторых аспектах, сконструированные CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в каждом составе происходят от одного и того же донора или биологического образца и экспрессируют один и тот же рекомбинационный белок (например, CAR, такой как анти-CD19 CAR). В некоторых аспектах, отдельный сконструированный состав CD4+ и отдельный сконструированный

состав CD8⁺ вводят в определенном соотношении, например 1:1, нуждающемуся в этом субъекту, такому как один и тот же донор.

1. Клетки и подготовка клеток для генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как Т-клетки, используемые в связи с предложенными способами, применениями, готовыми изделиями или композициями, представляют собой клетки, которые были генетически сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR или TCR, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки используют в контексте клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки представляют собой иммунные клетки. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, такие как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки представляют собой Т-клетки, такие как CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, такие как нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, которая, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или в организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты представляют собой не встречающиеся в природе, например, нуклеиновую кислоту, не найденную в природе, в том числе содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества разных типов клеток.

Клетки обычно представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки, происходящие из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, *например*, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или NK-клетки. Другие типовые клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки обычно представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от субъекта и/или выделенные от субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или несколько подгрупп Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4⁺ клетки, CD8⁺ клетки и их субпопуляции, такие как те, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, способностью к дифференциации, экспансией, рециркуляцией, локализацией и/или жизнестойкостью, антигенной специфичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркеров или цитокинов и/или степенью дифференциации. Что касается субъекта, подлежащего

лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В некоторых аспектах, клетки являются аутологичными. В некоторых аспектах, клетки являются аллогенными. Среди включенных способов есть готовые способы. В некоторых аспектах, таких как готовые технологии, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например стволовыми клетками, такими как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток у субъекта, их подготовку, обработку, культивирование и/или конструирование и повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток есть наивные Т-клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, мукозные инвариантные Т-клетки (MAIT), встречающиеся в природе и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22, клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или в организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты представляют собой не встречающиеся в природе, например, нуклеиновую кислоту, не найденную в природе, в том числе содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества разных типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления, подготовка сконструированных клеток включает одну или несколько стадий культивирования и/или подготовки. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный или производный от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, субъект, от которого выделяют клетку, является субъектом, страдающим заболеванием или состоянием, или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будет назначена

клеточная терапия. Субъектом, в некоторых вариантах осуществления, является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют.

Соответственно, клетки, в некоторых вариантах осуществления, являются первичными клетками, например, первичными клетками человека. Образцы включают образцы тканей, жидкости и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одной или нескольких стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубация. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, прошедшим обработку. Биологические образцы включают, но не ограничены ими, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая полученные из них обработанные образцы.

В некоторых аспектах, образец, из которого получают или выделяют клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или представляет собой или получен из продукта афереза или лейкоафереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, кишечную лимфоидную ткань, мукозальную лимфоидную ткань, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почку, поджелудочную железу, молочную железу, кость, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалину или другой орган и/или полученные из них клетки. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, *например*, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологических и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления, клетки происходят из клеточных линий, например, Т-клеточных линий. Клетки, в некоторых вариантах осуществления, получены из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, примата, отличного от человека, и свиньи.

В некоторых вариантах осуществления, выделение клеток включает одну или несколько стадий подготовки и/или разделения клеток на не аффинной основе. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых примерах, клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или резистентность к определенным компонентам.

В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкоафереза. Образцы, в некоторых аспектах, содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие

ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствует кальций, и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют в полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, процессоре клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывки выполняют путем фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, после промывания клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте Percoll® или Ficoll®.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стадии селекции включает инкубацию клеток с реагентом для селекции. Инкубация с реагентом или реагентами для селекции, например, как часть способов селекции, которые могут быть выполнены с использованием одного или нескольких реагентов для селекции одного или нескольких различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке или на ней одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления, может быть использован любой известный способ с использованием селективного реагента или реагентов для разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, реагент или реагенты для селекции приводят к разделению, основанному на аффинности или иммуноаффинности. Например, селекция, в некоторых аспектах, включает инкубацию с реагентом или реагентами для разделения клеток и клеточных популяций на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывки и отделением клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с определенным количеством желаемого реагента для селекции на основе аффинности. Иммуноаффинную селекцию можно проводить с использованием любой системы или способа, которые

приводят к благоприятному энергетическому взаимодействию между разделяемыми клетками и молекулой, специфически связывающейся с маркером на клетке, например, антителом или другим партнером по связыванию на твердой поверхности, например, частице. В некоторых вариантах осуществления, способы осуществляются с использованием таких частиц, как микроносители, например, магнитные микроносители, которые покрыты агентом селекции (например, антителом), специфичным к маркеру клеток. Частицы (например, микроносители) можно инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или пакет, при встряхивании или перемешивании с постоянным соотношением плотности клеток и частиц (например, микроносителей), чтобы способствовать продвижению энергетически благоприятных взаимодействий. В других случаях, способы включают селекцию клеток, при которой весь или часть отбора осуществляют во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию клеток с реагентами для селекции, такими как реагенты для селекции на основе иммуноаффинности, проводят в центрифужной камере. В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение осуществляют с использованием системы, устройства или аппарата, описанных в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном примере, система представляет собой систему, описанную в международной публикации № WO2016/073602.

В некоторых вариантах осуществления, проводя такие стадии селекции или их части (например, инкубацию с частицами, покрытыми антителами, например, магнитными микроносителями) в полости центрифужной камеры, пользователь может контролировать определенные параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора во время обработки и ее время, что может обеспечить преимущества по сравнению с другими доступными способами. Например, возможность уменьшить объем жидкости в полости во время инкубации может увеличить концентрацию частиц (например, реагента на основе микроносителя), используемых при выделении, и, таким образом, химический потенциал раствора, не влияя на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может усилить парные взаимодействия между обрабатываемыми клетками и частицами, используемыми для селекции. В некоторых вариантах осуществления, стадия инкубации в камере, например, связанная с системами, схемой и управлением, как описано в настоящем документе, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в желаемое время во время инкубации, что также может улучшить взаимодействие.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть стадии селекции проводят в центрифужной камере, которая включает инкубацию клеток с реагентом для селекции. В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством желаемого реагента для селекции на основе аффинности, которое намного меньше, чем обычно используется при выполнении аналогичной селекции в пробирке или контейнере для селекции того же количества клеток и /или объема клеток в соответствии с

инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, количество реагента или реагентов для селекции составляет не более 5%, не более 10%, не более 15%, не более 20%, не более 25%, не более 50%, не более 60%, не более 70% или не более 80% от количества того же реагента(ов) для селекции, использованного(ых) для селекции клеток в пробирке или инкубации в контейнере для того же количества клеток и/или того же объема клеток в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых вариантах осуществления, для селекции, например, селекции клеток на основе иммуноаффинности, клетки инкубируют в полости камеры в композиции, которая также содержит буфер селекции с реагентом селекции, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую желательно обогатить и/или истощить, но не на других клетках в композиции, таким как антитело, которое необязательно связано с каркасом, таким как полимер или поверхность, например микроноситель, например, магнитный микроноситель, такой как магнитные микроносители, связанные с моноклональными антителами, специфичными в отношении CD4 и CD8. В некоторых вариантах осуществления, как описано, реагент селекции добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое существенно меньше (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством реагента для селекции, которое обычно используют или которое было бы необходимо для достижения примерно такой же или аналогичной эффективности селекции такого же количества клеток или такого же объема клеток при селекции в пробирке при встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят с добавлением буфера для селекции к клеткам и реагента для селекции для достижения целевого объема при инкубации реагента, например, от 10 мл до 200 мл, такого как, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер для селекции и реагент для селекции предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, буфер для селекции и реагент для селекции добавляют к клеткам по отдельности. В некоторых вариантах осуществления, селекционную инкубацию проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать продвижению энергетически благоприятных взаимодействий и, таким образом, позволяет использовать меньше реагента для селекции в целом, достигая при этом высокой эффективности селекции.

В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации с реагентом селекции составляет от или от примерно 5 минут до 6 часов, например, от или от примерно 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию обычно проводят в условиях перемешивания, например, при наличии вращения, как правило, при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже той, которая используется для осаждения

клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно или по меньшей мере, 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80 г до 100 г (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 80 г, 85 г, 90 г, 95 г или 100 г). В некоторых вариантах осуществления, вращение выполняется с использованием повторяющихся интервалов вращения на такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например вращением и/или отдыхом в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращением в течение примерно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение примерно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В некоторых вариантах осуществления, такой процесс осуществляется в полностью закрытой системе, неотъемлемой частью которой является камера. В некоторых вариантах осуществления, этот процесс (и, в некоторых аспектах, также одна или несколько дополнительных стадий, таких как предшествующая стадия промывания образца, содержащего клетки, такого как образец афереза) осуществляется автоматически, так что клетки, реагент и другие компоненты втягиваются в камеру и выталкиваются из нее в соответствующие моменты времени и выполняется центрифугирование, чтобы завершить стадию промывки и связывания в одной закрытой системе с использованием автоматизированной программы.

В некоторых вариантах осуществления, после инкубации и/или смешивания клеток и реагента и/или реагентов селекции, инкубированные клетки подвергают разделению для селекции клеток на основе присутствия или отсутствия конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления, разделение проводят в той же закрытой системе, в которой проводили инкубацию клеток с реагентом селекции. В некоторых вариантах осуществления, после инкубации с реагентами селекции, инкубированные клетки, включая клетки, в которых был связан реагент селекции, переносят в систему для иммуноаффинного разделения клеток. В некоторых вариантах осуществления, система для иммуноаффинного разделения представляет собой или содержит колонку для магнитного разделения.

В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение в некоторых аспектах, включает разделение клеток и клеточных популяций на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, которое специфически связывается с таких маркеров, за которыми обычно следуют стадии промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером

по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связавшиеся с реагентами, сохраняются для дальнейшего использования, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняются клетки, не связавшиеся с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах, обе фракции сохраняются для дальнейшего использования. В некоторых аспектах, отрицательная селекция может быть особенно полезной, когда нет доступных антител, которые специфически идентифицируют тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогичным образом, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно селектированная фракция с одной стадии подвергается другой стадии разделения, такой как последующая положительная или отрицательная селекция. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощать клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждое из которых специфично для маркера, предназначенного для отрицательной селекции. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно селектированы путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах, конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют методами положительной или отрицательной селекции.

Например, CD3⁺, CD28⁺ Т-клетки могут быть положительно селектированы с использованием анти-CD3/анти-CD28-конъюгированных магнитных микроносителей (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления, выделение осуществляется путем обогащения конкретной клеточной популяции путем положительной селекции или истощения конкретной клеточной популяции путем отрицательной селекции. В

некоторых вариантах осуществления, положительная или отрицательная селекция осуществляется путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно селектированных клетках, соответственно.

В конкретных вариантах осуществления, биологический образец, например, образец PBMC или других лейкоцитов, подвергают селекции CD4⁺ Т-клеток, при этом сохраняются как отрицательные, так и положительные фракции. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки CD8⁺ выбирают из отрицательной фракции. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец подвергают селекции CD8⁺ Т-клеток, при этом сохраняются как отрицательные, так и положительные фракции. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки CD4⁺ выбирают из отрицательной фракции.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки выделяют из образца PBMC путем отрицательной селекции маркеров, экспрессированных на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадия селекции CD4⁺ или CD8⁺ используется для разделения CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ могут быть дополнительно отсортированы на субпопуляции с помощью положительной или отрицательной селекции по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени на одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, CD8⁺ клетки дополнительно обогащены или истощены наивными, центральными памяти, эффекторными памяти и/или стволовыми клетками центральной памяти, например, путем положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{CM}) проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долговременной выживаемости, размножения и/или приживления трансплантата после введения, что, в некоторых аспектах, является особенно устойчивым в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) Blood, 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, сочетание Т_{CM}-обогащенных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L⁺, так и в CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. PBMC могут быть обогащены или обеднены фракциями CD62L⁻ CD8⁺ и /или CD62L⁺ CD8⁺, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение центральными Т-клетками памяти (Т_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии

CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательной селекции клеток, экспрессирующих или высокоэкспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение популяции CD8⁺, обогащенной T_{CM} клетками, осуществляют путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и положительным отбором или обогащением клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте, обогащение центральными Т-клетками памяти (T_{CM}) проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, селектированных на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительной селекции на основе на CD62L. Такие селекции, в некоторых аспектах, осуществляют одновременно, и в других аспектах, осуществляют последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах, ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую при получении популяции или субпопуляции CD8⁺ клеток, также используется для создания популяции или субпопуляции CD4⁺ клеток, так что как положительные, так и отрицательные фракции из разделения на основе CD4, сохраняются и используются на последующих стадиях способов, необязательно, после одной или нескольких дополнительных стадий положительной или отрицательной селекции.

В конкретном примере, образец PBMC или другого образца лейкоцитов подвергают селекции CD4⁺ клеток, при этом сохраняют как отрицательные, так и положительные фракции. Отрицательная фракция затем подвергается отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19 и положительной селекции на основе маркера, характерного для Т-клеток центральной памяти, таких как CD62L или CCR7, где положительная и отрицательная селекция осуществляются в любом порядке.

CD4⁺ Т-хелперные клетки сортируются на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты могут быть получены стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления, наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ клетки центральной памяти представляют собой CD62L⁺ и CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления, эффекторные клетки CD4⁺ представляют собой CD62L⁻ и CD45RO⁻.

В одном примере, для обогащения CD4⁺ клеток путем отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления, антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитный микроноситель или парамагнитный микроноситель, чтобы обеспечить разделение клеток для положительной и/или отрицательной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки и клеточные популяции разделяют или выделяют с использованием методов иммуномагнитного (или аффинно-магнитного) разделения (рассмотрено в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher ©

Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах, образец или композицию клеток, подлежащих отделению, инкубируют с небольшим, намагничиваемым или магниточувствительным материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные микроносители (*например*, такие как микроносители Dynabeads® или MACS®). Магниточувствительный материал, *например* частица, обычно прямо или косвенно присоединен к партнеру по связыванию, *например*, антителу, которое специфически связывается с молекулой, *например* поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно разделить, *например*, которые желательно отрицательно или положительно селектировать.

В некоторых вариантах осуществления, магнитная частица или микроноситель содержат магниточувствительный материал, связанный со специфическим связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует много хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в способах магнитной сепарации. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патент США № 4,452,773 и в описании европейского патента EP 452342 B, которые настоящим включены посредством ссылки. Частицы коллоидного размера, такие как описанные в Owen, патент США № 4,795,698, и Liberti et al., патент США № 5,200,084, являются другими примерами.

Инкубацию обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые присоединены к магнитной частице или микроносителю, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле, и те клетки, к которым присоединены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. При положительной селекции, сохраняются клетки, притянутые к магниту; при отрицательной селекции сохраняются клетки, которые не притянуты (не меченые клетки). В некоторых аспектах, комбинация положительной и отрицательной селекции выполняется на одной и той же стадии селекции, при этом положительные и отрицательные фракции сохраняются и подвергаются дальнейшей обработке или подвергаются дополнительным стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы прикрепляются к клеткам посредством покрытия первичных антител, специфичных к одному или нескольким маркерам. В некоторых вариантах осуществления, клетки, а не микроносители, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют магнитные частицы, покрытые

специфичным для типа клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (*например*, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы, покрытые стрептавидином, используются в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии подлежат инкубации, культивированию и/или конструированию; в некоторых аспектах, частицы оставляют прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, из клеток удаляют намагничиваемые или магниточувствительные частицы. Способы удаления из клеток намагничиваемых частиц известны и включают, *например*, использование конкурирующих не меченых антител и намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, селекция на основе аффинности осуществляется посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS®) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS®) способны к высокочистой селекции клеток с прикрепленными к ним намагниченными частицами. В некоторых вариантах осуществления, MACS® работает в режиме, при котором частицы-мишени и не мишени последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть, клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные частицы элюируются. Затем, после того как эта первая стадия элюирования завершена, вещества, которые были захвачены магнитным полем и которым не позволили элюироваться, высвобождаются каким-либо образом, чтобы их можно было элюировать и восстанавливать. В некоторых вариантах осуществления, клетки, не являющиеся мишенями, помечены и удалены из гетерогенной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение осуществляется с использованием системы, устройства или аппарата, который выполняет одну или несколько стадий выделения, подготовки клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления способов. В некоторых аспектах, система используется для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для сведения к минимуму ошибок, действий пользователя и/или загрязнения. В одном примере, система представляет собой систему, описанную в публикации международной патентной заявки № WO2009/072003, или US 20110003380 A1.

В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат выполняет одну или несколько, *например* все, стадий выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или аппаратом, что позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или

настраивать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS® (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на клиническом уровне в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер, в некоторых аспектах, управляет всеми компонентами инструмента и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. Блок магнитной сепарации, в некоторых аспектах, включает в себя подвижный постоянный магнит и держатель для селекционной колонки. Перистальтический насос регулирует скорость потока по всему набору трубок и вместе с пережимными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывную суспензию клеток.

Система CliniMACS®, в некоторых аспектах, использует намагничиваемые частицы, связанные с антителами, которые поставляются в стерильном, апиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами, клетки промывают для удаления избыточных частиц. Пакет для подготовки клеток затем соединяется с набором трубок, который, в свою очередь, соединяется с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки остаются в колонке, а не меченые удаляются с помощью серии промывок. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования в способах, описанных в настоящем документе, являются не мечеными и не сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, клеточные популяции для использования с описанными в настоящем документе способами, являются мечеными и сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy® в некоторых аспектах, оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy® также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток путем распознавания макроскопических слоев исходного клеточного продукта. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на эритроциты, лейкоциты и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy® может также

включать встроенную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, *например*, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигеном и длительное культивирование клеток. Входные порты могут обеспечить стерильное удаление и пополнение среды, и клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа. *См.*, *например*, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, и Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) с помощью проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные на множественные маркеры клеточной поверхности, переносят в потоке жидкости. В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) посредством сортировки в препаративном масштабе (FACS). В некоторых вариантах осуществления, популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (*см.*, *например*, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376. В обоих случаях, клетки могут быть помечены множественными маркерами, что позволяет выделить хорошо определенных субпопуляций Т-клеток высокой чистоты.

В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию помечены одним или несколькими определяемыми маркерами для облегчения разделения для положительной и/или отрицательной селекции. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах, разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, осуществляют в потоке жидкости, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и /или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), *например*, в комбинации с проточной цитометрической системой обнаружения. Такие способы позволяют проводить положительную и отрицательную селекцию одновременно на основе нескольких маркеров.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения включают стадии замораживания, *например*, криоконсервации клеток до или после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления, стадия замораживания и последующего размораживания удаляет гранулоциты и, до некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, клетки суспендируют в растворе для замораживания, *например*, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах, можно использовать любой из множества известных растворов и параметров замораживания. Один пример включает использование PBS,

содержащего 20% ДМСО и 8% альбумина сыворотки человека (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем его разводят средой 1:1, так что конечная концентрация ДМСО и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, клеточные композиции хранят в составе, содержащем точно или примерно 5%, 6%, 7%, 7,5%, 8%, 9% или 10% диметилсульфоксида, или в диапазоне, определенном любым из вышеперечисленных, например, точно или примерно 7,5% ДМСО. В некоторых аспектах, композиции хранят в составе, содержащем 0,5%, 1%, 2% или 2,5% (об./об.) 25% альбумина человека, или в диапазоне, определяемом любым из предшествующих пунктов, например, точно или примерно 1% (об./об.) 25% альбумина человека. Затем клетки обычно замораживают до -80°C со скоростью 1°C в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или селекция приводит к получению одной или нескольких вводных композиций обогащенных Т-клеток, например, CD3^{+} Т-клеток, CD4^{+} Т-клеток и/или CD8^{+} Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или несколько отдельных вводимых композиций выделяют, селектируют, обогащают или получают из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, отдельные входные композиции выделяют, отбирают, обогащают и/или получают из отдельных биологических образцов, собранных, взятых и/или полученных от одного и того же субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько вводимых композиций представляют собой или включают композицию обогащенных Т-клеток, которая включает, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,9% или точно или примерно 100% CD3^{+} Т-клеток. В конкретном варианте осуществления, вводимая композиция обогащенных Т-клеток состоит в основном из CD3^{+} Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько вводимых композиций представляют собой или включают композицию обогащенных CD4^{+} Т-клеток, которая включает по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или точно или примерно 100% CD4^{+} Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, вводимая композиция CD4^{+} Т-клеток включает менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8^{+} Т-клеток, и/или не содержит CD8^{+} Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8^{+} Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, состав обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD4^{+} Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько композиций

представляет собой или включает композицию CD8⁺ Т-клеток, которая представляет собой или включает, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или на уровне или примерно 100% CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция CD8⁺ Т-клеток содержит менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4⁺ Т-клеток, и/или не содержит CD4⁺ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD8⁺ Т-клеток.

2. Активация и стимуляция

В некоторых вариантах осуществления, клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культуру, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или конструирование можно проводить в сосуде для культивирования, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, чашка для культивирования, пакет или другой контейнер для культуры или культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, предназначенные для индуцирования пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для подготовки клеток к генной инженерии, такой как введение рекомбинантного антигенного рецептора.

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

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или агенты включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен активировать или стимулировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах, агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, такие как антитела, специфичные для TCR, например, анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например, анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления, такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как микроноситель, и/или с одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления

анти-CD3 и/или анти-CD28 антитела в культуральную среду (например, в концентрации, по меньшей мере, примерно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие агенты включают IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых аспектах, концентрация IL-2 составляет, по меньшей мере, примерно 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах, инкубацию проводят в соответствии с методами, такими как описаны в патенте США № 6,040,177 Riddell et al., Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82 и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки размножаются путем добавления к иницирующей культивирование композиции питающих клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), (*например*, так, чтобы полученная популяция клеток содержала, по меньшей мере, примерно 5, 10, 20 или 40 или более питающих клеток РВМС на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции, подлежащей размножению); и инкубации культуры (*например*, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах, неделящиеся питающие клетки могут содержать питающие клетки РВМС, облученные гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления, РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне примерно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах, питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, примерно 30 градусов Цельсия и обычно, точно или примерно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве питающих клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне примерно от 6000 до 10000 рад. Питающие клетки LCL, в некоторых аспектах, представлены в любом подходящем количестве, таком как отношение питающих клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам, по меньшей мере, примерно 10:1.

В вариантах осуществления, антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают стимулированием наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов антигеном. Например, антигенспецифические Т-клеточные линии или клоны могут быть созданы для антигенов цитомегаловируса путем выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимулирования клеток *in vitro* тем же антигеном.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации в присутствии одного или нескольких стимулирующих условий или стимулирующих агентов проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центробежном вращении, как описано в Международной публикации № WO2016/073602.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации, проводимой в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами для индукции стимуляции и/или активации. В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как селектированные клетки, смешивают со стимулирующими условиями или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах, таких процессов, объем клеток смешивают с количеством одного или нескольких стимулирующих условий или агентов, которое намного меньше, чем обычно используется при выполнении аналогичных стимулов в планшете для культивирования клеток или в другой системе.

В некоторых вариантах стимулирующий агент добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое существенно меньше (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по сравнению с количеством стимулирующего агента, которое обычно используется или было бы необходимо для достижения примерно такой же или аналогичной эффективности селекции того же количества клеток или того же объема клеток, когда селекцию проводят без перемешивания в центрифужной камере, например в пробирке или пакете при периодическом встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят с добавлением инкубационного буфера к клеткам и стимулирующего агента для достижения целевого объема при инкубации реагента, например, от 10 мл до 200 мл, такого как, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или примерно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, инкубационный буфер и стимулирующий агент предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления, инкубационный буфер и стимулирующий агент добавляют к клеткам по отдельности. В некоторых вариантах осуществления, стимулирующую инкубацию проводят в условиях периодического мягкого перемешивания, что может способствовать стимулированию энергетически благоприятных взаимодействий и, таким образом, позволяет использовать меньшее количество стимулирующего агента при достижении стимуляции и активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию обычно проводят в условиях перемешивания, например, при наличии вращения, как правило, при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже той, которая используется для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно или, по меньшей мере, 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80 г до 100 г (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 80 г, 85 г, 90 г, 95 г или 100 г). В некоторых вариантах осуществления, вращение выполняется с использованием повторяющихся интервалов вращения на такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например вращением и/или отдыхом в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращением в течение примерно 1 или 2 секунд с

последующим отдыхом в течение примерно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В некоторых вариантах осуществления, общая продолжительность инкубации, например, со стимулирующим агентом, составляет от или примерно от 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 72 часов. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная инкубация осуществляется в течение времени от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24 часов, включительно.

В конкретных вариантах осуществления, стимулирующие условия включают инкубацию, культуру и/или культивирование композиции обогащенных Т-клеток с и/или в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются и/или являются эндогенными для Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой или включают член семейства цитокинов из пучка 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов из пучка 4-альфа-спиралей включают, но не ограничены ими, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF).

В некоторых вариантах осуществления, стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, перед трансдукцией.

3. Векторы и способы генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, используемые в связи с предложенными способами, применениями, изделиями или композициями, представляют собой клетки, которые были сконструированы с помощью генной инженерии для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR или TCR, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, клетки конструируют путем введения, доставки или переноса последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют рекомбинантный рецептор и/или другие молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, способы получения сконструированных клеток включают введение полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), в клетку, например, такую, как стимулированная или активированная клетка. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантные белки представляют собой рекомбинантные рецепторы, такие как любые из описанных.

Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку может осуществляться с использованием любого из ряда известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, в том числе лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Типовые способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с помощью вирусов, *например*, ретровирусов или лентивирусов, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых вариантах осуществления, с помощью конструирования получают одну или несколько сконструированных композиций обогащенных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько композиций стимулированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные стимулированные композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, которые были отобраны, выделены и/или обогащены из одного и того же биологического образца, конструируются отдельно. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные композиции включают композицию Т-клеток, обогащенных CD4⁺. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные композиции включают композицию Т-клеток, обогащенных CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные композиции обогащенных CD4⁺ Т-клеток и обогащенных CD8⁺ Т-клеток генетически сконструированы отдельно.

В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляется путем первой стимуляции клетки, например, путем объединения ее со стимулом, вызывающим ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, например, измеряемый по экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляют, сначала инкубируя клетки в стимулирующих условиях, таких как любой из описанных способов.

В некоторых вариантах осуществления, способы генной инженерии осуществляют путем контакта одной или нескольких клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например, рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, контакт можно осуществлять с помощью центрифугирования, такого как центрифужная инокуляция (например, центробежная инокуляция). Такие способы включают любые из описанных в международной публикации WO 2016/073602. Примеры центрифужных камер включают камеры, производимые и продаваемые Biosafe SA, включая камеры для использования с системами Serax® и Serax® 2, включая центробежные камеры A-200/F и A-200 и различные комплекты для использования с такими системами. Типовые камеры, системы и технологическое оборудование и шкафы описаны, например, в патенте США №

6,123,655, патенте США № 6,733,433 и публикации заявки на патент США №: US 2008/0171951, и опубликованной международной заявке на патент № WO 00/38762, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Примеры наборов для использования с такими системами включают, но не ограничены ими, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под названиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

В некоторых вариантах осуществления, контакт можно осуществлять с помощью центрифугирования, такого как центрифужная инокуляция (например, центробежная инокуляция). В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки, вектор, например, вирусные частицы и реагент, можно вращать, как правило, с относительно низкой силой или скоростью, такой как скорость ниже той, которую используют для осаждения клеток, например, от или от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или примерно или, по меньшей мере, 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления, вращение осуществляется при силе, например относительной центробежной силе, от или от примерно 100 g до 3200 g (например, точно или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), измеренные, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин «относительная центробежная сила» или RCF обычно понимается как эффективная сила, действующая на объект или вещество (такое как клетка, образец или дебрис и/или точка в камере или другом вращающемся контейнере) по отношению к гравитационной силе Земли в определенной точке пространства по сравнению с осью вращения. Величина может быть определена по известным формулам с учетом силы тяжести, скорости вращения и радиуса вращения (расстояния от оси вращения до объекта, вещества или частицы, при котором измеряется RCF).

В некоторых вариантах осуществления, система включена и/или объединена с другим оборудованием, включая оборудование для работы, автоматизации, контроля и/или мониторинга аспектов стадии трансдукции и одной или нескольких различных других стадий обработки, выполняемых в системе, например одной или нескольких стадий обработки, которые могут быть выполнены с системой центробежных камер или в связи с ней, как описано в настоящем документе или в международной публикации № WO2016/073602. Это оборудование в некоторых вариантах осуществления, содержится внутри шкафа. В некоторых вариантах осуществления, оборудование включает шкаф, который включает в себя корпус, содержащий схему управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Типовое устройство описано в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и патенте США 2008/0171951.

В некоторых вариантах осуществления, система содержит ряд контейнеров, например пакетов, трубок, запорных кранов, зажимов, соединителей и центрифужной камеры. В некоторых вариантах осуществления, контейнеры, такие как пакеты, включают

один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие трансдуцируемые клетки и частицы вирусного вектора, в одном контейнере или в отдельных контейнерах, таких как один и тот же пакет или отдельные пакеты. В некоторых вариантах осуществления, система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, которую втягивают в камеру и/или другие компоненты для разведения, ресуспендирования и/или промывочных компонентов и/или композиций во время способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или нескольких положениях в системе, например, в положении, соответствующем линии ввода, линии разбавителя, линии промывки, линии отходов и/или линии вывода.

В некоторых вариантах осуществления, камера связана с центрифугой, которая способна осуществлять вращение камеры, например, вокруг ее оси вращения. Вращение может происходить до, во время и/или после инкубации в связи с трансдукцией клеток и/или на одной или нескольких других стадиях обработки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, одну или несколько различных стадий обработки выполняются при вращении, например, при определенной силе. Камера, как правило, способна к вертикальному или обычно вертикальному вращению, так что камера находится вертикально во время центрифугирования, и боковая стенка и ось вертикальны или обычно вертикальны, и торцевая стенка(и) горизонтальна или обычно горизонтальна.

В некоторых вариантах осуществления, во время, по меньшей мере, части генетического конструирования, например, трансдукции, и/или после генной инженерии клетки переносят в пакет биореактора для культивирования генетически сконструированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток.

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

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевого повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса лейкоза Молони мыши (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) или вируса некроза селезенки (SFFV). Большинство ретровирусных векторов происходят от ретровирусов мыши. В некоторых вариантах осуществления, ретровирусы включают вирусы, происходящие из любого источника

клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая человека. В одном варианте осуществления экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. Был описан ряд типовых ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

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

В некоторых вариантах осуществления, частицы вирусного вектора содержат геном, полученный из вектора на основе генома ретровируса, такого как вектор, полученный из вектора на основе генома лентивируса. В некоторых аспектах предложенных вирусных векторов, гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, такой как рецептор антигена, такой как CAR, содержится и/или расположена между последовательностями 5'-LTR и 3'-LTR генома вектора.

В некоторых вариантах осуществления, геном вирусного вектора представляет собой геном лентивируса, такой как геном HIV-1 или геном SIV. Например, лентивирусные векторы были созданы путем множественного ослабления генов вирулентности, например, гены env, vif, vpr и nef могут быть удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Известны лентивирусные векторы. См. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США. №№ 6,013,516; и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления, эти вирусные векторы основаны на плазмиде или вирусе и сконфигурированы так, чтобы нести основные последовательности для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Известные лентивирусы могут быть легко получены из депозитариев или коллекций, таких как Американская коллекция типовых культур («ATCC»; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209), или выделены из известных источников с использованием общедоступных методов.

Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают векторы, полученные из лентивируса, такого как вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), Т-лимфотропный вирус 1 человека (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (E1AV). Например, лентивирусные векторы были созданы путем многократного ослабления генов вирулентности HIV, например, гены env, vif, vpr, vpr и nef удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны в данной области техники, см. Naldini et al., (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США. №№ 6,013,516; и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления, эти вирусные векторы

основаны на плазмиде или вирусе и сконфигурированы так, чтобы нести основные последовательности для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Известные лентивирусы могут быть легко получены из депозитариев или коллекций, таких как Американская коллекция типовых культур («ATCC»; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209), или выделены из известных источников с использованием общедоступных методов.

В некоторых вариантах осуществления, вектор вирусного генома может содержать последовательности 5' и 3' LTR ретровируса, такого как лентивирус. В некоторых аспектах, конструкция вирусного генома может содержать последовательности из 5' и 3' LTR лентивируса и, в частности, может содержать последовательности R и U5 из 5' LTR лентивируса и инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут быть последовательностями LTR любого лентивируса любого вида. Например, это могут быть последовательности LTR HIV, SIV, FIV или BIV. Как правило, последовательности LTR представляют собой последовательности LTR HIV.

В некоторых вариантах осуществления, в нуклеиновой кислоте вирусного вектора, такого как вирусный вектор HIV, отсутствуют дополнительные единицы транскрипции. Геном вектора может содержать инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR (Zufferey et al. J Virol 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998). Например, делецию в U3 области 3' LTR нуклеиновой кислоты, используемую для продуцирования РНК вирусного вектора, можно использовать для создания самоинактивирующихся (SIN) векторов. Затем эта делеция может быть перенесена в 5' LTR провирусной ДНК во время обратной транскрипции. Самоинактивирующийся вектор обычно имеет делецию энхансерной и промоторной последовательностей из 3' длинного концевого повтора (LTR), которая копируется в 5' LTR во время интеграции вектора. В некоторых вариантах осуществления, может быть устранена достаточная часть последовательности, включая удаление ТАТА-бокса, для устранения транскрипционной активности LTR. Это может предотвратить образование полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В некоторых аспектах, U3 элемент 3' LTR содержит делецию своей энхансерной последовательности, сайтов ТАТА-бокса, Sp1 и NF-каппа В. В результате самоинактивирующегося 3' LTR, провирус, генерируемый после входа и обратной транскрипции, содержит инактивированный 5' LTR. Это может повысить безопасность за счет снижения риска мобилизации генома вектора и влияния LTR на близлежащие клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3' LTR можно сконструировать любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, это не влияет на титры вектора или свойства вектора *in vitro* или *in vivo*.

Необязательно, последовательность U3 из 5' LTR лентивируса может быть заменена промоторной последовательностью в вирусной конструкции, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может увеличить титр вируса, восстановленного из упаковочной клеточной линии. Также может быть включена энхансерная последовательность. Может быть использована любая комбинация

энхансер/промотор, которая увеличивает экспрессию генома вирусной РНК в упаковочной клеточной линии. В одном примере используется последовательность энхансера/промотора CMV (патент США № 5,385,839 и патент США № 5,168,062).

В некоторых вариантах осуществления, риск инсерционного мутагенеза можно свести к минимуму путем конструирования генома ретровирусного вектора, такого как геном лентивирусного вектора, с дефектом интеграции. Можно использовать различные подходы для создания генома неинтегрирующегося вектора. В некоторых вариантах осуществления, в ферментный компонент интегразы гена *pol* можно встроить мутацию(и), так что она кодирует белок с неактивной интегразой. В некоторых вариантах осуществления, сам геном вектора можно модифицировать для предотвращения интеграции, например, путем мутации или делеции одного или обоих сайтов присоединения, или приведения 3' LTR-проксимального полипуринового тракта (PPT) в нефункциональное состояние посредством делеции или модификации. В некоторых вариантах осуществления, доступны негенетические подходы; они включают фармакологические агенты, которые ингибируют одну или несколько функций интегразы. Подходы не исключают друг друга; то есть, одновременно можно использовать более одного из них. Например, и сайт интегразы, и сайт связывания могут быть нефункциональными, или сайт интегразы и сайт PPT могут быть нефункциональными, или сайты связывания и сайт PPT могут быть нефункциональными, или все они могут быть нефункциональными. Такие способы и геномы вирусных векторов известны и доступны (см. Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman et al. *J Virol* 69:2729, 1995; Brown et al *J Virol* 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., *J Virol* 77:11150, 2003; Powell и Levin *J Virol* 70:5288, 1996).

В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит последовательности для размножения в клетке-хозяине, такой как прокариотическая клетка-хозяин. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота вирусного вектора содержит одну или несколько точек начала репликации для размножения в прокариотической клетке, такой как бактериальная клетка. В некоторых вариантах осуществления, векторы, которые включают прокариотическую точку начала репликации, также могут содержать ген, экспрессия которого придает обнаруживаемый или селектируемый маркер, такой как резистентность к лекарственным средствам.

Геном вирусного вектора обычно конструируют в форме плазмиды, которую можно трансфицировать в упаковывающую или продуцирующую клеточную линию. Для получения ретровирусных частиц, геном которых содержит РНК копию генома вирусного вектора, можно использовать любой из множества известных способов. В некоторых вариантах осуществления, в создании системы доставки генов на основе вируса участвуют, по меньшей мере, два компонента: во-первых, упаковка плазмид, включающая структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания частицы вирусного вектора, и, во-вторых, сам вирусный вектор, т.е. генетический материал, подлежащий переносу. Гарантии биобезопасности могут быть введены в конструкцию одного или

обоих этих компонентов.

В некоторых вариантах осуществления, упаковочная плаزمида может содержать все ретровирусные, такие как HIV-1, белки, кроме белков оболочки (Naldini et al., 1998). В других вариантах осуществления, в вирусных векторах могут отсутствовать дополнительные вирусные гены, такие как те, которые связаны с вирулентностью, *например*, *vpr*, *vif*, *vpr* и *nef*, и/или Tat, первичный трансактиватор HIV. В некоторых вариантах осуществления, лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе HIV, содержат только три гена родительского вируса: *gag*, *pol* и *rev*, что снижает или устраняет возможность воссоздания вируса дикого типа посредством рекомбинации.

В некоторых вариантах осуществления, геном вирусного вектора вводят в линию упаковывающих клеток, которая содержит все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной из генома вирусного вектора, в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора может содержать один или несколько генов, кодирующих вирусные компоненты, в дополнение к одной или нескольким представляющим интерес последовательностям, *например* рекомбинантным нуклеиновым кислотам. Однако, в некоторых аспектах, чтобы предотвратить репликацию генома в клетке-мишени, эндогенные вирусные гены, необходимые для репликации, удаляют и предлагают отдельно в упаковочной клеточной линии.

В некоторых вариантах осуществления, упаковочную клеточную линию трансфицируют одним или несколькими плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для образования частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковочную клеточную линию трансфицируют плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, включая LTR, цис-действующую упаковочную последовательность и представляющую интерес последовательность, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; и одну или несколько хелперных плазмид, кодирующих ферментативные и/или структурные компоненты вируса, такие как Gag, pol и/или rev. В некоторых вариантах осуществления, используется несколько векторов для разделения различных генетических компонентов, которые генерируют частицы ретровирусного вектора. В некоторых таких вариантах осуществления, введение отдельных векторов в упаковочную клетку снижает вероятность событий рекомбинации, которые в противном случае могли бы генерировать вирусы, способные к репликации. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать один плазмидный вектор, содержащий все ретровирусные компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, частица ретровирусного вектора, такая как частица лентивирусного вектора, псевдотипирована для повышения эффективности трансдукции клеток-хозяев. *Например*, частица ретровирусного вектора, такая как частица лентивирусного вектора, в некоторых вариантах осуществления, псевдотипирована гликопротеином VSV-G, что обеспечивает широкий диапазон клеток-хозяев, расширяющий типы клеток, которые можно трансдуцировать. В некоторых вариантах осуществления, упаковочную клеточную линию трансфицируют плазмидой или

полинуклеотидом, кодирующим не нативный оболочечный гликопротеин, например, включающий ксенотропные, политропные или амфотропные оболочки, такие как оболочка вируса Синдбис, GALV или VSV-G.

В некоторых вариантах осуществления, упаковочная клеточная линия обеспечивает компоненты, включая вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы в транс-положении для упаковки вирусной геномной РНК в частицы лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клеточная линия может представлять собой любую клеточную линию, которая способна экспрессировать лентивирусные белки и продуцировать функциональные частицы лентивирусного вектора. В некоторых аспектах, подходящие упаковочные клеточные линии включают 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430) клеток.

В некоторых вариантах осуществления, упаковочная клеточная линия стабильно экспрессирует вирусный(ые) белок(и). Например, в некоторых аспектах, может быть сконструирована упаковочная клеточная линия, содержащая gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без компонентов LTR и упаковки. В некоторых вариантах осуществления, упаковочная клеточная линия может быть временно трансфицирована молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующей один или несколько вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую оболочечный гликопротеин.

В некоторых вариантах осуществления, вирусные векторы и упаковывающие и/или вспомогательные плазмиды вводят посредством трансфекции или инфекции в упаковывающую клеточную линию. Упаковочная клеточная линия продуцирует частицы вирусного вектора, которые содержат геном вирусного вектора. Способы трансфекции или инфицирования хорошо известны. Неограничивающие примеры включают способы фосфата кальция, DEAE-декстрана и липофекции, электропорацию и микроинъекции.

Когда рекомбинантная плазида и ретровирусные LTR и упаковочные последовательности вводятся в особую клеточную линию (например, путем преципитации фосфатом кальция), упаковочные последовательности могут обеспечивать упаковку РНК транскрипта рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в питательную среду. Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы в некоторых вариантах осуществления, затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах, после котрансфекции упаковывающих плазмид и вектора-переносчика в упаковывающую клеточную линию частицы вирусного вектора извлекают из культуральной среды и титруют стандартными способами, используемыми специалистами в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в упаковочной клеточной линии, такой как типовая клеточная линия НЕК 293Т, путем введения плазмид, чтобы сделать возможным

образование лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковочная клетка трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как рецептор антигена, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, упаковочная клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления, упаковочная клеточная линия необязательно и/или дополнительно трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий не нативный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, примерно через два дня после трансфекции клеток, *например* клеток НЕК 293Т, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно выделить и титровать.

Восстановленные и/или продуцированные частицы ретровирусного вектора можно использовать для трансдукции клеток-мишеней с использованием описанных способов. Попадая в клетки-мишени, вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, импортируется в ядро и стабильно интегрируется в геном хозяина. Через один или два дня после интеграции вирусной РНК можно обнаружить экспрессию рекомбинантного белка, например, антигенного рецептора, такого как CAR.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают способы трансдукции клеток путем контакта, например, инкубации, клеточной композиции, содержащей множество клеток, с вирусной частицей. В некоторых вариантах осуществления, клетки, подлежащие трансфекции или трансдукции, представляют собой или содержат первичные клетки, полученные от субъекта, такие как клетки, обогащенные и/или селектированные у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, концентрация трансдуцируемых клеток композиции составляет от или от примерно $1,0 \times 10^5$ клеток/мл до $1,0 \times 10^8$ клеток/мл, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или примерно $1,0 \times 10^5$ клеток/мл, 5×10^5 клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл или 1×10^8 клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления, вирусные частицы предлагаются в определенном соотношении копий частиц вирусного вектора или их инфекционных единиц (IU) на общее количество трансдуцируемых клеток (IU/клетку). Например, в некоторых вариантах осуществления, вирусные частицы присутствуют во время контакта точно или примерно или, по меньшей мере, точно или примерно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 60 IU частиц вирусного вектора на одну из клеток.

В некоторых вариантах осуществления, титр вирусных векторных частиц составляет от или от примерно 1×10^6 IU/мл и 1×10^8 IU/мл, например, от или от примерно 5×10^6 IU/мл и 5×10^7 IU/мл, например, по меньшей мере, 6×10^6 IU/мл, 7×10^6 IU/мл, 8×10^6 IU/мл, 9×10^6 IU/мл, 1×10^7 IU/мл, 2×10^7 IU/мл, 3×10^7 IU/мл, 4×10^7 IU/мл или 5×10^7 IU/мл.

В некоторых вариантах осуществления, трансдукция может быть достигнута при множественности инфекции (MOI) менее 100, например, как правило, менее 60, 50, 40, 30,

20, 10, 5 или менее.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает контакт или инкубацию клеток с вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления, контакт длится от 30 минут до 72 часов, например, от 30 минут до 48 часов, от 30 минут до 24 часов или от 1 часа до 24 часов, например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 30 минут, 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 36 часов и более.

В некоторых вариантах контакт проводят в растворе. В некоторых вариантах осуществления, клетки и вирусные частицы контактируют в объеме от или от примерно 0,5 мл до 500 мл, например, от или от примерно 0,5 мл до 200 мл, от 0,5 мл до 100 мл, от 0,5 мл до 50 мл, от 0,5 мл до 10 мл, от 0,5 мл до 5 мл, от 5 мл до 500 мл, от 5 мл до 200 мл, от 5 мл до 100 мл, от 5 мл до 50 мл, от 5 мл до 10 мл, от 10 мл до 500 мл, от 10 мл до 200 мл, от 10 мл до 100 мл, от 10 мл до 50 мл, от 50 мл до 500 мл, от 50 мл до 200 мл, от 50 мл до 100 мл, от 100 мл до 500 мл, от 100 мл до 200 мл или от 200 мл до 500 мл.

В некоторых вариантах осуществления, входные клетки обрабатывают, инкубируют или приводят в контакт с частицами, которые содержат связывающие молекулы, которые связываются с рекомбинантным рецептором, кодируемым вирусной ДНК, или распознают его.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация клеток с частицами вирусного вектора приводит к получению или дает выходную композицию, содержащую клетки, трансдуцированные частицами вирусного вектора.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaibam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 and Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; and Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию фосфатом кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с помощью частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

Другие подходы и векторы для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в публикации международной патентной заявки № WO 2014055668 и патенте США № 7,446,190.

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например Т-клетки, могут быть трансфицированы либо во время, либо после размножения, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желаемого рецептора можно осуществить с помощью любого подходящего

ретровирусного вектора, например. Генетически модифицированная клеточная популяция затем может быть освобождена от начального стимула (например, анти-CD3/анти-CD28 стимула) и впоследствии стимулирована вторым типом стимула, например, через введенный *de novo* рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственного (поперечно-сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в рамке нового рецептора (например, путем распознавания константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al., “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 or Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).*

В некоторых случаях можно использовать вектор, который не требует активации клеток, например Т-клеток. В некоторых таких случаях, клетки можно отбирать и/или трансдуцировать до активации. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток, и в некоторых случаях, одновременно или во время, по меньшей мере, части культивирования.

Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, гены для введения представляют собой гены для повышения эффективности терапии, например, путем стимулирования жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для обеспечения генетического маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делая клетку восприимчивой к отрицательной селекции *in vivo*, как описано Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al. описывающее использование бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных путем слияния доминантного положительного селектируемого маркера с отрицательным селектируемым маркером. См., например, Riddell et al., патент США № 6,040,177, столбцы 14-17.

4. Культивирование, размножение и составление сконструированных клеток

В некоторых вариантах осуществления, способы получения сконструированных клеток, например, для клеточной терапии в соответствии с любым из представленных способов, применений, готовых изделий или композиций, включают одну или несколько стадий культивирования клеток, например, культивирование клеток в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению, после стадии генной инженерии, например введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют после инкубации клеток в стимулирующих условиях и трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. Таким образом, в некоторых вариантах

осуществления, композицию CAR-положительных Т-клеток, сконструированную путем трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим CAR, культивируют в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько композиций сконструированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, которые были сконструированы с полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, селективированных, выделенных и/или обогащенных из одного и того же биологического образца, культивируют по отдельности в стимулирующих условиях, например, после стадии генетического конструирования, например введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4⁺ Т-клеток, такую как композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток, которые были сконструированы с полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, CAR. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8⁺ Т-клеток, такую как композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток, которые были сконструированы с полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные композиции обогащенных CD4⁺ Т-клеток и обогащенных CD8⁺ Т-клеток, таких как композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток и композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток, каждая из которых была отдельно сконструирована с полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор, например, CAR, культивируют отдельно, например, в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению.

В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, такие условия могут быть созданы для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующие условия могут включать одну или несколько конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание диоксида углерода, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для стимуляции роста, деления и/или размножения клеток.

В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов представляют собой

рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для них. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов, например, рекомбинантный цитокин, представляет собой или включает член семейства цитокинов с пучком 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов с пучком 4-альфа-спиралей включают, но не ограничены ими, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько рекомбинантных цитокинов включают IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например сконструированные клетки, культивируют в присутствии цитокина, например, рекомбинантного человеческого цитокина, в концентрации от 1 IU/мл до 2000 IU/мл, от 10 IU/мл до 100 IU/мл, от 50 IU/мл до 200 IU/мл, от 100 IU/мл до 500 IU/мл, от 100 IU/мл до 1000 IU/мл, от 500 IU/мл до 2000 IU/мл или от 100 IU/мл и 1500 IU/мл.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, примерно 30 градусов Цельсия и обычно, точно или примерно 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при температуре от 25 до 38°C, например, от 30 до 37°C, например, при температуре точно или примерно 37°C $\pm$ 2°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, пока культивирование, например культивирование или размножение, не приведет к желаемой или пороговой плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах инкубация длится более или более примерно или составляет примерно 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или более.

В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в закрытой системе. В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления, культивирование проводят в той же закрытой системе, что и одну или несколько стадий предлагаемых систем. В некоторых воплощениях осуществления, композицию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в биореактор и/или подключают к нему для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования включают, но не ограничены ими, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20150, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems и Pall XRS Bioreactor Systems. В некоторых вариантах осуществления, биореактор используется для перфузии и/или смешивания клеток во время, по меньшей мере, части стадии культивирования.

В некоторых вариантах осуществления, смешивание представляет собой или включает раскачивание и/или движение. В некоторых случаях, биореактор можно двигать

или раскачивать, что в некоторых аспектах, может увеличить перенос кислорода. Перемещение биореактора может включать, помимо прочего, вращение вдоль горизонтальной оси, вращение вдоль вертикальной оси, качательное движение вдоль наклонной или наклонной горизонтальной оси биореактора или любое их сочетание. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть инкубации проводят при качании. Скорость качания и угол качания можно регулировать для достижения желаемого перемешивания. В некоторых вариантах осуществления, угол наклона составляет 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° или 1°. В некоторых вариантах осуществления, угол наклона составляет от 6 до 16°. В других вариантах осуществления, угол наклона составляет 7-16°. В других вариантах осуществления, угол наклона составляет 8-12°. В некоторых вариантах осуществления, скорость качания составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 об/мин. В некоторых вариантах осуществления, скорость качания составляет от 4 до 12 об/мин, например, от 4 до 6 об/мин, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, биореактор поддерживает температуру на уровне точно или примерно 37°C и уровни CO₂ точно или примерно 5% при постоянном потоке воздуха на уровне точно, примерно или, по меньшей мере, 0,01 л/мин, 0,05 л/мин, 0,1 л/мин, 0,2 л/мин, 0,3 л/мин, 0,4 л/мин, 0,5 л/мин, 1,0 л/мин, 1,5 л/мин или 2,0 л/мин или более 2,0 л/мин. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят с перфузией, например, со скоростью 290 мл/день, 580 мл/день и/или 1160 мл/день, например, в зависимости от времени по отношению к началу культивирования и/или плотности культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть размножения клеточной культуры выполняется с качательным движением, например, под углом от 5° до 10°, например, 6°, с постоянной скоростью качания, например, со скоростью от 5 до 15 об/мин, например, 6 об/мин или 10 об/мин.

В некоторых вариантах осуществления, способы производства, создания или получения клеточной терапии и/или сконструированных клеток в соответствии с предложенными способами, применениями или готовыми изделиями могут включать получение составов клеток, такое как получение составов генетически сконструированных клеток, полученных в результате стадий обработки до или после инкубации, конструирования и культивирования и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий обработки, включая составление клеток, можно проводить в закрытой системе. В некоторых случаях, клетки обрабатывают в одну или несколько стадий (например, проводимых в центрифужной камере и/или в закрытой системе) для производства, создания или продуцирования клеточной терапии, и/или сконструированные клетки могут включать в себя состав клеток, такой как состав генетически сконструированных клеток, полученных в результате стадий обработки

трансдукции до или после культивирования, например, культивирования и размножения, и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления, генетически сконструированные клетки готовят в виде композиций в виде стандартных доз, включающих количество клеток для введения в данной дозе или ее фракции.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, содержащих клетки, сконструированные с помощью рекомбинантного антигенного рецептора, например, CAR или TCR, предоставляется в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции могут быть использованы в соответствии с представленными способами, например, при лечении заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования, и областях применения и готовых изделиях. В некоторых случаях, клетки могут быть составлены в количестве для дозированного введения, например, для введения одной стандартной дозы или введения многократной дозы.

В некоторых вариантах осуществления, клетки могут быть составлены в контейнер, такой как пакет или флакон. В некоторых вариантах осуществления, флакон может представлять собой флакон для инфузий. В некоторых вариантах осуществления, флакон содержит одну стандартную дозу сконструированных клеток, например, количество клеток для введения в заданной дозе или ее части.

В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют в фармацевтически приемлемом буфере, который может, в некоторых аспектах, включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает замену среды на среду или буфер для состава, который является фармацевтически приемлемым или желательным для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в фармацевтически приемлемом буфере, который может включать один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Примерами таких фармацевтических форм, включая фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, могут быть любые из описанных ниже в сочетании с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

В некоторых вариантах осуществления, буфер для состава содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют с раствором криоконсерванта, который содержит от 1,0% до 30% раствора ДМСО, например, от 5% до 20% раствора ДМСО или от 5% до 10% раствора ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека (HSA),

или другую подходящую среду для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления, раствор криоконсерванта представляет собой или содержит, например, по меньшей мере, или примерно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в растворе криоконсерванта. В некоторых вариантах осуществления, клетки замораживают, например криозащищают или криоконсервируют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или примерно 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0% ДМСО, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% ДМСО. В конкретных вариантах осуществления, клетки замораживают, например криозащищают или криоконсервируют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или примерно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2% или от 1% до 2% HSA.

В некоторых вариантах осуществления, составление проводят с использованием одной или нескольких стадий обработки, включая промывание, разведение или концентрирование клеток, таких как культивированные или размноженные клетки. В некоторых вариантах осуществления, обработка может включать разведение или концентрирование клеток до желаемой концентрации или количества, такого как композиции в стандартной дозированной формы, включающей количество клеток для введения в данной дозе или ее части. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать уменьшение объема, чтобы тем самым повысить желаемую концентрацию клеток. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать объемное добавление, чтобы таким образом уменьшить концентрацию клеток по желанию. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает добавление объема буфера для состава к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления, объем буфера для состава составляет от или от примерно 10 мл до 1000 мл, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или примерно 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

В некоторых вариантах осуществления, такие стадии обработки для составления клеточной композиции осуществляют в закрытой системе. Примеры таких стадий обработки могут быть выполнены с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или несколькими системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такими как центрифужная камера, производимая и продаваемая Biosafe SA, в том числе для использования с Sерах® или Sерах. 2® системами обработки клеток. Типовая система и процесс описаны в международной публикации № WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, способ включает осуществление экспрессии из внутренней полости центрифужной камеры составленной композиции, которая представляет собой полученную в результате композицию клеток, составленную в буфере для состава, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из приведенных

выше вариантов осуществления, как описано. В некоторых вариантах осуществления, составленная композиция помещается в контейнер, такой как флаконы для биомедицинских материалов, описанные в настоящем документе, которые функционально связаны, как часть закрытой системы, с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления, сосуды для биомедицинского материала сконфигурированы для интеграции и/или функционального соединения и/или интегрированы или функционально связаны с закрытой системой или устройством, которое выполняет одну или несколько стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, сосуд с биомедицинским материалом соединен с системой на линии вывода или в положении вывода. В некоторых случаях, закрытая система соединяется с флаконом сосуда с биомедицинским материалом на входной трубке. Типовые закрытые системы для использования с описанными в настоящем документе сосудами для биомедицинских материалов включают системы Serax® и Serax® 2.

В некоторых вариантах осуществления, закрытая система, например, связанная с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает в себя многопортовый выходной набор, содержащий многопортовый трубопроводный коллектор, связанный на каждом конце трубопроводной линии с портом, к которому могут быть присоединены одна или несколько емкостей для экспрессии составленной композиции. В некоторых аспектах, желаемое количество или множество флаконов могут быть стерильно соединены с одним или несколькими, как правило, двумя или несколькими, например, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портами многопортового выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько контейнеров, например сосудов для биомедицинских материалов, могут быть присоединены к портам или не ко всем портам. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, система может осуществлять экспрессию выходной композиции во множество флаконов для биомедицинского материала.

В некоторых аспектах, клетки могут быть экспрессированы в один или несколько из множества выходных контейнеров, например флаконов, в количестве для введения дозы, например, для введения разовой стандартной дозы или введения многократной дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления, каждый из флаконов может содержать определенное количество клеток для введения в данной дозе или ее части. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, каждый флакон может содержать одну стандартную дозу для введения или может содержать часть желаемой дозы, так что более чем один из множества флаконов, например, два флакона или 3 флакона, вместе составляют дозу для введения. В некоторых вариантах осуществления, 4 флакона вместе составляют дозу для введения.

Таким образом, контейнеры, например пакеты или флаконы, обычно содержат клетки для введения, например, одной или нескольких стандартных доз. Стандартная доза может представлять собой количество или число клеток, которые должны быть введены субъекту, или удвоенное количество (или более) клеток, которые должны быть введены.

Это может быть самая низкая доза или самая низкая возможная доза клеток, которые могут быть введены субъекту. В некоторых аспектах, предложенные готовые изделия включают в себя один или несколько из множества выходных контейнеров.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров, например пакетов или флаконов, содержит стандартную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров содержит одинаковое или примерно или по существу одинаковое количество ячеек. В некоторых вариантах осуществления, каждая стандартная доза содержит точно или примерно или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 сконструированных клеток, всего клеток, Т-клеток или РВМС. В некоторых вариантах осуществления, каждая стандартная доза содержит точно или примерно или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 CAR+ Т-клеток, которые являются CD3+, такими как CD4+ или CD8+, или их жизнеспособной подгруппой.

В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, в пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 10 мл до точно или примерно 100 мл, например, точно или примерно, или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 1 мл до точно или примерно 10 мл, например, от точно или примерно 1 мл до точно или примерно 5 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 4 мл до точно или примерно 5 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 4,4 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 4,5 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 4,6 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 4,7 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 4,8 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 4,9 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет или составляет примерно 5,0 мл.

В некоторых вариантах осуществления, составленная клеточная композиция имеет

концентрацию более точно или примерно $0,5 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более чем точно или примерно $1,0 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $1,5 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $2,0 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $2,5 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $2,6 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $2,7 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $2,8 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $2,9 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $3,0 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $3,5 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $4,0 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, более точно или примерно $4,5 \times 10^6$ экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл, или более точно или примерно 5×10^6 экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR⁺)/CD3⁺ клеток, или таких жизнеспособных клеток на мл. В некоторых вариантах осуществления, клетки CD3⁺ представляют собой CD4⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетки CD3⁺ представляют собой CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, CD3⁺ Т-клетки представляют собой CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки в контейнере, например в пакете или флаконе, могут быть подвергнуты криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, например флаконы, можно хранить в жидком азоте до дальнейшего использования.

В некоторых вариантах осуществления, такие клетки, полученные данным способом, или композицию, содержащую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния, например, в соответствии со способами, применениями и готовыми изделиями, описанными в настоящем документе.

III. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, содержащих клетки, сконструированные с помощью рекомбинантного антигенного рецептора, например, CAR или TCR, предлагается в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая

композиция или состав. Примеры композиций и составов описаны выше, включая полученные в связи со способами конструирования клеток. Такие композиции можно использовать в соответствии с предложенными способами или применениями и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями, например, для профилактики или лечения заболеваний, состояний и нарушений, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и которая не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничен ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или агентом и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах, используется смесь двух или нескольких консервантов. Консервант или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,0001% до примерно 2% массовых от общей массы композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

Буферные агенты, в некоторых аспектах, включены в композиции. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах,

используется смесь двух или нескольких буферных агентов. Буферный агент или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% массовых от общей массы композиции. Способы приготовления фармацевтических композиций для введения известны. Типовые способы более подробно описаны, например, в Remington: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Состав или композиция может также содержать более одного активного ингредиента, подходящего для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится с помощью клеток или агентов, при этом соответствующие действия не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления, агенты или клетки вводят в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая, глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например п-толуолсульфоновая кислота.

Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит агенты или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность, в некоторых вариантах осуществления, контролируют путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако другие схемы дозирования могут быть полезны и могут быть определены. Желаемая доза может быть доставлена путем однократного болюсного введения композиции, путем многократного болюсного введения композиции или путем непрерывного инфузионного введения композиции.

Агенты или клетки можно вводить любым подходящим способом, например болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией,

внутрихориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или задней окологлобальной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления, их вводят парентерально, внутривенно и интраназально, а при необходимости для местного лечения - внутриочаговым введением. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят путем однократного болюсного введения клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят путем многократного болюсного введения клеток или агента, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения клеток или агента.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа агента или агентов, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, того, вводят ли агент или клетки в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни субъекта и ответа на агент или клетки, а также на усмотрение лечащего врача. Композиции в некоторых вариантах осуществления, подходящим образом вводят субъекту за один раз или в течение серии обработок.

Клетки или агенты можно вводить с использованием стандартных методов введения, составов и/или устройств. Предложены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. В отношении клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или клетки-предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомки (например, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить посредством локальной инъекции, включая катетерное введение, системную инъекцию, локальную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированную иммунореактивную клетку или агент, который лечит или ослабляет симптомы нейротоксичности), ее обычно готовят в виде стандартной дозированной формы для инъекций (раствора, суспензии, эмульсии).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, сублингвального введения или введения в виде суппозитория. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят парентерально. Термин «парентеральный», используемый в данном документе, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых вариантах осуществления, агент или клеточные популяции вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем

внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых вариантах осуществления, представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые, в некоторых аспектах, могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, могут быть составлены в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения агента или клеток в растворитель, такой как смесь с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, солевой раствор, глюкоза, декстроза и подобные.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

В некоторых вариантах осуществления, вводимая доза клеток представляет собой криоконсервированную композицию. В некоторых аспектах, композицию вводят после размораживания криоконсервированной композиции. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят в течение примерно 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 150 минут или 180 минут после размораживания. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят в течение примерно 120 минут после размораживания.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят с помощью шприца. В некоторых вариантах осуществления, объем шприца составляет примерно 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7,5, 10, 20 или 25 мл или диапазон, определяемый любым из предшествующих.

Также предложены готовые изделия и наборы, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, или их композиции, и, необязательно, инструкции по применению, например, инструкции по введению в соответствии с предложенными способами. В некоторых вариантах осуществления, в инструкциях указаны критерии выбора или идентификации субъектов для терапии в соответствии с любым из предложенных способов.

В некоторых вариантах осуществления, предложены готовые изделия и/или наборы, которые включают композицию, содержащую терапевтически эффективное количество любой из сконструированных клеток, описанных в настоящем документе, и инструкции по введению субъекту для лечения заболевания или состояния. В некоторых

вариантах осуществления, в инструкциях могут быть указаны некоторые или все элементы предложенных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах осуществления, в инструкциях указаны конкретные инструкции по введению клеток для клеточной терапии, например дозы, сроки, выбор и/или идентификация субъектов для введения и условия введения. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия и/или наборы дополнительно включают одно или несколько дополнительных средств для терапии, например, противолимфому терапию и/или комбинированную терапию, такие как любые из описанных в настоящем документе, и, необязательно, дополнительно включают инструкции по введению дополнительного средства для терапии. В некоторых вариантах осуществления, готовые изделия и/или наборы дополнительно содержат агент для противолимфомной терапии и, необязательно, дополнительно включают инструкции по проведению противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, инструкции могут быть включены в виде этикетки или листка-вкладыша, сопровождающего композиции для введения.

IV. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все термины в области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится заявленный объект изобретения. В некоторых случаях, термины с общепринятыми значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники.

Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков и не ограничиваются минимальной длиной. Полипептиды, включая предоставленные рецепторы и другие полипептиды, например, линкеры или пептиды, могут включать аминокислотные остатки, в том числе природные и/или неприродные аминокислотные остатки. Термины также включают модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиамирование, ацетилирование и фосфорилирование. В некоторых аспектах, полипептиды могут содержать модификации по отношению к нативной или природной последовательности до тех пор, пока белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, в результате направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок из-за ПЦР амплификации.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, субъект, например пациент, которому вводят агент или агенты, клетки, клеточные популяции или композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых вариантах

осуществления, примат представляет собой мартышку или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной, и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и пожилых людей. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является млекопитающее, не относящееся к приматам, такое как грызун.

Используемый в настоящем документе термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «лечение») относится к полному или частичному улучшению или уменьшению заболевания, состояния или нарушения, или симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или фенотипа, связанного с ним. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничены ими, профилактику возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, профилактику метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или паллиативное лечение, болезненное состояние, ремиссию или улучшение прогноза. Эти термины не подразумевают полное излечение заболевания или полное устранение любого симптома или воздействия на все симптомы или исходы.

Используемый в настоящем документе термин «задержка развития заболевания» означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию, подавление и/или отсрочку развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть разной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, проходящего лечение. В некоторых вариантах осуществления, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать профилактику в том смысле, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов, может быть отсрочена.

«Профилактика», как используется в данном документе, включает проведение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. В некоторых вариантах осуществления, предложенные клетки и композиции используют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

Используемый в настоящем документе термин «подавить» функцию или активность означает снижение функции или активности по сравнению с теми же условиями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, подавляющие рост опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

«Эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава, клеток или композиции, в контексте введения относится к количеству, эффективному в дозах/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, например как лечебный или профилактический результат.

«Терапевтически эффективное количество» агента, например, фармацевтического состава или клеток, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение необходимых периодов времени для достижения желаемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния, или нарушение, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес субъекта, а также популяции вводимых клеток. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество. В контексте меньшей опухолевой массы, профилактически эффективное количество в некоторых аспектах, будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «примерно» значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые связаны с этим значением или параметром как таковым.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа «а», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Например, «а» или «an» означает «по меньшей мере, один» или «один или несколько».

На протяжении всего этого описания, различные аспекты заявленного объекта представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема заявленного предмета изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, когда предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне охватывается заявленным предметом изобретения. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также охватываются заявленным объектом, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включаются в

заявленный объект изобретения. Это применимо независимо от широты диапазона.

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой смеси двух или нескольких продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, неводный или любая их комбинация.

Используемый в настоящем документе термин «обогащение» применительно к одному или нескольким конкретным типам клеток или клеточной популяции относится к увеличению числа или долевого содержания клеточного типа или популяции, например, по сравнению с общим числом клеток в или объеме композиции, или по отношению к другим типам клеток, например, путем положительной селекции на основе маркеров, экспрессируемых популяцией или клеткой, или путем отрицательной селекции на основе маркера, отсутствующего в клеточной популяции или клетке, подлежащей истощению. Термин не требует полного удаления других клеток, типов клеток или популяций из композиции и не требует, чтобы клетки, обогащенные таким образом, присутствовали в обогащенной композиции на уровне или даже близком к 100%.

В контексте настоящего документа утверждение о том, что клетка или популяция клеток является «положительной» в отношении определенного маркера, относится к выявляемому присутствию на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин относится к наличию поверхностной экспрессии, выявляемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание выявляется с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем уровень окрашивания, обнаруженный при проведении той же процедуры с изотипически подобранным контролем или контролем гейтирования флуоресценция минус один (FMO) при идентичных в остальных условиях и/или на уровне, существенно сходным с уровнем для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера и/или на уровне, значительно превышающем уровень для клеток, о которых известно, что они являются отрицательными в отношении маркера.

В контексте настоящего документа утверждение о том, что клетка или популяция клеток являются «отрицательными» в отношении определенного маркера, относится к отсутствию существенного обнаруживаемого присутствия на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, выявляемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание не выявляется с помощью проточной цитометрии на уровне, значительно превышающем уровень окрашивания, обнаруженный при выполнении той же процедуры с контрольным изотипом или контрольным гейтированием флуоресценция минус один (FMO) при идентичных в остальных условиях, и/или на уровне, существенно более низком, чем

уровень для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера, и/или на уровне, существенно сходном с таковым для клеток, о которых известно, что они являются отрицательными в отношении маркера.

Термин «вектор», используемый в данном документе, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самовоспроизводящуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии».

V. ТИПОВЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Среди предложенных вариантов осуществления:

1. Способ лечения индолентной фолликулярной лимфомы (FL) степени 1, 2 или 3А, включающий введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии заболевания, которое является рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) фолликулярной лимфомой (FL) степени 1, 2 или 3А, дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, где Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19, где:

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 CAR-экспрессирующих $CD4^+$ Т-клеток, к CAR-экспрессирующим $CD8^+$ Т-клеткам; и

введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

2. Способ по варианту осуществления 1, где, по меньшей мере, одна предшествующая линия терапии представляет собой одну предшествующую линию терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

3. Способ по варианту осуществления 2, где субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и у него наблюдалось прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала одной предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (POD24).

4. Способ по варианту осуществления 2 или варианту осуществления 3, где субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии

терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и у него наблюдалось прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения лечения одной предшествующей линией терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (POD24).

5. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, где, по меньшей мере, одна предшествующая линия терапии, включающая анти-CD20 антитело и алкилирующий агент, представляет собой химиоиммунотерапевтическую комбинированную терапию, включающую ритуксимаб, циклофосфамид, винкристин, доксорубицин и преднизолон (R-CHOP).

6. Способ по одному из вариантов осуществления 2-5, где субъект получил одну предшествующую линию терапии в течение шести месяцев после первоначального диагноза FL.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и, имеет по меньшей мере, один из следующих симптомов: симптомы, связанные с FL; угроза функции конечных органов, цитопения, вторичная по отношению к лимфоме или массивной лимфаденопатии; спленомегалия; и устойчивое прогрессирование заболевания в течение предшествующих шести месяцев или более.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, где, по меньшей мере, одна предшествующая линия терапии представляет собой две предшествующие линии терапии.

9. Способ по варианту осуществления 8, где другая из двух предшествующих линий терапии выбран из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K (PI3Ki), необязательно где PI3Ki представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, где субъект невосприимчив к лечению или имеет рецидив в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии, необязательно, где предшествующая линия терапии представляет собой комбинированную терапию или монотерапию, включающую PI3Ki.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, где субъект имеет рецидив после HSCT.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, где, по меньшей мере, одна предшествующая линия терапии представляет собой три предшествующие линии терапии.

13. Способ по варианту осуществления 12, где каждая из двух других из трех предшествующих линий терапии независимо выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс

обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K (PI3Ki), необязательно где PI3Ki представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-13, где субъект невосприимчив к лечению анти-CD20 антителом.

15. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, где субъект невосприимчив к предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, где субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения лечения анти-CD20 антителом.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения предшествующей линии терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, где субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после двух или нескольких линий терапии или в течение шести месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20 антителом.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, где субъект имеет, по меньшей мере, одно ПЭТ-положительное поражение и, по меньшей мере, одно поддающееся измерению узловое поражение или экстранодальное поражение, необязательно, где поддающееся измерению узловое поражение превышает 1,5 см по длинной оси независимо от короткой оси, и измеримое экстранодальное поражение больше 1,0 см по длинной и короткой оси.

20. Способ лечения лимфомы маргинальной зоны (MZL), включающий введение субъекту с рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) лимфомой маргинальной зоны (MZL) или подозрением на нее дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19, где:

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии для лечения MZL;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение примерно 1:1 CAR-экспрессирующих CD4⁺ Т-клеток к CAR-экспрессирующим CD8⁺ Т-клеткам; и

введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

21. Способ по варианту осуществления 20, где MZL представляет собой подтип,

выбранный из экстранодальной MZL (ENMZL, в основном желудочной), MZL селезенки (SMZL) и узловой MZL (NMZL).

22. Способ по варианту осуществления 20 или варианту осуществления 21, где, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию для лечения MZL или представляет собой трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

23. Способ по любому из вариантов осуществления 20-22, где, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию для лечения MZL, и комбинированная системная терапия выбрана из ритуксимаба плюс циклофосфида, доксорубина, винкристина и преднизона (R-CHOP), или терапии анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 20-23, где, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию, которая представляет собой анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

25. Способ по любому из вариантов осуществления 20-24, где субъект имеет MZL селезенки (SMZL), и, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии представляет собой спленэктомию.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 20-24, где субъект имеет экстранодальную MZL (ENMZL), и антибиотик не является одной из, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии.

27. Способ по любому из вариантов осуществления 20-26, где субъект имеет ПЭТ не avidное заболевание с, по меньшей мере, одним поддающимся измерению узловым поражением более 2,0 см по длинной оси или, по меньшей мере, одним поддающимся измерению экстранодальным поражением.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где у субъекта нет FL степени 3B (FL3B).

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-28, где у субъекта нет признаков смешанной DLBCL и FL или трансформированной FL (tFL).

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-29, где субъект не имеет подкласса FL дуоденального типа согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-30, где субъект имеет рецидив, по меньшей мере, на одной предшествующей линии терапии, и рецидив произошел после первоначального полного ответа (CR) или частичного ответа (PR) по меньшей мере на одну предшествующую линию терапии.

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, где субъект невосприимчив, по меньшей мере, к одной предшествующей линии терапии, и невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) или прогрессирующего заболевания (PD), по меньшей мере, на одной

предшествующей линии терапии.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, где субъект имеет общее состояние по оценке Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0 или 1.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-33, где анти-CD20 антитело представляет собой анти-CD20 моноклональное антитело.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-34, где анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб или обинутузумаб.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, где анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб.

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-36, где алкилирующий агент представляет собой бендамустин или хлорамбуцил.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-37, дополнительно включающий введение субъекту противолимфомной терапии перед введением дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток.

39. Способ по варианту осуществления 38, где противолимфомная терапия завершается примерно за 7 дней до начала введения дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток.

40. Способ по варианту осуществления 38 или варианту осуществления 39, где введение противолимфомной терапии завершают примерно за 2-7 дней до начала введения дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток.

41. Способ по любому из вариантов осуществления 38-40, где противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфида.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где противолимфомная терапия включает введение циклофосфида в дозе точно или примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$, необязательно в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в дозе точно или примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно, в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 38-42, где противолимфомная терапия включает введение циклофосфида в дозе точно или примерно 300 мг/м^2 и флударабина в дозе точно или примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, где CD19 представляет собой CD19 человека.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 1-44, где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела FMC63, спейсер, содержащий менее 15 аминокислот и содержащий шарнирную область иммуноглобулина или ее модифицированную версию, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен цепи CD3-дзета ($\text{CD3}\zeta$) и костимуляторную сигнальную область, которая представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

46. Способ по варианту осуществления 45, где шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия содержит формулу $X_1\text{PPX}_2\text{P}$, где X_1

представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X₂ представляет собой цистеин или треонин (SEQ ID NO: 58).

47. Способ по варианту осуществления 45 или варианту осуществления 46, где шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия представляет собой шарнир IgG1 или его модифицированную версию.

48. Способ по варианту осуществления 45 или варианту осуществления 46, где шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия представляет собой шарнир IgG4 или его модифицированную версию.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 45-48, где спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34, или вариант любой из вышеуказанных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 45-49, где спейсер состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34, или варианта любой из вышеперечисленных, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

51. Способ по любому из вариантов осуществления 45-50, где спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 45-51, где спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 45-52, где спейсер состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

54. Способ по любому из вариантов осуществления 45-53, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 45-54, где трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 45-55, где костимулирующий домен содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 45-56, где сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или представляет собой ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:13, 14 или 15.

58. Способ по любому из вариантов осуществления 45-57, где scFv содержит последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 35, последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 55 и последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 56; и последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 38, последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 39 и последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 54.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 45-57, где scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); и последовательность CDRH1 DYGVVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYYN SALKS (SEQ ID NO: 39) и последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40).

60. Способ по любому из вариантов осуществления 45-59, где scFv содержит, по порядку от N-конца к С-концу, V_L, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и V_H, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

61. Способ по любому из вариантов осуществления 45-60, где scFv содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:43.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-61, где CAR содержит, по порядку от N-конца к С-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO: 1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO: 8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO: 12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), представленный в SEQ ID NO:13.

63. Способ по любому из вариантов осуществления 1-62, где доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет от примерно 5x10⁷ CAR⁺ Т-клеток до примерно 1,1x10⁸ CAR⁺ Т-клеток, каждый включительно.

64. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 5x10⁷ CAR⁺ Т-клеток.

65. Способ по любому из вариантов осуществления 1-63, где доза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составляет 1x10⁸ CAR⁺ Т-клеток.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, где:

первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов, или где введение первой композиции и введение второй композиции осуществляют в один и тот же день, с интервалом от примерно 0 до примерно 12 часов, с интервалом от примерно 0 до примерно 6 часов или с интервалом от примерно 0 до 2 часов; и/или

начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом от примерно 1 минуты до примерно 1 часа или от примерно 5 минут до примерно 30 минут.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 1-66, где первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут.

68. Способ по любому из вариантов осуществления 1-67, где первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом менее 2 часов.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 1-68, где первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, вводят до введения второй композиции, содержащей CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 1-69, где дозу CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток вводят внутривенно.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-70, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные из образца субъекта, необязательно, где образец представляет собой образец цельной крови, образец афереза или образец лейкофереза.

72. Способ по варианту осуществления 71, где образец получают от субъекта перед введением субъекту противолимфомной терапии.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 1-72, где Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 1-73, где субъектом является человек.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 1-74, где частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, пролеченных в соответствии с данным способом, выше чем точно или примерно 50%, выше чем точно или примерно 60%, выше, чем точно или примерно 70% или выше, чем точно или примерно 80%.

76. Способ по варианту осуществления 75, где CRR представляет собой долю субъектов с лучшим общим ответом (BOR) до 24 месяцев полного ответа (CR).

77. Способ по варианту осуществления 75 или варианту осуществления 76, где субъект имеет FL степени 1, 2 или 3A, и CRR оценивают с помощью ПЭТ-КТ.

78. Способ по варианту осуществления 75 или варианту осуществления 76, где субъект имеет MZL, и CRR оценивают с помощью КТ.

79. Применение дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток для лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии заболевания, которое представляет собой рецидивирующую/трудно поддающуюся лечению (г/г) фолликулярную лимфому (FL) степени 1, 2 или 3A, где:

Т-клетки дозы содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере,

одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующий агент;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения в виде множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

80. Использование дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии заболевания, являющегося рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) фолликулярной лимфомой (FL) 1 степени, 2 или 3А, где:

Т-клетки дозы содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после, по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где, по меньшей мере, одна из, по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения в виде множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

81. Применение дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток для лечения субъекта с рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) лимфомой маргинальной зоны (MZL) или с подозрением на нее, где:

Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии для лечения MZL;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

82. Применение дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (г/г) лимфомой маргинальной зоны (MZL) или с подозрением на нее, где:

Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии для лечения MZL;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток к CD8⁺ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

VI. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1 Анализ профилей генной экспрессии биопсии до лечения и клинического ответа

Терапевтические композиции CAR⁺ Т-клетки, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный антиген-рецептор (CAR), специфичный для CD19, вводят субъектам с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL).

Вводимые терапевтические композиции Т-клеток создают с помощью процесса, включающего основанное на иммуноаффинности (например, иммуномагнитной селекцией) обогащение CD4⁺ и CD8⁺ клеток из образцов лейкофереза от отдельных субъектов, подлежащих лечению. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки отдельно активируют анти-CD3/анти-CD28 магнитными микроносителями и независимо трансдуцируют вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), кодирующим анти-CD19 CAR, с последующим отдельным размножением и криоконсервацией сконструированной клеточной популяции в малом объеме. CAR содержит анти-CD19 scFv, полученный из антитела мыши (вариабельная область, полученная из FMC63, ориентация V_L-линкер-V_H), спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующий участок, полученный из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вирусный вектор дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит

суррогатным маркером экспрессии CAR; отделенный от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A.

Криоконсервированные клеточные композиции размораживают перед внутривенным введением. Терапевтическую дозу Т-клеток вводят в виде определенной клеточной композиции путем введения составленной $CD4^+ CAR^+$ клеточной популяции и составленной $CD8^+ CAR^+$ популяции, вводимой в целевом соотношении примерно 1:1.

После введения композиции CAR Т-клеток, субъектов контролируют на предмет клинического ответа, в том числе через 3 месяца после введения, и реакцию на композицию CAR Т-клеток определяют путем оценки наличия у субъекта прогрессирующего заболевания (PD) или полного ответа (CR). Среди пролеченных пациентов, 53% достигают стойкого CR после лечения композицией CAR Т-клеток, с низкой частотой тяжелого синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и неврологических событий среди пациентов с агрессивной рецидивирующей/трудно поддающейся лечению В-крупноклеточной лимфомой высокого риска. У части пациентов не был достигнут CR через 1 год после лечения CAR Т-клетками.

Биопсии опухоли у исходной когорты из 50 субъектов, получавших лечение, собирают перед введением противолимфомной химиотерапии и примерно на 11 день после введения CAR Т-клеток и анализируют с помощью секвенирования РНК (RNA-seq) на предмет генной экспрессии. В частности, образцы комплементарной ДНК (кДНК) получают из РНК, выделенной из биоптатов опухоли, и анализируют с помощью RNA-seq. Образцы разделяют на группы пациентов, демонстрирующих либо CR, либо PD после лечения, в то время как образцы пациентов со стабильным заболеванием (SD) или частичным ответом (PR) не включают в анализы. Уровни генной экспрессии, определенные с помощью RNA-seq из биоптатов опухоли до лечения, коррелируют *постфактум* с ответом после введения аутологичной терапевтической композиции CAR Т-клеток.

На **ФИГ. 1А** показаны дифференциальные профили генной экспрессии в биоптатах опухолей до лечения у субъектов, демонстрирующих CR или PD через 3 месяца после лечения. Установка порогового значения кратности изменения $\log_2$ более 0,6 или менее -0,6 и уровня ложноположительных результатов (FDR) менее или равно 10% выявили 360 генов, которые высоко экспрессированы в биоптатах до лечения у субъектов, демонстрирующих CR через 3 месяца после лечения (n=16) и 380 генов, которые высоко экспрессированы в биоптатах до лечения у субъектов с PD через 3 месяца после лечения (n=29). Из дифференциально экспрессируемых генов, генная экспрессия, ассоциированная с Т-клетками, выше в биоптатах до лечения у субъектов, которые демонстрируют CR через 3 месяца после лечения. Экспрессия EZH2, гена, кодирующего энхансер гистон-лизин-метилтрансферазы гомолога 2 zeste, и генов, являющихся мишенями EZH2, выше в биоптатах до лечения у субъектов, которые демонстрируют PD через 3 месяца после лечения.

Как показано на **ФИГ. 1В**, набор генов, идентифицированный как гены, которые

экспрессированы на более высоком уровне в DLBCL по сравнению с FL (набор генов, обозначенный как «FL_DLBCD_DN»; из анализа дифференциальной генной экспрессии в 75 доступных образцах клеточных линий DLBCL и 75 доступных образцах клеточных линий FL, как описано в примере 2 ниже), также было обнаружено, что он сильно обогащен генами, связанными с биоптатами субъектов, демонстрирующих PD через 3 месяца после лечения.

При анализе более крупной когорты, включавшей еще 24 пациента из того же исследования (всего 74 субъекта; «большая когорта»), наблюдают аналогичные результаты. Как и выше, в этой группе субъектов образцы биопсии опухоли взяты до лечения у 74 субъектов и приблизительно через 11 дней после лечения у 56 субъектов, и соответствующие биопсии взяты до лечения и примерно через 11 дней после лечения у 28 таких субъектов для анализа RNA-seq, как описано выше. В большей когорте, 46% пациентов с биопсией до лечения демонстрируют CR через 3 месяца после лечения, и 56% пациентов с биопсией на 11 день демонстрируют CR через 3 месяца после лечения. Чтобы определить, имело ли место смещение в результатах ответа RNA-seq исследования популяции по сравнению с популяцией субъектов, для которых образец RNA-seq не был получен, результаты CR, PD, частичный ответ (PR) и выживаемость без прогрессирования (PFS) сравнивают между двумя популяциями. Существенных различий не наблюдается.

Дифференциальный анализ генной экспрессии также проводят в биоптатах опухолей до лечения в большей когорте, чтобы идентифицировать гены, более высоко экспрессированные у субъектов, демонстрирующих CR через 3 месяца после лечения, и гены, более высоко экспрессированные у субъектов, демонстрирующих PD через 3 месяца после лечения. В этой группе субъектов, установка порогового значения кратности изменения Log2 более 0,6 или менее -0,6 и коэффициент FDR, менее или равный 10% выявили 230 генов, которые более сильно экспрессированы в биоптатах до лечения у субъектов с проявлениями CR через 3 месяца после лечения (n=22) и 271 ген, которые более высоко экспрессированы в биопсиях до лечения у субъектов с PD через 3 месяца после лечения (n=40) (**ФИГ. 2А**).

При дальнейшем анализе большей когорты, как показано на **ФИГ. 2В**, анализ генной экспрессии биоптатов опухоли до лечения показывает, что наборы генов, включающие гены, экспрессирующиеся в большей степени при DLBCL по сравнению с FL (DLBCL_LIKE_vs_FL), и наиболее активные гены, отличающие DLBCL от FL (SHIPD_DLBCD_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP), обогащены у пациентов с PD через 3 месяца после лечения. Напротив, наборы генов, включающие гены, экспрессирующиеся более высоко при FL по сравнению с DLBCL (FL_LIKE_vs_DLBCD), и наиболее подавленные гены, отличающие DLBCL от FL (SHIPD_DLBCD_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN), обогащены у пациентов с CR через 3 месяца после лечения.

Эти результаты подтверждают, что гены, экспрессированные на более высоком уровне в DLBCL по сравнению с FL, и гены-мишени EZH2, обогащены в образцах

биопсии до лечения среди генов, ассоциированных с PD через 3 месяца у субъектов после введения CAR-T-клеток.

Для 28 соответствующих образцов до лечения и 11 дня после лечения, описанных выше, иммунную инфильтрацию на 11 день после лечения оценивают с использованием среднего значения нескольких генов Т-клеток, включая транскрипт CAR. Медиану этого уровня инфильтрации используют для разделения субъектов на две группы - с высокой инфильтрацией (n=14) и с низкой инфильтрацией (n=14). Дифференциальный анализ генной экспрессии проводят на 28 образцах до лечения, сгруппированных по их соответствию «высокому» или «низкому» уровню инфильтрации на 11 день, чтобы идентифицировать экспрессию генов в биоптатах до лечения, которая была связана с Т-клеточной инфильтрацией после введения анти-CD19 CAR Т-клеток. Как показано на **ФИГ. 2С**, субъекты в группе с «высокой» инфильтрацией демонстрируют обогащение наборов генов, включающих гены, более сильно экспрессированные в FL по сравнению с DLBCL (FL_LIKE_vs_DLBCL), и наиболее подавленные гены, отличающие DLBCL от FL (SHIPD_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN). Среди субъектов в группе с «низкой» инфильтрацией наблюдается обогащение наборов генов, включающих гены, более экспрессированные в DLBCL по сравнению с FL (DLBCL_LIKE_vs_FL), и наиболее активные гены, отличающие DLBCL от FL (SHIPD_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP).

Эти данные указывают на то, что экспрессия FL-подобного гена связана с повышенной инфильтрацией Т-клеток, а также с улучшенным ответом на лечение.

Пример 2 Анализ генной экспрессии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL) в сравнении с фолликулярной лимфомой (FL)

Исследования проводят для изучения биологических различий между диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL) и фолликулярной лимфомой (FL) с использованием внутреннего набора данных.

RNA-seq для генной экспрессии проводят на образцах комплементарной ДНК (кДНК), приготовленных из РНК, выделенной из примерно 75 доступных образцов опухолевых клеток фолликулярной лимфомы (FL) и примерно 75 диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL) (биопсии опухоли, залитые в парафин, фиксированные формалином), описанные выше в примере 1. Проанализированные образцы опухолевых клеток содержат либо дикий тип, либо мутантный EZH2, и включают подтипы DLBCL как с В-клеточными зародышевыми центрами (GCB), так и с активированными В-клетками (ABC). Как показано на **ФИГ. 3**, дифференциальная генная экспрессия наблюдается в образцах опухолевых клеток DLBCL и FL с различными наборами генов, повышенными в образцах опухолевых клеток DLBCL («DLBCL-подобные») и FL («FL-подобные»). Среди генов, которые демонстрируют дифференциальную экспрессию между образцами опухолевых клеток FL и DLBCL, находятся EZH2 (**ФИГ. 4А**; кодирующий энхансер гистон-лизин-метилтрансферазы гомолога 2 zeste,) и CD3E (**ФИГ. 4В**; кодирующий эписон-цепь гликопротеина

поверхности Т-клеток CD3, эпислон-полипептид комплекса CD3-TCR). Как показано, образцы опухолевых клеток FL показывают более низкие уровни экспрессии EZH2 и более высокие уровни экспрессии CD3E по сравнению с образцами опухолевых клеток DLBCL.

Профили генной экспрессии по RNA-seq в биоптатах опухолей до лечения из исходной когорты субъектов, описанных в примере 1, которым затем вводили терапевтическую композицию анти-CD19 Т-клеток, как описано, анализируют на предмет генной экспрессии из исследования, описанного в **ФИГ. 3**, в которых было обнаружено повышенное содержание DLBCL по сравнению с FL (набор генов, обозначенный как «DLBCL-подобный» или «DLBCL_LIKE_vs_FL»), или повышенный уровень FL по сравнению с DLBCL (набор генов, обозначенный как «FL-подобный» или «FL_LIKE_vs_DLBCl»). Проводят анализ обогащения набора генов с одним образцом (ssGSEA) для расчета отдельных показателей обогащения для каждой пары образца и соответствующего набора генов. Как показано на **ФИГ. 5А**, субъекты, которые продолжают демонстрировать CR в исследовании, описанном в примере 1, имеют более низкий показатель ssGSEA для DLBCL-подобного набора генов (DLBCL_LIKE_vs_FL) по сравнению с субъектами, которые продолжают демонстрировать PD. И наоборот, как показано на **ФИГ. 5В**, субъекты, которые продолжают демонстрировать CR в исследовании, описанном в примере 1, имеют более высокий балл ssGSEA для FL-подобного набора генов (FL_LIKE_vs_DLBCl) по сравнению с субъектами, которые продолжают демонстрировать PD.

В аналогичном анализе среди субъектов в большей когорте, описанной в Примере 1, наблюдаются аналогичные результаты. Субъекты, которые проявляют CR через 3 месяца после лечения, имеют значительно более высокие показатели обогащения FL-подобным набором генов (**ФИГ. 5С**; n=62). Кроме того, у восьми пациентов отчетливо выражены «FL-подобные» показатели генной экспрессии; эти субъекты с самой высокой экспрессией «FL-подобного» гена показывают высокий уровень CR через 3 месяца после лечения (CR=100%) по сравнению с не «FL-подобными» субъектами (CR=22%). Некоторые из субъектов DLBCL с высокой FL-подобной оценкой имеют гистологию трансформированной фолликулярной лимфомы (tFL), но также встречаются другие субъекты tFL с низкой FL-подобной оценкой. Точно так же у некоторых субъектов, не страдающих tFL, был высокий балл, подобный FL. Среди субъектов в большей когорте кривые выживаемости без прогрессирования (PFS) сравнивают для 15 субъектов с самыми высокими показателями FL-подобных оценок и остальных 59 субъектов, причем субъекты с высокой экспрессией FL-подобного гена демонстрируют значительно более высокое PFS (**ФИГ. 5D**).

Эти данные показывают, что профили генной экспрессии у субъектов с DLBCL и FL различны. В частности, различия в генной экспрессии между биоптатами опухолей DLBCL и FL связаны с количеством иммунного или стромального содержимого или состоянием опухолевых клеток. Эти данные согласуются с наблюдением, что субъекты с

FL или субъекты с более высокой экспрессией генов, которые повышены у субъектов с FL, по сравнению с субъектами с DLBCL, или субъекты с более высокой экспрессией генов, которые повышены у субъектов с DLBCL, могут быть менее резистентными к инфильтрации Т-клеток в опухолевое окружение. Кроме того, у субъектов с опухолями DLBCL, которые кажутся более похожими на опухоли FL, могут быть улучшенные результаты PFS после лечения CAR Т-клетками.

Пример 3 Введение анти-CD19 CAR-экспрессирующих клеток субъектам с фолликулярной лимфомой (FL) или лимфомой маргинальной зоны (MZL)

Терапевтическую Т-клеточную композицию, экспрессирующую анти-CD19 CAR, содержащую определенную композицию (соотношение ~1:1) композиций Т-клеток, экспрессирующих CD4+ CAR, и композиций Т-клеток, экспрессирующих CD8+ CAR, вводят субъектам с рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (R/R) индолентной В-клеточной неходжкинской лимфомой (NHL), включая индолентную фолликулярную лимфому (FL) степени 1-3А и лимфому маргинальной зоны (MZL).

Субъектов делят на четыре когорты следующим образом: когорта 1, четвертая линия и далее (4L+) г/г/FL, включая субъектов с двойной невосприимчивостью; когорта 2, третья линия (3L) г/г FL, включая субъектов с двойной невосприимчивостью; когорта 3, вторая линия (2L) г/г FL, включая субъектов с прогрессированием заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза и/или начала лечения (POD24); и когорта 4, третья линия и далее (3L+) MZL. Таким образом, регистрируют группу субъектов с признаками высокого риска, включая субъектов с двойной невосприимчивостью и субъектов с прогрессированием заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза (POD24). Субъектами с двойной невосприимчивостью являются такие, которые соответствуют хотя бы одному из следующих критериев: (i) невосприимчивы к лечению предшествующей терапией, которая включала анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (например, бендамустин), (ii) имеют рецидив в течение 6 месяцев. (т.е. в течение или до 6 месяцев) после завершения лечения предшествующей терапии, которая включала анти-CD20 моноклональное антитело и алкилирующий агент (например, бендамустин), или (iii) имеют рецидив во время анти-CD20 поддерживающей терапии после 2 или более линий терапии или в течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии. Субъектами POD24 являются те, у кого прогрессирование произошло в течение 24 месяцев после постановки диагноза или начала лечения после лечения химиоиммунотерапевтической комбинированной терапией, такой как анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (например, бендамустин). Другие признаки высокого риска включают рецидив в течение 12 месяцев после завершения предшествующей комбинированной терапии и отсутствие результата после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Субъекты с FL 3В степени (FL3В) исключены из исследования. Кроме того, субъекты с признаками комбинированной DLBCL и FL или трансформированной FL также исключены из исследования. Все субъекты имеют общее состояние по оценке Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0 или 1.

типовые когорты представлены в **Таблице E1.**

Таблица E1. Типовые когорты	
Когорта	Описание
Когорта 1 (4L+ r/r FL)	Субъекты ранее получали, по меньшей мере, 3 линии системной терапии, где, по меньшей мере, одна из этих линий представляет собой комбинацию, включающую анти-CD20 антитело (например, ритуксимаб, обинутумаб) и алкилирующий агент. Предшествующая HSCT разрешена в качестве предшествующей линии терапии. В дополнение к этим требованиям, группа субъектов с двойной невосприимчивостью 4L+ также должна соответствовать одному из следующих критериев: (i) они невосприимчивы к системной линии терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент, (ii) имеют рецидив в течение 6 месяцев после завершения предшествующей линии системной терапии, которая включала анти-CD20 антитело и алкилирующий агент, и/или (iii) имеют рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после 2 или нескольких линий терапии или в течение 6 месяцев после завершения технического обслуживания
Когорта 2 (3L r/r FL)	Субъекты ранее получали 2 линии системной терапии, где, по меньшей мере, одна из этих линий представляет собой комбинацию, включающую анти-CD20 антитело (например, ритуксимаб, обинутумаб) и алкилирующий агент. В дополнение к этому требованию, субъекты должны соответствовать одному из следующих критериев высокого риска: (i) имеют рецидив или не поддающееся лечению заболевание в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии и ранее получали комбинированную терапию. Монотерапия PI3Ki является общепринятой терапией, (ii) имеют рецидив после HSCT и/или (iii) соответствуют определению двойной невосприимчивости. Субъекты с двойной невосприимчивостью 3L должны соответствовать одному из следующих критериев: (i) невосприимчивы к системной линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент, (ii) имеют рецидив в течение 6 месяцев после завершения предшествующей линии терапии системной терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент, и/или (iii) имеют рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после 2 или более линий терапии или в

	течение 6 месяцев после завершения поддерживающей терапии
Когорта 3 (2L r/r FL)	Субъекты ранее получали 1 линию комбинированной системной терапии, которая включает анти-CD20 антитело (например, ритуксимаб, обинутузумаб) и алкилирующий агент. Группа субъектов POD24, у которых заболевание прогрессирует в течение 24 месяцев после постановки диагноза и/или начала лечения и которые получили лечение в течение 6 месяцев после первоначального диагноза FL, включена в эту когорту. Субъекты 2L, которые не соответствуют этому определению POD24, должны вместо этого соответствовать одному из модифицированных критериев GELF*: (i) иметь симптомы, связанные с FL (не ограничиваясь В симптомами), (ii) иметь угрозу функции конечных органов или вторичную цитопению к лимфоме или массивной лимфаденопатии (одиночное образование >7 см или 3 или более образований >3 см), (iii) спленомегалия и/или (iv) устойчивое прогрессирование в течение, по меньшей мере, 6 месяцев.
Когорта 4 (3L+ MZL)	Субъекты получали, по меньшей мере, 2 предшествующих системных терапии, где, по меньшей мере, одна линия терапии представляла собой комбинированную системную терапию, терапию анти-CD20 антителом (например, ритуксимабом, обинутузумабом) и алкилирующим агентом, или у них возник рецидив после HSCT. Спленэктомия при селезеночной MZL (SMZL) рассматривается как линия терапии. Антибиотики при экстранодальной MZL (ENMZL) не рассматриваются в качестве предшествующей линии терапии.
* Национальная комплексная онкологическая сеть. Клинические рекомендации NCCN по онкологии (рекомендации NCCN): В-клеточные лимфомы; V4. 2019	

Вводимые терапевтические Т-клеточные композиции, экспрессирующие анти-CD19 CAR, получают с помощью процесса, включающего иммуноаффинное (например, иммуномагнитной селекцией) обогащение клеток CD4⁺ и CD8⁺ из образцов лейкофереза от отдельных субъектов, получавших лечение. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки отдельно активируют и независимо трансдуцируют вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), кодирующим анти-CD19 CAR, с последующим отдельным размножением и криоконсервацией сконструированных клеточных популяций в небольшом объеме. CAR содержит анти-CD19 scFv, полученный из антитела мыши (вариабельная область, полученная из FMC63, ориентация V_L-линкер-V_H), спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую

область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вирусный вектор дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, отделенный от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A, которая служит суррогатным маркером для экспрессии CAR.

Композиции криоконсервированных клеток CD4⁺ и CD8⁺ размораживают перед внутривенным введением. Терапевтическую дозу Т-клеток вводят в виде определенной клеточной композиции путем введения составленной CD4⁺ CAR⁺ клеточной популяции и составленной CD8⁺ CAR⁺ популяции, вводимой в целевом соотношении приблизительно 1:1.

Перед инфузией CAR⁺ Т-клеток, субъекты получают противолимфому химиотерапию флударабином (Flu, 30 мг/м²/день) и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м²/день) в течение трех (3) дней. В некоторых случаях, перед введением противолимфомной химиотерапии, ПЭТ-положительное заболевание повторно подтверждают у субъектов с FL, и КТ-положительное заболевание повторно подтверждают у субъектов с MZL.

Субъекты получают CAR-экспрессирующие Т-клетки через 2-7 дней после противолимфомной терапии. Субъектам вводят разовую дозу 1×10^8 (100×10^6) CAR-экспрессирующих Т-клеток (каждая разовая доза посредством отдельных инфузий в соотношении 1:1 CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток и CD8⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток, соответственно).

Ответ на лечение оценивают на основе рентгенографической оценки опухоли с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и/или компьютерной томографии (КТ) и/или магнитно-резонансной томографии (МРТ) на исходном уровне до лечения и в разное время после лечения (например, на основе классификации Лугано, см., например, Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067). Субъектов с FL в первую очередь оценивают с помощью ПЭТ сканирования, тогда как субъектов с MZL в первую очередь оценивают с помощью КТ/МРТ. Оцениваемые исходы ответа также включают частоту полного ответа (CRR) и общую частоту ответа (ORR). В некоторых случаях также оценивают продолжительность ответа (DOR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и общую выживаемость (OS).

Оценки безопасности также отслеживают и включают сбор нежелательных явлений (АЕ)/серьезных нежелательных явлений (SAE), оценку сопутствующего лечения и процедур, лабораторные оценки, физические осмотры и оценку основных показателей жизнедеятельности. АЕ и лабораторные отклонения (тип, частота и тяжесть) собирают, классифицируют и сообщают в соответствии с Общими терминологическими критериями нежелательных явлений Национального института рака (NCI CTCAE, версия 5.0). См. Министерство здравоохранения и социальных служб США, Опубликовано: 27 ноября 2017. Нежелательные явления, представляющие особый интерес (AESI), включают, но не ограничены ими, синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность (NT), реакцию на инфузию, синдром активации макрофагов (MAS), синдром лизиса опухоли

(TLS), гипогаммаглобулинемию, длительную цитопению, инфекции, вторичное первичное злокачественное новообразование (SPM) и аутоиммунные явления. Синдром высвобождения цитокинов (CRS) и нейротоксичность (NT) оценивают в соответствии с согласованной системой оценки Американского общества трансплантологии и клеточной терапии (ASTCT) (Lee et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2019 Apr; 25(4):625-38). Также отслеживают признаки и симптомы CRS и нейротоксичности.

Другие оцениваемые конечные точки включают фармакокинетику (PK), включая максимальную концентрацию (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), площадь под кривой (AUC) и жизнестойкость CAR-экспрессирующих Т-клеток (например, по оценке с помощью ПЦР); фармакодинамику, включая измерение аплазии периферических В-клеток; качество жизни, связанное со здоровьем (HRQoL), по оценке EORTC QLQ-C30 и/или FACT-LymS.

В некоторых случаях, ответ, безопасность и другие конечные точки оценивают в течение, по меньшей мере, или примерно до 24 месяцев после лечения.

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными описанными вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из приведенного в настоящем документе описания и идей. Такие варианты могут применяться на практике без отклонения от истинного объема и сути описания, и предполагается, что они входят в объем настоящего описания.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (IgG4 шарнир) (ак)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	спейсер (IgG4 шарнир) (нт)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Шарнир-CH3 спейсер
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Шарнир-CH2-CH3 спейсер
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRG	IgD-шарнир-Fc

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
	GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQD LWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEG LLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQ RLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFS PPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRD CVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPK IPSIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из № доступа P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из № доступа P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR S	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 (LL на GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCE L	4-1BB (аминокислоты 214-255 из

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
		Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKAT GQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCH PNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVAL GIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P- где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKD GKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccca	GMCSFR сигнальная последователь ность альфа цепи
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR сигнальная

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
		последовательность альфа цепи
26	MALPVTALLPLALLHA	CD8 сигнальный пептид альфа
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Шарнир
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Шарнир
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTK GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVVDIFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFYFDYWGQGTTVT VSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDIFYFDYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVT CKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRF TGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGT KLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccacccagcctgagcgccagcctggcgaccgggtgacc atcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccg acggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagcc ggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaacctggaacagga agatatgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaac aaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggca gcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcgccctggcctggtggccccagccag agcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccactacggcgtgagctgg atccggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgagacc acctactacaacagcgccctgaagagccggctgacctatcaaggacaacagcaagagcc	Последовательность, кодирующая scFv

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
	aggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaag cactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccg tgagcagc	
58	X ₁ PPX ₂ P X ₁ представляет собой глицин, цистеин или аргинин X ₂ представляет собой цистеин или треонин	Шарнир
59	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индолентной фолликулярной лимфомы (FL) степени 1, 2 или 3А, включающий введение субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии заболевания, которое является рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (г/г) фолликулярной лимфомой (FL) степени 1, 2 или 3А, дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, где Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19, где:

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 CAR-экспрессирующих $CD4^+$ Т-клеток, к CAR-экспрессирующим $CD8^+$ Т-клеткам; и

введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна предшествующая линия терапии представляет собой одну предшествующую линию терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и у него наблюдалось прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после начала одной предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (POD24).

4. Способ по п. 2 или п. 3, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и у него наблюдалось прогрессирование заболевания в течение 24 месяцев после постановки диагноза после завершения лечения одной предшествующей линией терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент (POD24).

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что по меньшей мере одна предшествующая линия терапии, включающая анти-CD20 антитело и алкилирующий агент, представляет собой химиоиммунотерапевтическую комбинированную терапию, включающую ритуксимаб, циклофосфамид, винкристин, доксорубицин и преднизолон (R-CHOP).

6. Способ по одному из пп. 2-5, отличающийся тем, что субъект получил одну предшествующую линию терапии в течение шести месяцев после первоначального диагноза FL.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, и, имеет по меньшей мере, один из следующих симптомов: симптомы, связанные с FL; угроза функции конечных органов, цитопения, вторичная по отношению к лимфоме или массивной лимфаденопатии; спленомегалия; и устойчивое прогрессирование заболевания в течение предшествующих шести месяцев или более.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что по меньшей мере одна предшествующая линия терапии представляет собой две предшествующие линии терапии.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что другая из двух предшествующих линий терапии выбран из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K (PI3Ki), необязательно где PI3Ki представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что субъект невосприимчив к лечению или имеет рецидив в течение 12 месяцев после завершения предшествующей линии терапии, необязательно, где предшествующая линия терапии представляет собой комбинированную терапию или монотерапию, включающую PI3Ki.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив после HSCT.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что по меньшей мере одна предшествующая линия терапии представляет собой три предшествующие линии терапии.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что каждая из двух других из трех предшествующих линий терапии независимо выбрана из лечения ритуксимабом; обинутузумабом; бендамустином плюс ритуксимабом (BR); бендамустином плюс обинутузумабом (BO); R-CHOP; ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном (R-CVP); HSCT (необязательно аутологичной или аллогенной HSCT); леналидомидом в комбинации с ритуксимабом; или ингибитором PI3K (PI3Ki), необязательно где PI3Ki представляет собой иделалисиб, копанлисиб или дувелисиб.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что субъект невосприимчив к лечению анти-CD20 антителом.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что субъект невосприимчив к предшествующей линии терапии, которая включает анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения лечения анти-CD20 антителом.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив в течение шести месяцев после завершения предшествующей линии терапии, включающей анти-CD20 антитело и алкилирующий агент.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив во время поддерживающей терапии анти-CD20 антителом после двух или нескольких линий терапии или в течение шести месяцев после завершения поддерживающей терапии анти-CD20 антителом.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что субъект имеет по меньшей мере одно ПЭТ-положительное поражение и по меньшей мере одно поддающееся измерению узловое поражение или экстранодальное поражение, необязательно, где поддающееся измерению узловое поражение превышает 1,5 см по длинной оси независимо от короткой оси, и измеримое экстранодальное поражение больше 1,0 см по длинной и короткой оси.

20. Способ лечения лимфомы маргинальной зоны (MZL), включающий введение субъекту с рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) лимфомой маргинальной зоны (MZL) или подозрением на нее дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19, где:

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере двух предшествующих линий терапии для лечения MZL;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение примерно 1:1 CAR-экспрессирующих CD4⁺ Т-клеток к CAR-экспрессирующим CD8⁺ Т-клеткам; и

введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что MZL представляет собой подтип, выбранный из экстранодальной MZL (ENMZL, в основном желудочной), MZL селезенки (SMZL) и узловой MZL (NMZL).

22. Способ по п. 20 или п. 21, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию для лечения MZL или представляет собой трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT).

23. Способ по любому из пп. 20-22, отличающийся тем, что, по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию для лечения MZL, и комбинированная системная терапия выбрана из ритуксимаба плюс циклофосфамида, доксорубина, винкристина и преднизона (R-CHOP), или терапии анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом.

24. Способ по любому из пп. 20-23, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой комбинированную системную терапию, которая представляет собой анти-CD20 антитело

и алкилирующий агент.

25. Способ по любому из пп. 20-24, отличающийся тем, что субъект имеет MZL селезенки (SMZL), и по меньшей мере одна из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии представляет собой спленэктомия.

26. Способ по любому из пп. 20-24, отличающийся тем, что субъект имеет экстранодальную MZL (ENMZL), и антибиотик не является одной из по меньшей мере двух предшествующих линий терапии.

27. Способ по любому из пп. 20-26, отличающийся тем, что субъект имеет ПЭТ не авидное заболевание с, по меньшей мере, одним поддающимся измерению узловым поражением более 2,0 см по длинной оси или по меньшей мере одним поддающимся измерению экстранодальным поражением.

28. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что у субъекта нет FL степени 3B (FL3B).

29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что у субъекта нет признаков смешанной DLBCL и FL или трансформированной FL (tFL).

30. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что субъект не имеет подкласса FL дуоденального типа согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что субъект имеет рецидив по меньшей мере на одной предшествующей линии терапии, и рецидив произошел после первоначального полного ответа (CR) или частичного ответа (PR) по меньшей мере на одну предшествующую линию терапии.

32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что субъект невосприимчив по меньшей мере к одной предшествующей линии терапии, и невосприимчивость к лечению представляет собой наилучший ответ стабильного заболевания (SD) или прогрессирующего заболевания (PD) по меньшей мере на одной предшествующей линии терапии.

33. Способ по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что субъект имеет общее состояние по оценке Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) 0 или 1.

34. Способ по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что анти-CD20 антитело представляет собой анти-CD20 моноклональное антитело.

35. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб или обинутузумаб.

36. Способ по любому из пп. 1-35, отличающийся тем, что анти-CD20 антитело представляет собой ритуксимаб.

37. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что алкилирующий агент представляет собой бендамустин или хлорамбуцил.

38. Способ по любому из пп. 1-37, дополнительно включающий введение субъекту противолимфомной терапии перед введением дозы CD4+ и CD8+ Т-клеток.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что противолимфомная терапия

завершается примерно за 7 дней до начала введения дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

40. Способ по п. 38 или п. 39, отличающийся тем, что введение противолимфомной терапии завершают примерно за 2-7 дней до начала введения дозы CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

41. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида.

42. Способ по любому из пп. 38-41, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе точно или примерно 200-400 мг/м², необязательно в дозе точно или примерно 300 мг/м², включительно, и/или флударабина в дозе точно или примерно 20-40 мг/м², необязательно, 30 мг/м², ежедневно, в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней.

43. Способ по любому из пп. 38-42, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе точно или примерно 300 мг/м² и флударабина в дозе точно или примерно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней.

44. Способ по любому из пп. 1-43, отличающийся тем, что CD19 представляет собой CD19 человека.

45. Способ по любому из пп. 1-44, отличающийся тем, что химерный антигенный рецептор (CAR) содержит scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела FMC63, спейсер, содержащий менее 15 аминокислот и содержащий шарнирную область иммуноглобулина или ее модифицированную версию, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) и костимуляторную сигнальную область, которая представляет собой сигнальный домен 4-1BB.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия содержит формулу X₁PPX₂P, где X₁ представляет собой глицин, цистеин или аргинин, и X₂ представляет собой цистеин или треонин (SEQ ID NO: 58).

47. Способ по п. 45 или п. 46, отличающийся тем, что шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия представляет собой шарнир IgG1 или его модифицированную версию.

48. Способ по п. 45 или п. 46, отличающийся тем, что шарнирная область иммуноглобулина или ее модифицированная версия представляет собой шарнир IgG4 или его модифицированную версию.

49. Способ по любому из пп. 45-48, отличающийся тем, что спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34, или вариант любой из вышеуказанных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

50. Способ по любому из пп. 45-49, отличающийся тем, что спейсер состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34, или варианта любой из вышеперечисленных, имеющего, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

51. Способ по любому из пп. 45-50, отличающийся тем, что спейсер имеет длину примерно 12 аминокислот.

52. Способ по любому из пп. 45-51, отличающийся тем, что спейсер содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

53. Способ по любому из пп. 45-52, отличающийся тем, что спейсер состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

54. Способ по любому из пп. 45-53, отличающийся тем, что трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

55. Способ по любому из пп. 45-54, отличающийся тем, что трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8.

56. Способ по любому из пп. 45-55, отличающийся тем, что костимулирующий домен содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12.

57. Способ по любому из пп. 45-56, отличающийся тем, что сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или представляет собой ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

58. Способ по любому из пп. 45-57, отличающийся тем, что scFv содержит последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 35, последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 55 и последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 56; и последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 38, последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 39 и последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 54.

59. Способ по любому из пп. 45-57, отличающийся тем, что scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); и последовательность CDRH1 DYGVVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYYN SALKS (SEQ ID NO: 39) и последовательность CDRH3

YAMDYWG (SEQ ID NO: 40).

60. Способ по любому из пп. 45-59, отличающийся тем, что scFv содержит, по порядку от N-конца к С-концу, V_L , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, и V_H , содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

61. Способ по любому из пп. 45-60, отличающийся тем, что scFv содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

62. Способ по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что CAR содержит, по порядку от N-конца к С-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, представляющий собой scFv, представленный в SEQ ID NO: 43, спейсер, представленный в SEQ ID NO: 1, трансмембранный домен, представленный в SEQ ID NO: 8, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, представленный в SEQ ID NO: 12, и сигнальный домен цепи CD3-дзета ($CD3\zeta$), представленный в SEQ ID NO: 13.

63. Способ по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что доза $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток составляет от примерно 5×10^7 CAR+ Т-клеток до примерно $1,1 \times 10^8$ CAR+ Т-клеток, каждый включительно.

64. Способ по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что доза $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток составляет 5×10^7 CAR+ Т-клеток.

65. Способ по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что доза $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток составляет 1×10^8 CAR+ Т-клеток.

66. Способ по любому из пп. 1-65, отличающийся тем, что:
первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов, или где введение первой композиции и введение второй композиции осуществляют в один и тот же день, с интервалом от примерно 0 до примерно 12 часов, с интервалом от примерно 0 до примерно 6 часов или с интервалом от примерно 0 до 2 часов; и/или
начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом от примерно 1 минуты до примерно 1 часа или от примерно 5 минут до примерно 30 минут.

67. Способ по любому из пп. 1-66, отличающийся тем, что первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более 2 часов, не более 1 часа, не более 30 минут, не более 15 минут, не более 10 минут или не более 5 минут.

68. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом менее 2 часов.

69. Способ по любому из пп. 1-68, отличающийся тем, что первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, вводят до введения второй композиции, содержащей $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

70. Способ по любому из пп. 1-69, отличающийся тем, что дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток вводят внутривенно.

71. Способ по любому из пп. 1-70, отличающийся тем, что Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные из образца субъекта, необязательно, где образец

представляет собой образец цельной крови, образец афереза или образец лейкофереза.

72. Способ по п. 71, отличающийся тем, что образец получают от субъекта перед введением субъекту противолимфомной терапии.

73. Способ по любому из пп. 1-72, отличающийся тем, что Т-клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

74. Способ по любому из пп. 1-73, отличающийся тем, что субъектом является человек.

75. Способ по любому из пп. 1-74, отличающийся тем, что частота полного ответа (CRR) среди множества субъектов, пролеченных в соответствии с данным способом, выше чем точно или примерно 50%, выше чем точно или примерно 60%, выше, чем точно или примерно 70% или выше, чем точно или примерно 80%.

76. Способ по п. 75, отличающийся тем, что CRR представляет собой долю субъектов с лучшим общим ответом (BOR) до 24 месяцев полного ответа (CR).

77. Способ по п. 75 или п. 76, отличающийся тем, что субъект имеет FL степени 1, 2 или 3А, и CRR оценивают с помощью ПЭТ-КТ.

78. Способ по п. 75 или п. 76, отличающийся тем, что субъект имеет MZL, и CRR оценивают с помощью КТ.

79. Применение дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток для лечения субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии заболевания, которое представляет собой рецидивирующую/трудно поддающуюся лечению (r/r) фолликулярную лимфому (FL) степени 1, 2 или 3А, где:

Т-клетки дозы содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующий агент;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения в виде множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

80. Применение дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии заболевания, являющегося рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (r/r) фолликулярной лимфомой (FL) 1 степени, 2 или 3А, где:

Т-клетки дозы содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который

специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или невосприимчивость к лечению после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии для лечения FL степени 1, 2 или 3А, где по меньшей мере одна из по меньшей мере одной предшествующей линии терапии включает лечение анти-CD20 антителом и алкилирующим агентом;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения в виде множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

81. Применение дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток для лечения субъекта с рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (г/г) лимфомой маргинальной зоны (MZL) или с подозрением на нее, где:

Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии для лечения MZL;

доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

доза составлена для введения множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую $CD8^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую $CD4^+$ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

82. Применение дозы $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего рецидивирующей/трудно поддающейся лечению (г/г) лимфомой маргинальной зоны (MZL) или с подозрением на нее, где:

Т-клетки в дозе содержат химерный антигенный рецептор (CAR), который специфически связывается с CD19;

субъект имеет рецидив или он невосприимчив к лечению после, по меньшей мере, двух предшествующих линий терапии для лечения MZL;

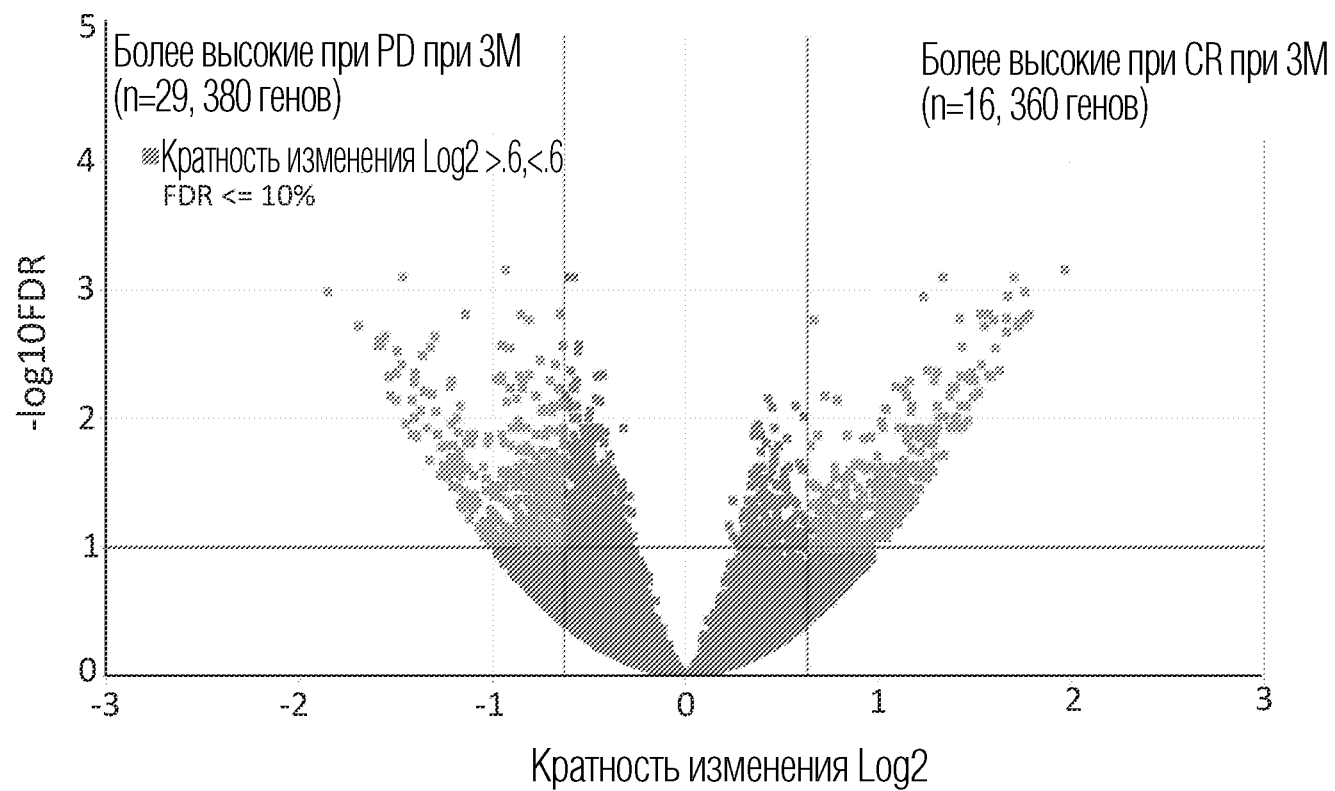
доза Т-клеток составляет от точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток до точно или примерно $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, включительно;

доза Т-клеток имеет соотношение приблизительно 1:1 $CD4^+$ CAR-экспрессирующих Т-клеток к $CD8^+$ CAR-экспрессирующим Т-клеткам; и

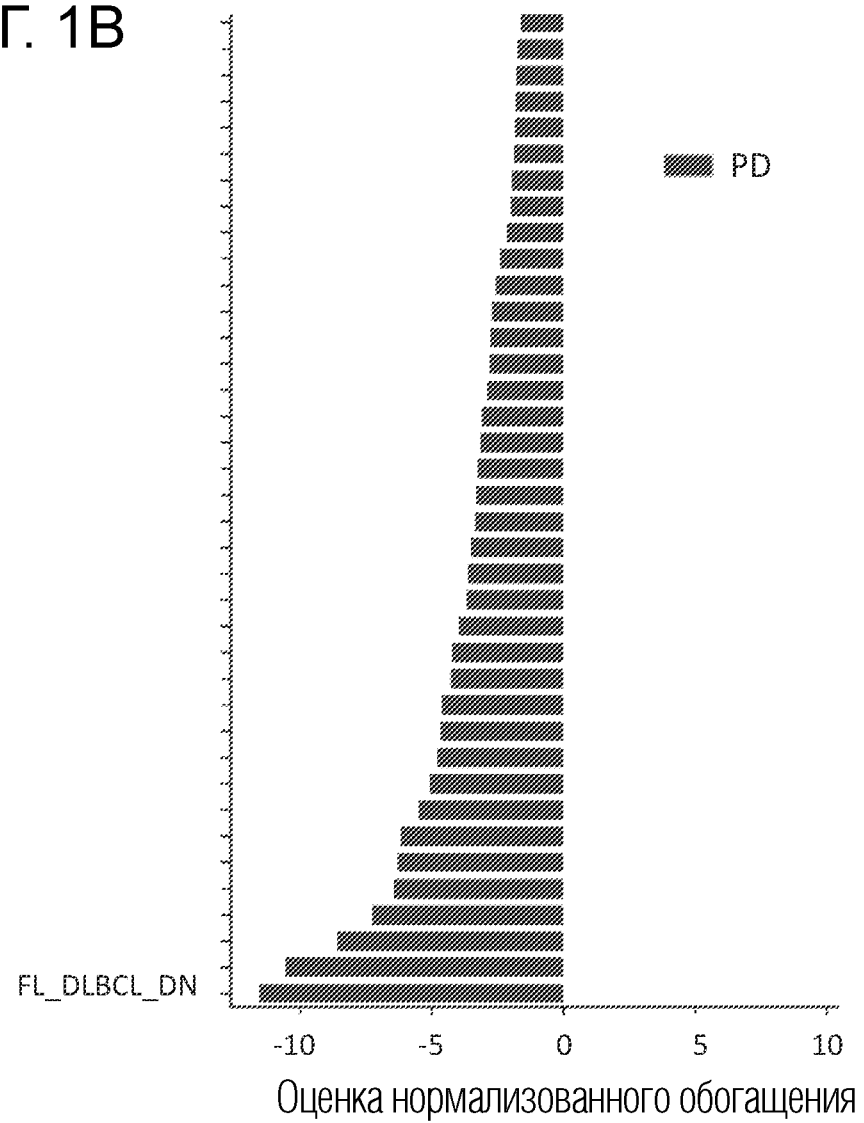
доза составлена для введения множества отдельных композиций, где множество

отдельных композиций включает первую композицию, содержащую CD8⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки, и вторую композицию, содержащую CD4⁺ CAR-экспрессирующие Т-клетки.

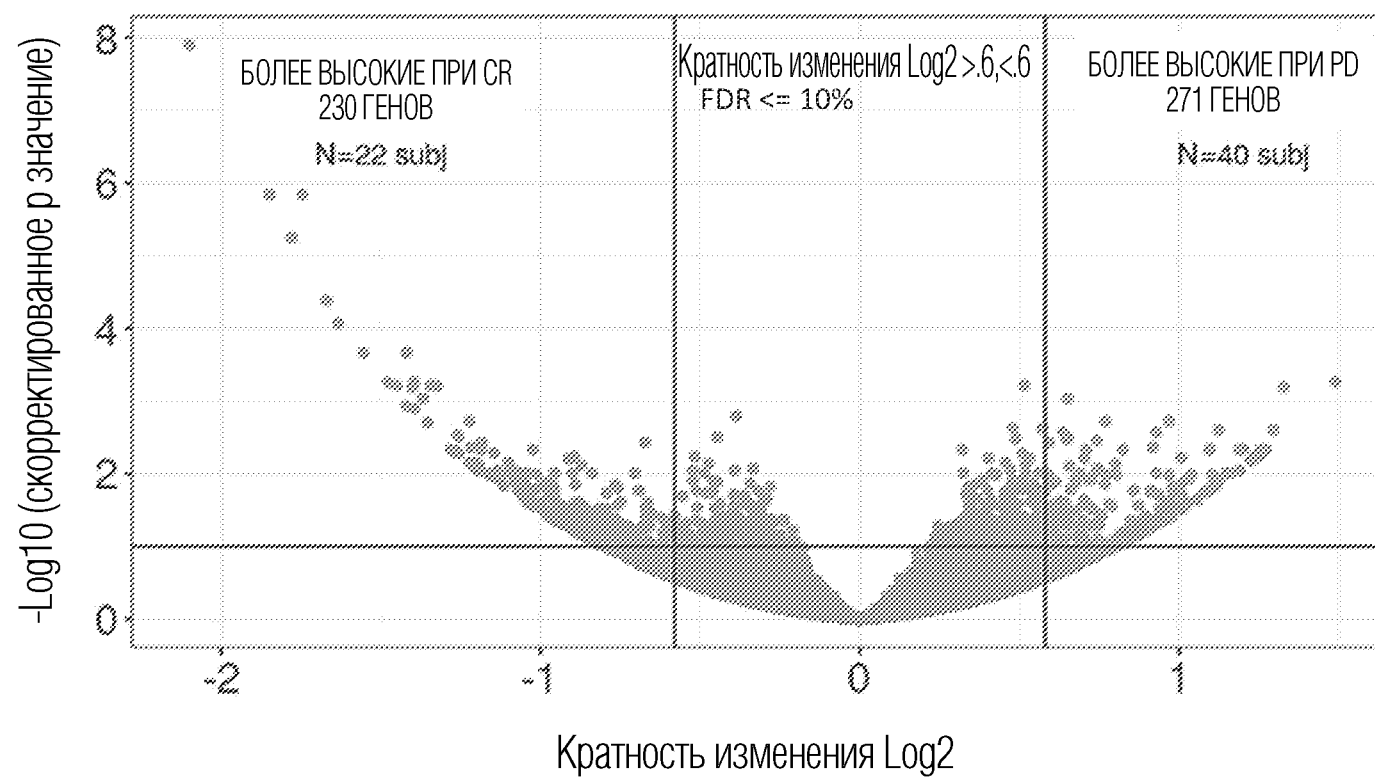
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



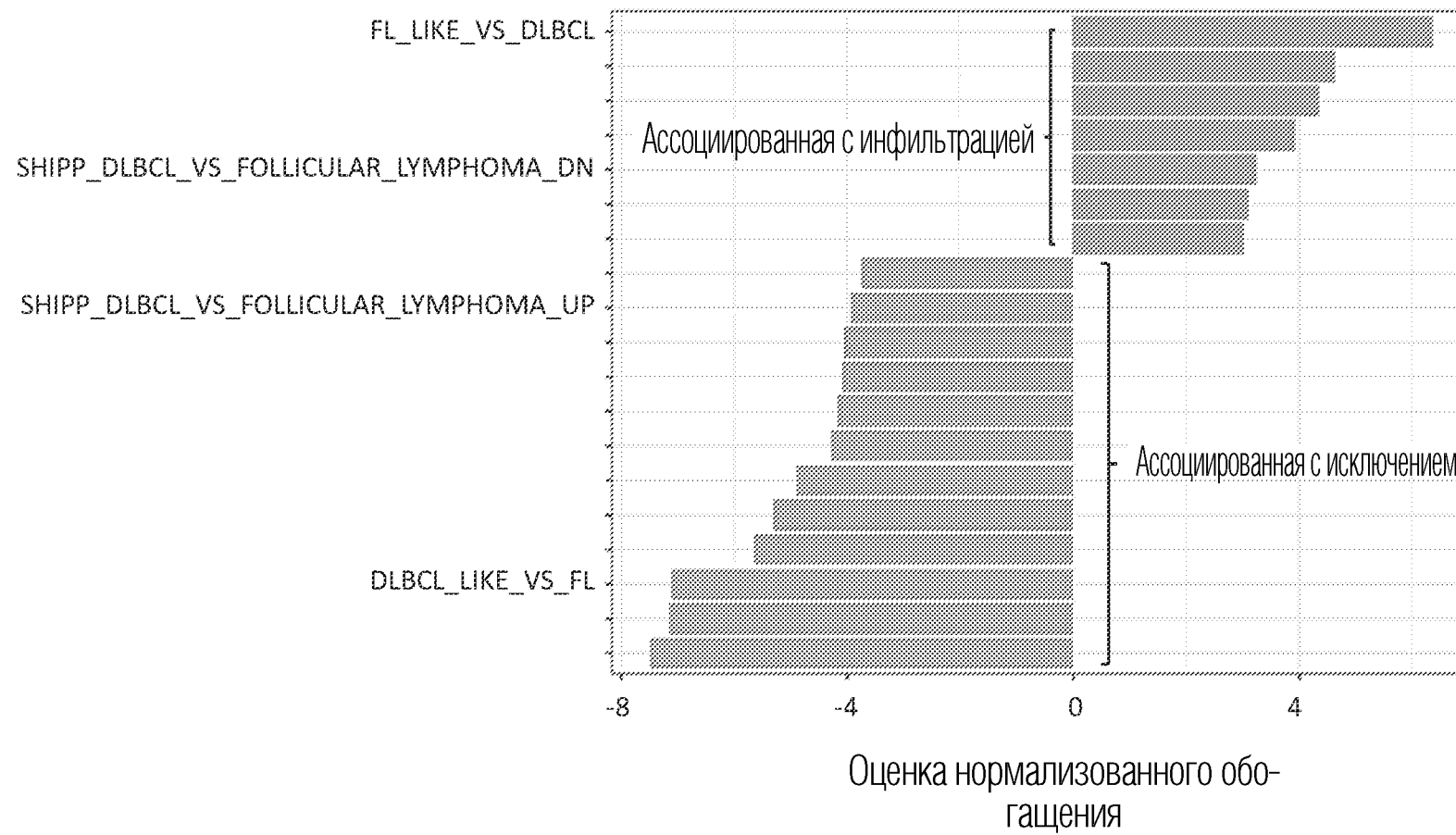
ФИГ. 2А



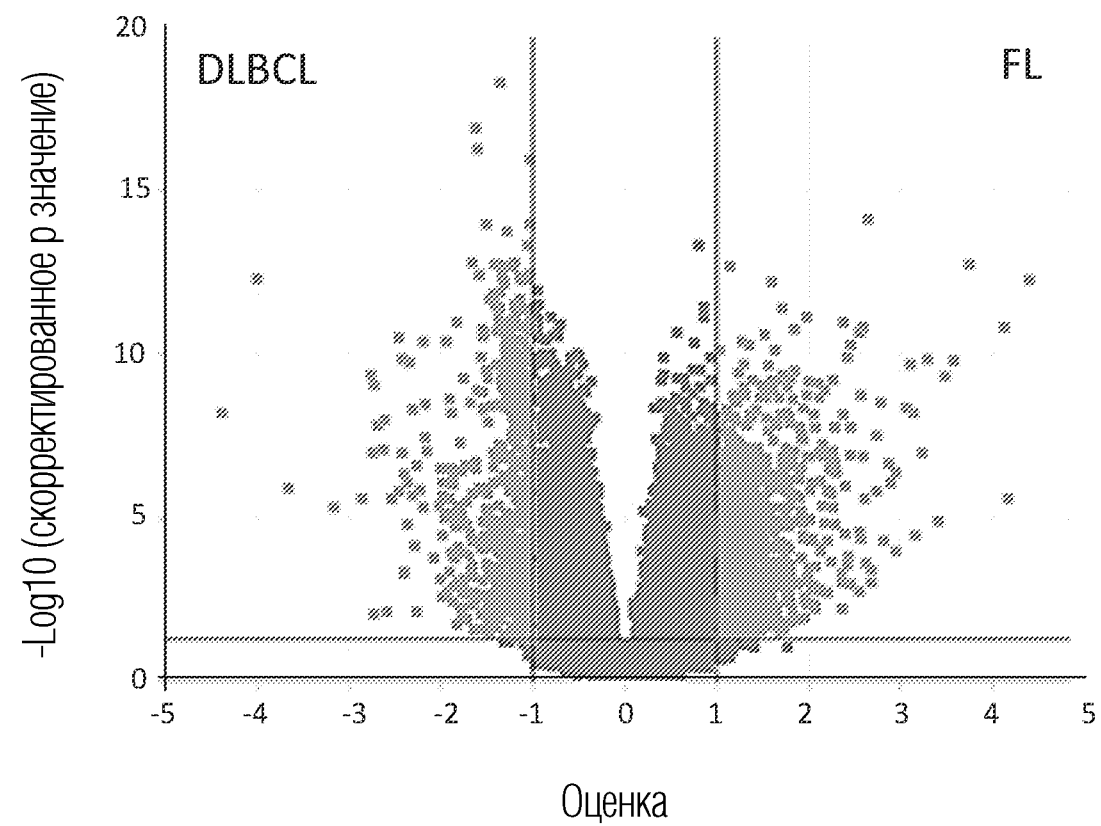
Horizontal bar chart showing normalized enrichment scores for various gene sets. The x-axis is labeled 'Оценка нормализованного обогащения' (Normalized Enrichment Score) and ranges from -5 to 10. The y-axis lists gene sets: DLBCL_LIKE_VS_FL, SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP, SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN, and FL_LIKE_VS_DLBCL. Brackets indicate 'Обогащен 3M PD' (Enriched 3M PD) for the top group and 'Обогащен 3M CR' (Enriched 3M CR) for the bottom group.

Gene Set	Normalized Enrichment Score (Approx.)
DLBCL_LIKE_VS_FL	10.2
	10.0
	8.5
	7.0
	6.0
	5.2
	5.0
	4.5
	4.2
SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP	4.0
	3.8
	3.5
	3.2
	3.0
	2.8
	2.5
	2.2
SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN	2.0
	1.8
FL_LIKE_VS_DLBCL	-7.0

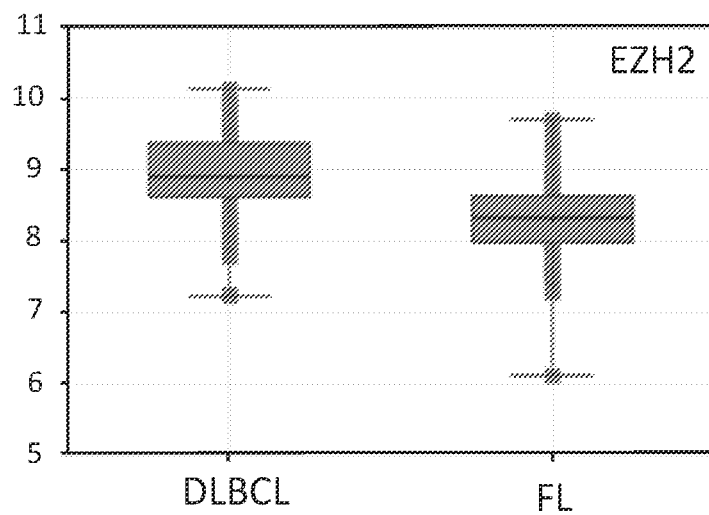
ФИГ. 2С



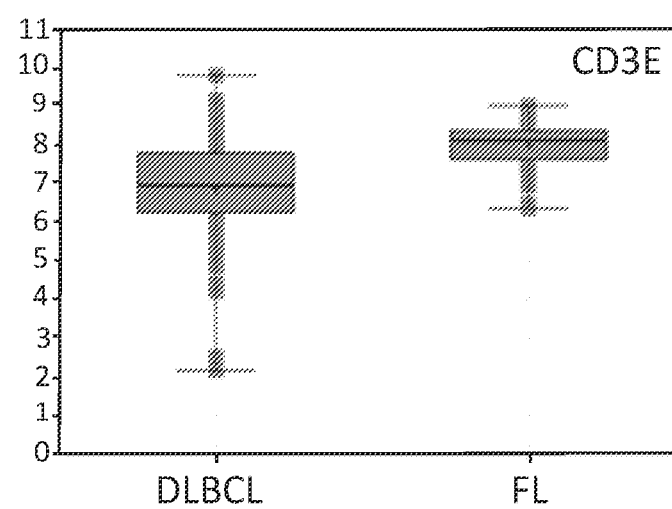
ФИГ. 3



ФИГ. 4А

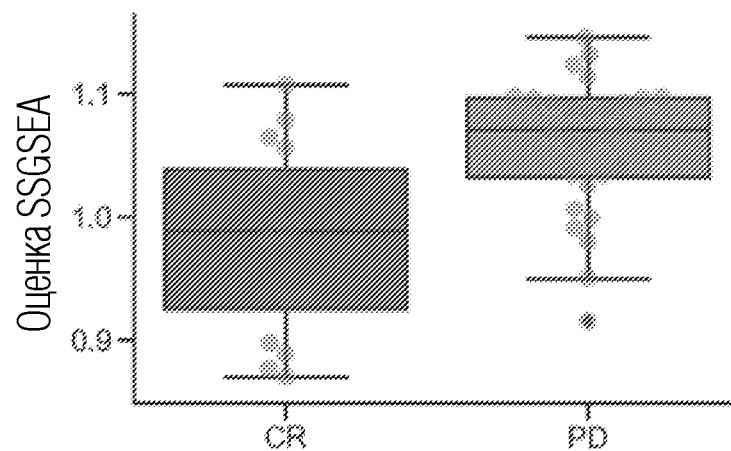


ФИГ. 4В



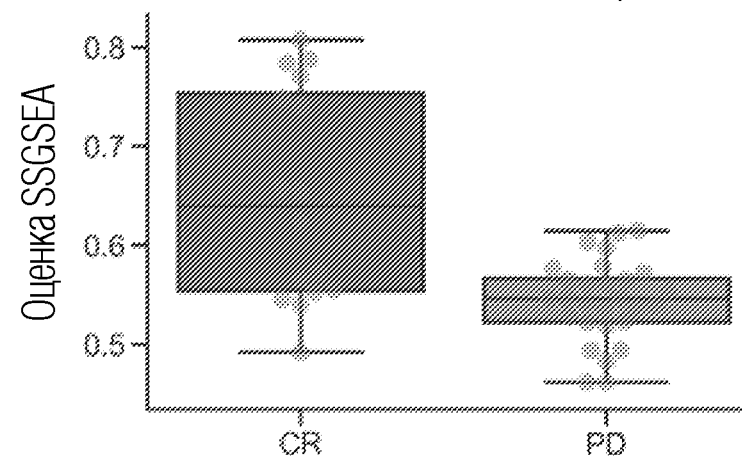
ФИГ. 5А

DLBCL-подобные набор генов

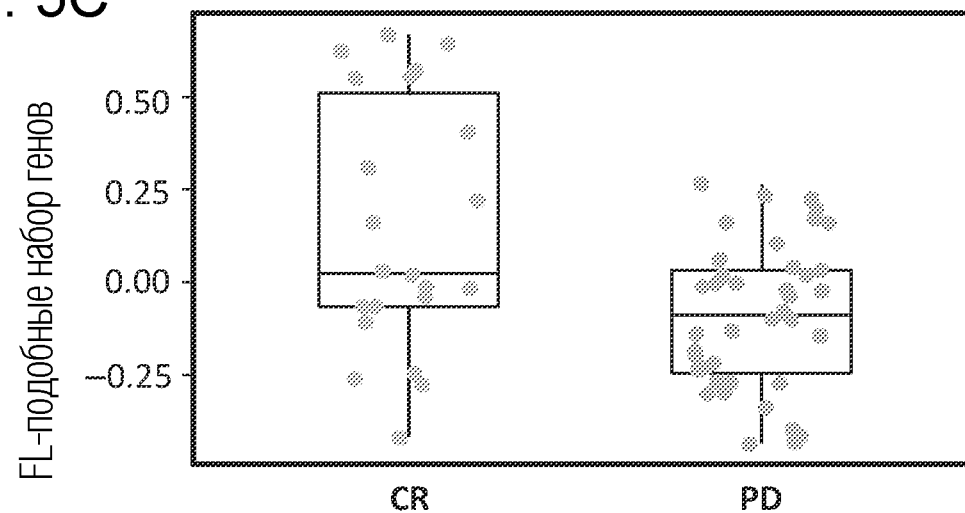


ФИГ. 5В

FL-подобные набор генов



ФИГ. 5С



Ответ 3М

ФИГ. 5D

