

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042449

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.15

(21) Номер заявки
201991100

(22) Дата подачи заявки
2017.11.03

(51) Int. Cl. A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ Т-КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ К ВСМА
(ВАРИАНТЫ)

(31) 62/417,840; 62/514,401

(32) 2016.11.04; 2017.06.02

(33) US

(43) 2019.09.30

(86) PCT/US2017/059989

(87) WO 2018/085690 2018.05.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
2СЭВЭНТИ БИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Куигли Трэвис, Росс Роберт (US)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A2-2016094304
US-A1-20160046724
US-A1-20160002601

(57) Настоящее изобретение относится к улучшенным композициям Т-клеток с CAR к ВСМА, для адоптивной Т-клеточной терапии рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы.

042449 B1

042449 B1

042449

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с §119(e) раздела 35 Свода законов США на основании предварительной заявки на патент США № 62/514401, поданной 2 июня 2017 г., и предварительной заявки на патент США № 62/417840, поданной 4 ноября 2016 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Заявление о перечне последовательностей

Перечень последовательностей, относящийся к настоящей заявке, предоставлен в текстовом формате вместо бумажной копии и настоящим включен посредством ссылки в описание. Файл в текстовом формате, содержащий перечень последовательностей, имеет название "BLBD_079_02WO_ST25.txt". Файл в текстовом формате имеет размер 27 Кб, был создан 3 ноября 2017 года и подан в электронном виде с помощью EFS-Web одновременно с подачей описания.

Уровень техники

Область техники

Настоящее изобретение относится к улучшенным композициям и способам лечения связанных с В-клетками состояний. Более конкретно, настоящее изобретение относится к улучшенным композициям, содержащим терапевтические дозы Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) к ВСМА, для лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы.

Описание предшествующего уровня техники

Химерные антигенные рецепторы (CAR) Т-клеток представляют собой молекулы, которые сочетают специфичность антител к желаемому антигену и внутриклеточный домен, активирующий рецепторы Т-клеток; в результате получается химерный белок, который проявляет специфичную противораковую иммунную активность. CAR придают собственным Т-клеткам пациента способность напрямую распознавать и уничтожать раковые клетки. Технология CAR-Т-клеток быстро развивалась, но ей ещё предстоит реализовать свой терапевтический потенциал. Клиническое применение CAR-Т-клеток при гематологических злокачественных новообразованиях затруднено несколькими препятствиями.

Большинство терапевтических средств на основе CAR-Т-клеток, применяемых при гематологических злокачественных новообразованиях, связано с синдромом высвобождения цитокинов (CRS) или цитокиновой бурей. CRS характерен для разных видов адоптивной клеточной иммунотерапии, проявляется симптомами, сходными с септическим шоком, и в конечном итоге может привести к смерти пациента. Действительно, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) временно приостановило ряд клинических исследований из-за связанных с CRS смертей в исследованиях CAR-Т-клеток. CRS может быть быстрым и непредсказуемым, и в настоящее время нет единого мнения касательно предотвращения и лечения CRS. Однако терапевтическая доза CAR-Т-клеток является одной из факторов CRS.

CAR-Т-клетки являются "живыми лекарственными препаратами", которые способны размножаться в условиях *in vivo* после инфузии и возвращаться в костный мозг. Например, в пионерском исследовании, проведенном UPenn, опубликованном в 2011 году, всего $1,5 \times 10^5$ CAR-Т-клеток, введенных пациентам с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ), со временем размножились в условиях *in vivo* более чем в 1000 раз. Соответственно, терапия на основе CAR-Т-клеток связана с беспрецедентным набором проблем в отношении дозирования.

Отсутствует единое мнение о дозировке CAR-Т-клеток при инфузии и влияющих на нее факторах, включая опухолевую нагрузку, эффективность и побочные эффекты. Инфузии малых доз могут не дать оптимального лечебного эффекта, а, наоборот, могут вызывать делецию опухолевого антигена и ускользание антигена. Инфузии больших доз и серьезная опухолевая нагрузка увеличат CRS и синдром лизиса опухоли. В связи с тем, что это живой лекарственный препарат, определение правильной терапевтической дозы является непредсказуемым. Общепринятые фармакокинетические и фармакодинамические представления о взаимодействии лекарственного препарата с организмом нельзя просто распространить на терапию на основе CAR-Т-клеток, поскольку CAR-Т-клетки являются динамичным, живым и устойчивым лекарственным препаратом.

Некоторые проблемы, касающиеся выбора дозы, включают небольшое количество соответствующих моделей на животных, то, что первые продукты человеческого происхождения имеют ограниченную "априорную" информацию, размножение клеток человека в условиях *in vivo* является непредсказуемым, имеются ограничения при "заимствовании" данных по безопасности для продуктов CAR-Т-клеток первого поколения, при экстраполировании данных по безопасности для родственных продуктов (TIL, "сходные" TCR-перенаправлены клетки, "сходный" класс продукта CAR-Т-клеток) и при экстраполировании данных по безопасности при применении аналогичного продукта в типе (ах) опухоли (ей), имеющем (их) другие гистологические характеристики, но не ограничиваются перечисленными.

Соответственно, современные подходы к дозировке CAR-Т-клеток, по-видимому, недостаточно разработаны, чтобы предсказать терапевтически эффективную дозу CAR-Т-клеток среди Т-клеток, содержащих различные CAR, для применения по одному и тому же показанию и среди тех же CAR-Т-клеток для применения по разным показаниям.

Краткое описание

В целом настоящее изобретение относится к улучшенным композициям Т-клеток с CAR к BCMA, и способам их применения для лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения предложена композиция, содержащая терапевтически эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) к антигену созреваия В-клеток (BCMA), причем терапевтически эффективное количество превышает приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA, и CAR к BCMA, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция изготовлена в растворе, содержащем PlasmaLyte A и CryoStor CS10 в соотношении 50:50.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет по меньшей мере приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет по меньшей мере приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет по меньшей мере приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет по меньшей мере приблизительно $12,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $12,0 \times 10^8$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA до приблизительно $12,0 \times 10^8$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки с CAR к BCMA, трансдуцированы лентивирусным вектором, кодирующим CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения количество копий лентивирусного вектора (VCN) составляет приблизительно 2,0 копии на одну Т-клетку с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лентивирусный вектор представляет собой вектор на основе вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим CAR к BCMA, причем популяция Т-клеток содержит более приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA, и CAR к BCMA, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит терапевтически приемлемый носитель.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит по меньшей мере приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит по меньшей мере приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит по меньшей мере приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит по меньшей мере приблизительно $12,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к BCMA.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит приблизительно $12,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $5,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $12,0 \times 10^8$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит от приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА до приблизительно $12,0 \times 10^8$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки содержат $CD8^+$ Т-клетки.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения также предложен способ лечения субъекта, у которого диагностирована рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома, включающий введение субъекту композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой, включающий введение субъекту композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композицию вводят в однократной дозе.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композицию вводят внутривенно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения до введения композиции множественная миелома была рефрактерна по меньшей мере к трем схемам лечения, включая ингибитор протеасом и иммуномодулирующий агент.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения до введения композиции множественная миелома была рефрактерна к одной или более схемам лечения.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения до введения композиции субъекта лечили с применением даратумумаба, леналидомида, помалидомида, бортезомиба и/или карфилзомиба.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения до введения композиции субъекту трансплантировали аутологичные гемопоэтические стволовые клетки.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения субъект перенес истощение лимфоцитов с применением 300 мг/м^2 циклофосфида и 30 мг/м^2 флударабина.

Краткое описание представленных графических материалов

На фиг. 1 представлена схема конструкции CAR к мышинному антигену созреваия В-клеток (muB-CMA).

На фиг. 2A представлены сопоставимые уровни размножения для Т-клеток с CAR к ВСМА, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) 11 отдельных доноров по сравнению с соответствующей культурой нетрансдуцированных донорских Т-клеток.

На фиг. 2B представлены сопоставимые уровни эффективности лентивирусной трансдукции (VCN) в Т-клетках с CAR к ВСМА, полученных из МКПК 11 отдельных доноров.

На фиг. 2C представлена сопоставимая экспрессия CAR к ВСМА, измеренная методом проточной цитометрии в Т-клетках с CAR к ВСМА, полученных из МКПК 11 отдельных доноров.

На фиг. 2D представлены сопоставимые уровни высвобождения ИФН- γ при воздействии клеток линии K562, экспрессирующих ВСМА, на Т-клетки с CAR к ВСМА, полученные из МКПК 11 отдельных доноров.

На фиг. 3 представлены результаты оценки клинического ответа с течением времени у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой, получавших Т-клетки с CAR к ВСМА.

Краткое описание идентификаторов последовательностей

В SEQ ID NO: 1-3 представлены аминокислотные последовательности примеров последовательностей CDR легкой цепи для CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

В SEQ ID NO: 4-6 представлены аминокислотные последовательности примеров последовательностей CDR тяжелой цепи для CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

В SEQ ID NO: 7 представлена аминокислотная последовательность примера последовательности легкой цепи для CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

В SEQ ID NO: 8 представлена аминокислотная последовательность примера последовательности тяжелой цепи для CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

В SEQ ID NO: 9 представлена аминокислотная последовательность примерного CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

В SEQ ID NO: 10 представлена полинуклеотидная последовательность, которая кодирует примерный CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

В SEQ ID NO: 11 представлена аминокислотная последовательность человеческого BCMA.

В SEQ ID NO: 12-22 представлены аминокислотные последовательности различных линкеров.

В SEQ ID NO: 23-35 представлены аминокислотные последовательности сайтов расщепления протеазой и сайтов саморасщепления полипептида.

В SEQ ID NO: 36 представлена полинуклеотидная последовательность вектора, кодирующего CAR к BCMA.

Подробное описание

А. Обзор.

В данной области техники имеются существенные проблемы, касающиеся предсказания терапевтически эффективной дозы CAR-T-клеток в отношении конкретного CAR и его целевого показателя. Настоящее изобретение в целом относится к улучшенным композициям Т-клеток с CAR к BCMA, и способам лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы.

Антиген созреваия В-клеток (BCMA, также известный как CD269 или член 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей; TNFRSF17) является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (см. например, Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192(1): 129-135, 2000, и Mackay et al., Annu. Rev. Immunol, 21: 231-264, 2003). BCMA связывает фактор активации В-клеток (BAFF) и индуцирующий пролиферацию лиганд (APRIL) (см., например, Mackay et al., 2003 и Kalled et al., Immunological Reviews, 204: 43-54, 2005). Сообщалось, что в незлокачественных клетках BCMA экспрессируется в основном в плазматических клетках и подгруппах зрелых В-клеток (см., например, Laabi et al., EMBO J., 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled et al., 2005; O'Connor et al., J. Exp. Medicine, 199(1): 91-97, 2004; и Ng et al., J. Immunol, 73(2): 807-817, 2004). Мыши, дефицитные по BCMA, являются здоровыми и имеют нормальное количество В-клеток, но выживание долгоживущих плазматических клеток нарушается (см., например, O'Connor et al., 2004; Xu et al., Mol Cell. Biol, 21(12): 4067-4074, 2001; и Schiemann et al., Science, 293(5537): 2111-2114, 2001). РНК BCMA повсеместно детектируется в клетках множественной миеломы и в других лимфомах, и белок BCMA детектировался несколькими исследователями на поверхности плазматических клеток от пациентов с множественной миеломой (см., например, Novak et al., Blood, 103(2): 689-694, 2004; Neri et al., Clinical Cancer Research, 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci et al., Blood, 105(10): 3945-3950, 2005; и Moreaux et al., Blood, 703(8): 3148-3157, 2004).

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения улучшенные композиции для адоптивной клеточной терапии согласно настоящему изобретению содержат терапевтически эффективные дозы Т-клеток с CAR к BCMA, которые, вопреки ожиданиям, размножаются и вызывают клинические ответы в условиях *in vivo* при отсутствии тяжелого синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения улучшенные композиции, содержащие терапевтически эффективные дозы Т-клеток с CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению, применяют для лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы.

При реализации настоящего изобретения можно применять, если не указано иное, обычные способы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методики рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые известны специалистам в данной области техники, многие из которых описаны ниже с целью иллюстрации. Такие методики подробно описаны в литературе. Смотри, например, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 изд., 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 изд., 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, обновлено в июле 2008 г.); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Inter science; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A.

M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); Annual Review of Immunology; а также монографии в журналах, таких как Advances in Immunology.

В. Определения.

Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящем документе в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в соответствующей области техники. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно применять при практической реализации или испытании настоящего изобретения, в настоящем документе описаны предпочтительные варианты реализации композиций, способов и материалов. Для целей настоящего изобретения следующие термины определены ниже.

В настоящем документе термин, обозначающий элемент в единственном числе (соотв. артиклям "а" или "an" в исходном тексте на английском языке), используется для обозначения одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного или одного или более) объекта, обозначаемого этим термином. Например, "элемент" означает один элемент или один или более элементов.

Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как одну, обе или любую комбинацию альтернатив.

Термин "и/или" следует понимать как означающий либо одну, либо обе альтернативы.

В настоящем документе термин "примерно" или "приблизительно" относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, величине, массе или длине, которые варьируются до 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от контрольного количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, величины, массы или длины. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, величины, массы или длины ± 20 , ± 15 , ± 10 , ± 9 , ± 8 , ± 7 , ± 6 , ± 5 , ± 4 , ± 3 , ± 2 или $\pm 1\%$ от контрольного количества, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, величины, массы или длины.

По всему описанию, если контекст не требует иного, слова "содержат", "содержит" и "содержащий" следует понимать, как подразумевающие включение указанного этапа или элемента или группы этапов или элементов, но не исключение какого-либо другого этапа или элемента или группы этапов или элементов. Под "состоящий из" подразумевается включение и ограничение элементами, следующими после выражения "состоящий из". Таким образом, выражение "состоящий из" указывает на то, что перечисленные элементы необходимы или обязательны, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Термин "состоящий по существу из" означает включение любых элементов, перечисленных после выражения, и ограничивается другими элементами, которые не препятствуют или не способствуют активности или действию, указанному в описании для перечисленных элементов. Таким образом, выражение "состоящий по существу из" указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными и что отсутствуют другие элементы, которые существенным образом влияют на активность или действие перечисленных элементов.

Ссылка по всему тексту описания на "один вариант реализации", "вариант реализации", "конкретный вариант реализации", "связанный вариант реализации", "определенный вариант реализации", "дополнительный вариант реализации" или "другой вариант реализации" или их комбинации означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные применительно к варианту реализации, включены в по меньшей мере один вариант реализации настоящего изобретения. Соответственно, упоминания выражений, указанных выше, в различных местах данного описания не обязательно все относятся к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим способом в одном или более вариантах реализации. Также следует понимать, что положительное перечисление признака в одном варианте реализации настоящего изобретения служит основой для исключения признака в конкретном варианте реализации.

"Полипептид", "полипептидный фрагмент", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо, если не указано иное, и в соответствии с общепринятым значением, т.е. как последовательность аминокислот. Полипептиды не ограничиваются конкретной длиной, например, они могут содержать полноразмерную последовательность белка или фрагмент полноразмерного белка, а также могут включать посттрансляционные модификации полипептида, например, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т.п., а также другие модификации, известные в данной области техники, как природные, так и не природные. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения полипептиды CAR согласно настоящему изобретению содержат сигнальную (или лидерную) последовательность на N-концевом участке белка, которая котрансляционно или посттрансляционно направляет перенос белка. Иллюстративные примеры подходящих сигнальных последовательностей, которые можно применять в CAR, раскрытых в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, сигнальную последовательность тяжелой цепи IgG1 и сигнальную последовательность CD8 α . Полипептиды могут быть получены с применением любой из множества хорошо известных рекомбинантных и/или синтетических методик. Полипептиды согласно настоящему изобретению, в частности, включают CAR согласно настоящему изобретению или последовательности, которые имеют делеции, добавления и/или замены одной

или более аминокислот CAR, описанного в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения термин "полипептид" дополнительно включает варианты, фрагменты и гибридные полипептиды.

В настоящем документе "изолированный пептид" или "выделенный полипептид" и т.п. относятся к выделению и/или очистке молекулы пептида или полипептида в условиях *in vitro* из клеточного окружения и от ассоциации с другими компонентами клетки, т.е. он существенно не ассоциирован с веществами в условиях *in vivo*. Аналогичным образом, "выделенная клетка" относится к клетке, которая была получена из ткани или органа в условиях *in vivo* и по существу не содержит внеклеточный матрикс.

Варианты полипептида могут отличаться от природного полипептида одной или более заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут быть природными или могут быть получены синтетическим путем, например, путем модификации одной или более вышеуказанных полипептидных последовательностей. Например, в конкретных вариантах реализации желательным может быть улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств CAR за счет введения одной или более замен, делеций, добавлений и/или вставок в связывающий домен, шарнир, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный домен или первичный сигнальный домен полипептида CAR. Предпочтительно полипептиды согласно настоящему изобретению включают полипептиды, аминокислотная последовательность которых идентична по меньшей мере приблизительно на 65, 70, 75, 85, 90, 95, 98 или 99% указанным полипептидам.

Полипептиды включают "полипептидные фрагменты". Полипептидные фрагменты относятся к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным и который имеет amino-концевую делецию, карбокси-концевую делецию и/или внутреннюю делецию или замену в природном или полученном рекомбинантным способом полипептиде. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения полипептидный фрагмент может содержать аминокислотную цепь из по меньшей мере 5-500 аминокислот в длину. Следует понимать, что согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагменты содержат по меньшей мере 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, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот в длину.

Гибридные полипептиды и гибридные белки относятся к полипептиду, имеющему по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять или более полипептидных сегментов.

В настоящем документе термин "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота" относится к информационной РНК (иРНК), РНК, геномной РНК (гРНК), плюс-цепи РНК (РНК(+)), минус-цепи РНК (РНК(-)), геномной ДНК (гДНК), комплементарной ДНК (кДНК) или рекомбинантной ДНК. Полинуклеотиды включают одноцепочечные и двухцепочечные полинуклеотиды. Предпочтительно полинуклеотиды согласно настоящему изобретению включают полинуклеотиды или варианты, последовательности которых по меньшей мере приблизительно на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны любой из эталонных последовательностей, описанных в настоящем документе (см., например, Перечень последовательностей), как правило, если вариант сохраняет по меньшей мере один вид биологической активности эталонной последовательности. Согласно различным иллюстративным вариантам реализации настоящее изобретение относится в том числе к полинуклеотидам, содержащим векторы экспрессии, вирусные векторы и переносящие плазмиды, а также к композициям и клеткам, содержащим их.

В настоящем документе термин "выделенный полинуклеотид" относится к полинуклеотиду, который был очищен от последовательностей, фланкирующих его в природном состоянии, например, к фрагменту ДНК, который был удален из последовательностей, которые обычно являются смежными с фрагментом. "Выделенный полинуклеотид" также относится к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, который не существует в природе и который был получен человеком.

"Контролирующие элементы" или "регуляторные последовательности", присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой те нетранслируемые области вектора, например, точку начала репликации, селективные кассеты, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность Козак), интроны, последовательность полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемые области, которые взаимодействуют с клеточными белками хозяев для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут различаться по своей силе и специфичности. В зависимости от используемой векторной системы и хозяина можно применять любое количество подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая универсальные промоторы и индуцибельные промоторы.

"Эндогенная" контролирующая последовательность представляет собой последовательность, которая связана в природе с данным геном в геноме. "Экзогенная" контролирующая последовательность представляет собой последовательность, которая помещена рядом с геном посредством генетических манипуляций (т.е. молекулярно-биологических методик) так, что транскрипция этого гена направляется присоединенным энхансером/промотором. "Гетерологичная" контролирующая последовательность представляет собой экзогенную последовательность, которая получена из другого вида, нежели клетка, которую подвергают генетическим манипуляциям.

В настоящем документе термин "промотор" относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК-полимераза. РНК-полимераза иницирует и транскрибирует полинуклеотиды, функционально соединенные с промотором. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения промоторы, функционирующие в клетках млекопитающих, содержат АТ-богатую область, расположенную на расстоянии приблизительно от 25 до 30 оснований в 5'-направлении относительно сайта инициации транскрипции, и/или другую последовательность, расположенную на расстоянии от 70 до 80 оснований в 5'-направлении относительно точки инициации транскрипции, область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом.

Термин "энхансер" относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию, и в некоторых случаях может функционировать независимо от его ориентации относительно другой контролирующей последовательности. Энхансер может функционировать совместно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами. Термин "промотор/энхансер" относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать функции как промотора, так и энхансера.

Термин "функционально соединенный" относится к смежному положению, в котором описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предусмотренным способом. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения термин относится к функциональной связи между последовательностью, контролирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер), и второй полинуклеотидной последовательностью, например, представляющим интерес полинуклеотидом, при этом последовательность, контролирующая экспрессию, направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В настоящем документе термин "вектор" используется для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты.

Термин "лентивирусный вектор" относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы, или их части, включая LTR, которые в основном получены из лентивируса.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения термины "лентивирусный вектор", "лентивирусный вектор экспрессии" могут использоваться для обозначения лентивирусных переносящих плазмид и/или инфекционных лентивирусных частиц. Если в настоящем документе приведена ссылка на элементы, такие как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные нуклеиновые кислоты и т.д., то следует понимать, что последовательности этих элементов присутствуют в форме РНК в лентивирусных частицах и присутствуют в форме ДНК в ДНК-плазидах.

"Самоинактивирующиеся" (SIN) векторы относятся к дефектным по репликации векторам, например, ретровирусным или лентивирусным векторам, в которых область энхансера-промотора правого (3') LTR, известная как область U3, была модифицирована (например, за счет делеции или замены), чтобы предотвратить вирусную транскрипцию после первого этапа вирусной репликации. Самоинактивация предпочтительно достигается путем введения делеции в область U3 3'-LTR векторной ДНК, т.е. ДНК, используемой для получения векторной РНК. Соответственно, во время обратной транскрипции эта делеция переносится в 5'-LTR провирусной ДНК. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения желательно исключить достаточное количество последовательности U3, чтобы значительно уменьшить или полностью устранить транскрипционную активность LTR, что значительно уменьшает или устраняет выработку полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В случае лентивирусных векторов на основе ВИЧ было обнаружено, что такие векторы переносят значительные делеции U3, включая удаление блока TATA LTR (например, делеции с -418 по -18), без значительного снижения титров векторов.

С. Химерные антигенные рецепторы к ВСМА.

Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения предложены генетически модифицированные рецепторы, которые перенаправляют цитотоксичность Т-клеток на ВСМА-экспрессирующие клетки. Эти генетически модифицированные рецепторы называются химерные антигенные рецепторы (CAR) к ВСМА.

CAR к ВСМА, предусмотренные в конкретных вариантах реализации, содержат сигнальный пептид, scFv против ВСМА, шарнирный домен CD8 α , трансмембранный домен CD8 α , костимулирующий домен 4-1BB и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

"Однопочечные Fv" или фрагменты антитела "scFv" содержат домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Обычно полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена.

"V_H" или "VH" относятся к вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина. "V_L" или "VL" относятся к вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения scFv содержит последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8.

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей содержат три гипервариабельных участка, также называемых "области, определяющие комплементарность" или "CDR". Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения легкая цепь scFv содержит последовательности CDRL1-3, представленные в SEQ ID NO: 1-3, и тяжелая цепь scFv содержит последовательности CDRH1-3, представленные в SEQ ID NO: 4-6.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения CAR, предусмотренные в настоящем документе, могут содержать линкерные остатки между различными доменами, например, добавленные для получения соответствующего расстояния и конформации молекулы. Согласно конкретным вариантам реализации линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 22) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)).

Согласно конкретным вариантам реализации шарнирный домен содержит шарнирную область CD8 α .

"Трансмембранный домен" представляет собой часть CAR, которая гибридузет внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный сигнальный домен и прикрепляет CAR к плазматической мембране Т-клетки. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения трансмембранный домен содержит трансмембранную область CD8 α .

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения CAR согласно настоящему изобретению содержит "костимулирующий сигнальный домен" и "первичный сигнальный домен". В настоящем документе термин "костимулирующий сигнальный домен" или "костимулирующий домен" относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. Первичные сигнальные домены регулируют первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим, либо ингибирующим образом. Первичные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения CAR к BCMA, содержит костимулирующий сигнальный домен CD137 и первичный сигнальный домен CD3 ζ .

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения CAR к BCMA, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полипептиды CAR к BCMA, представленный в SEQ ID NO: 9.

Полинуклеотиды, предусмотренные в конкретных вариантах реализации, независимо от длины самой кодирующей последовательности, можно комбинировать с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (UTR), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты рестрикции ферментов, сайты множественного клонирования, сайты внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты распознавания рекомбиназой (например, сайты LoxP, FRT и Att), терминирующие кодоны, сигналы терминирования транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, описанные в настоящем документе в другом месте или известные в данной области техники, так, что их общая длина может значительно варьироваться. Соответственно, предусмотрено применение полинуклеотидного фрагмента практически любой длины, причем общая длина предпочтительно ограничена простотой получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения вектор, кодирующий CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению представляет собой вирусный вектор, который будет включать экзогенные, эндогенные или гетерологичные контролирующие последовательности, такие как промоторы и/или энхансеры.

В конкретном варианте реализации вектор содержит промотор, содержащий энхансер вируса миелопролиферативной саркомы, с удаленной областью отрицательного контроля и заменой сайта связывания праймера (PBS) на PBS из вируса dl587rev (MND-промотор) (Challita et al., J Virol. 69(2):748-55 (1995)), функционально соединенный с полинуклеотидом, кодирующим CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения клетка (например, Т-клетка) трансдуцирована ретровирусным вектором, например, лентивирусным вектором, кодирующим CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения лентивирусный вектор представляет собой ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; включая ВИЧ типа 1). В конкретных предпочтительных вариантах реализации лентивирусные векторы представляют собой вектор SIN ВИЧ-1.

D. Т-клетки с CAR к BCMA.

Настоящее изобретение относится, в конкретных вариантах реализации, к Т-клеткам, содержащим CAR к BCMA, например, Т-клеткам с CAR к BCMA. Термины "Т-клетка" или "Т-лимфоцит" известны в данной области техники и предназначены для включения тимопитов, незрелых Т-лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов, покоящихся Т-лимфоцитов или активированных Т-лимфоцитов. Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (Th), например, хелперную Т-клетку 1 (Th1) или хелперную Т-клетку 2

(Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4⁺ Т-клетку) CD4⁺ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8⁺ Т-клетку), CD4⁺CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺CD8⁻ Т-клетку, или любую другую подгруппу Т-клеток. Другие иллюстративные популяции Т-клеток, подходящие для применения в конкретных вариантах реализации, включают наивные Т-клетки и Т-клетки памяти.

Т-клетки согласно настоящему изобретению могут быть аутологичными/аутогенными ("собственными") или неаутологичными ("не собственными", например, аллогенными, сингенными или ксеногенными). В настоящем документе "аутологичный" относится к клеткам от одного и того же субъекта. В настоящем документе "аллогенный" относится к клеткам одного и того же вида, которые генетически отличаются от сравниваемой клетки. В настоящем документе "сингенный" относится к клеткам другого субъекта, которые генетически идентичны сравниваемой клетке. В настоящем документе "ксеногенный" относится к клеткам из другого вида, отличного от вида сравниваемой клетки. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения клетки согласно настоящему изобретению являются аллогенными.

Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая, но не ограничиваясь ими, мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта с использованием любого количества способов, известных специалисту в данной области техники, таких как осаждение, например, разделение в градиенте Ficoll™. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки из циркулирующей крови индивидуума получают с помощью афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения клетки, собранные с помощью афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и для того чтобы поместить клетки в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. Клетки могут быть промыты фосфатно-солевым буфером (ФСБ) или другим подходящим раствором, который не содержит кальций, магний и большинство, если не все, других двухвалентных катионов. Специалисты в данной области техники поймут, что этап промывки может быть выполнен способами, известными специалистам в данной области техники, такими как использование полуавтоматической проточной центрифуги. Например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или т.п. После промывки клетки могут быть ресуспендированы в различных биосовместимых буферах или другом физиологическом растворе с буфером или без него. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены путем непосредственного ресуспендирования клеток в культуральной среде.

Т-клетки могут быть генетически модифицированы после выделения с использованием известных способов, или Т-клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае предшественников) в условиях *in vitro* перед их генетической модификацией. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения Т-клетки генетически модифицированы химерными антигенными рецепторами согласно настоящему изобретению (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), и затем активированы и размножены в условиях *in vitro*. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения Т-клетки могут быть активированы и размножены до или после генетической модификации для экспрессии CAR.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Т-клетки, экспрессирующие CAR к ВСМА, криоконсервируют так, что клетки остаются жизнеспособными при размораживании. В настоящем документе термин "криоконсервация" относится к сохранению клеток путем охлаждения до минусовых температур, таких как (как правило) 77 К или -196°C (точка кипения жидкого азота). Криозащитные агенты часто применяют при минусовых температурах, чтобы предотвратить повреждение клеток в результате замерзания при низких температурах или нагревания до комнатной температуры. Криоконсервирующие агенты и оптимальные скорости охлаждения могут защитить от повреждения клеток. Криозащитные агенты, которые можно применять, включают, но не ограничиваются ими, диметилсульфоксид (ДМСО) (Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидин (Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет от 1 до 3°C/мин. Спустя по меньшей мере два часа Т-клетки достигают температуры -80°C и могут быть помещены непосредственно в жидкий азот (-196°C) для постоянного хранения, например, в криогенный сосуд для длительного хранения.

Е. Композиции и составы.

Композиции согласно настоящему изобретению содержат терапевтически эффективное количество Т-клеток с CAR к ВСМА. Композиции включают, но не ограничиваются ими, фармацевтические композиции. "Фармацевтическая композиция" относится к композиции, изготовленной в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или животному, либо по отдельности, либо в комбинации с одним или более другими способами терапии. Также следует пони-

мать, что, при необходимости, композиции могут быть введены в комбинации с другими агентами, такими как, например, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные препараты, антитела или различные другие фармацевтически активные агенты. Фактически отсутствуют какие-либо ограничения для других компонентов, которые также могут быть включены в композиции, при условии, что дополнительные агенты не оказывают нежелательное воздействие на способность композиции доставлять предусмотренную терапию.

Выражение "фармацевтически приемлемый" применяется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с целесообразным соотношением польза/риск.

В настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но не ограничивается ими, любой адъювант, носитель, вспомогательное вещество, обеспечивающее скольжение вещества, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/окрашивающее вещество, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, которые были одобрены Управлением по контролю качества продуктов и лекарственных средств США как приемлемые для применения у человека или домашних животных. Примерные фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, жиры животного и растительного происхождения, парафины, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафловое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и любые другие совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиции содержат количество, и более предпочтительно терапевтически эффективное количество, Т-клеток, экспрессирующих CAR к ВСМА, согласно настоящему изобретению.

В настоящем документе термин "количество" или "доза" относится к "количеству, эффективному", "дозе, эффективной", "эффективному количеству" или "эффективной дозе" Т-клетки с CAR к ВСМА, которые достаточны для достижения благоприятного или желательного профилактического или терапевтического результата, включая клинические результаты.

Термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" Т-клетки с CAR к ВСМА, также представляет собой то, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или вредные эффекты Т-клетки с CAR к ВСМА, например, CRS. Термин "терапевтически эффективное количество" включает количество, которое эффективно для "лечения" субъекта (например, пациента). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения терапевтически эффективная доза представляет собой минимальную эффективную дозу (MED) Т-клеток с CAR к ВСМА, для лечения множественной миеломы у субъекта. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения терапевтически эффективной дозой является максимальная переносимая доза (MTD) Т-клеток с CAR к ВСМА, которая не приводит к неразрешимому CRS у субъекта.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиции предпочтительно изготовлены для парентерального введения, например, внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального) введения. В предпочтительном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению вводят субъекту путем внутривенной инфузии в однократной дозе.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере приблизительно $5,0 \times 10^7$ клеток, по меньшей мере приблизительно $15,0 \times 10^7$ клеток, по меньшей мере приблизительно $45,0 \times 10^7$ клеток, по меньшей мере приблизительно $80,0 \times 10^7$ клеток или по меньшей мере приблизительно $12,0 \times 10^8$ клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, больше, чем приблизительно $5,0 \times 10^7$ клеток, более приблизительно $15,0 \times 10^7$ клеток, более приблизительно $45,0 \times 10^7$ клеток, более приблизительно $80,0 \times 10^7$ клеток или более приблизительно $12,0 \times 10^8$ клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, находится в пределах диапазона от приблизительно $5,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $15,0 \times 10^7$ клеток, от приблизительно $5,0 \times 10^7$ клеток до прибли-

зительно $45,0 \times 10^7$ клеток, от приблизительно $5,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $80,0 \times 10^7$ клеток или от приблизительно $5,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $12,0 \times 10^8$ клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, находится в пределах диапазона от приблизительно $15,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $45,0 \times 10^7$ клеток, от приблизительно $15,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $80,0 \times 10^7$ клеток или от приблизительно $15,0 \times 10^7$ клеток до приблизительно $12,0 \times 10^8$ клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, составляет по меньшей мере $5,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, по меньшей мере $15,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, по меньшей мере $45,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, по меньшей мере $80,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ или по меньшей мере $12,0 \times 10^8$ клеток $\pm 20\%$.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, составляет более $5,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, по меньшей мере $15,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, по меньшей мере $45,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, по меньшей мере $80,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ или по меньшей мере $12,0 \times 10^8$ клеток $\pm 20\%$.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, находится в пределах диапазона от $5,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $15,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, от $5,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $45,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, от $5,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $80,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ или от $5,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $12,0 \times 10^8$ клеток $\pm 20\%$.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения количество положительных по CAR к ВСМА Т-клеток в композиции, вводимой субъекту, составляет от $15,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $45,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$, от $15,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $80,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ или от $15,0 \times 10^7$ клеток $\pm 20\%$ до $12,0 \times 10^8$ клеток $\pm 20\%$.

Для вариантов применения, предусмотренных в настоящем документе, клетки обычно находятся в объеме 1 литр или менее, или 500 мл или менее, или даже 250 мл или 100 мл или менее.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективное количество Т-клеток с CAR к ВСМА, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

Фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективную дозу Т-клеток с CAR к ВСМА, могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор и тому подобное; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты.

Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут содержать один или более из следующих компонентов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно-или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиновый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозные флаконы из стекла или пластика. Инъецируемая фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции Т-клеток с CAR к ВСМА, согласно настоящему изобретению изготовлены в фармацевтически приемлемой среде для культивирования клеток. Такие композиции подходят для введения субъектам-людям. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения фармацевтически приемлемая среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду.

Бессывороточная среда имеет несколько преимуществ по сравнению со средой, содержащей сыворотку, включая упрощенную композицию с более точным составом, сниженную степень загрязнения, устранение потенциального источника инфекционных агентов и более низкую стоимость. Согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения бессывороточная среда не содержит материалы животного происхождения и необязательно может не содержать белки. Необязательно среда может содержать биофармацевтически приемлемые рекомбинантные белки. "Среда, не содержащая материалы животного происхождения" относится к среде, в которой компоненты получены из источников, отличных от животных. Рекомбинантные белки заменяют природные животные белки в среде, не содержащей компоненты животного происхождения, и питательные вещества получены из синтетических, растительных или микробных источников. "Безбелковая" среда, напротив, определяется как по существу не содержащая белок.

Иллюстративные примеры бессывороточных сред, применяемых в конкретных композициях, вклю-

чают, но не ограничиваются ими, QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) и X-VIVO 10.

Согласно одному предпочтительному варианту реализации композиции, содержащие Т-клетки с CAR к ВСМА, согласно настоящему изобретению изготовлены в растворе, содержащем PlasmaLyte A.

Согласно другому предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения композиции, содержащие Т-клетки с CAR к ВСМА, согласно настоящему изобретению изготовлены в растворе, содержащем криоконсервирующую среду. Например, криоконсервирующая среда с криоконсервирующими агентами может применяться для поддержания высокой жизнеспособности клеток после размораживания. Иллюстративные примеры криоконсервирующих сред, применяемых в конкретных композициях, включают, но не ограничиваются ими, CryoStor CS10, CryoStor CS5 и CryoStor CS2.

Согласно более предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения композиции, содержащие Т-клетки с CAR к ВСМА, согласно настоящему изобретению изготовлены в растворе, содержащем PlasmaLyte A и CryoStor CS10 в соотношении 50:50.

Ф. Терапевтические способы.

Способы лечения множественной миеломы согласно настоящему изобретению включают введение субъекту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество Т-клеток, которые экспрессируют CAR к ВСМА.

В настоящем документе термины "индивидуум" и "субъект" часто используются взаимозаменяемо и относятся к человеку с множественной миеломой. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения субъект относится к человеку с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой.

В настоящем документе термин "пациент" относится к субъекту, у которого диагностирована множественная миелома и более предпочтительно рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома.

В настоящем документе термин "лечение" или "лечить" включает любой благоприятный или желательный эффект в отношении симптомов или патологии множественной миеломы и более предпочтительно рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы и может включать даже минимальное снижение одного или более измеримых маркеров множественной миеломы и более предпочтительно рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы. Лечение необязательно может включать либо снижение или улучшение симптомов множественной миеломы, либо задержку прогрессирования множественной миеломы. "Лечение" необязательно указывает на полное устранение или излечение множественной миеломы или связанных с ней симптомов.

В настоящем документе термин "предотвращать" и подобные слова, такие как "предотвращенный", "предотвращающий" и т.д., указывают на подход к предотвращению, ингибированию или снижению вероятности рецидива множественной миеломы.

Множественная миелома представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование морфологии зрелых плазматических клеток, которое характеризуется неопластической трансформацией одного клона этих типов клеток. Такие плазматические клетки размножаются в костном мозге и могут проникать в соседнюю кость, а иногда и в кровь. Варианты множественной миеломы включают наблюдаемую множественную миелому, вялотекущую множественную миелому, лейкоз плазматических клеток, несекреторную миелому, IgD-миелому, остеосклеротическую миелому, одиночную плазмоцитому кости и экстрамедуллярную плазмоцитому (см., например, Braunwald, et al. (eds), Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Edition (McGraw-Hill 2001)).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиции, содержащие терапевтически эффективное количество Т-клеток с CAR к ВСМА, вводят субъекту для лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы. "Рецидив" относится к диагностике повторного появления, или признаков и симптомов повторного появления, рака после периода улучшения или ремиссии. "Рефрактерный" относится к раку, который устойчив или не отвечает на терапию с применением конкретного терапевтического агента. Рак может быть рефрактерным с момента начала лечения (т.е. не отвечать на первоначальное воздействие терапевтического агента) или в результате развития резистентности к терапевтическому агенту либо во время первого периода лечения, либо во время последующего периода лечения.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению вводят субъекту с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой, которого безуспешно лечили с применением одного, двух, трех или более способов лечения, включая по меньшей мере один ингибитор протеасом и/или иммуномодулирующий лекарственный препарат (IMiD). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения множественная миелома субъекта рефрактерна к трем схемам лечения, включая по меньшей мере один ингибитор протеасом и IMiD. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения множественная миелома субъекта проявляет двойную рефрактерность к одной или более схемам лечения.

Иллюстративные примеры ингибиторов протеасом, к которым рефрактерна множественная миелома субъекта, включают, но не ограничиваются ими, бортезомиб и карфилзомиб.

Иллюстративные примеры IMiD, к которым рефрактерна множественная миелома субъекта, включают, но не ограничиваются ими, талидомид, леналидомид и помалидомид.

Иллюстративные примеры других способов лечения, к которым может быть рефрактерна множественная миелома, включают, но не ограничиваются ими, дексаметазон и разные виды терапии на основе антител, выбранных из группы, состоящей из элотузумаба, даратумумаба, MOR03087, изатуксимаба, бевацизумаба, цетуксимаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, элзилимомаба, азинтрела, ритуксимаба, тозитумаба, милатузумаба, лукатумумаба, дацетузумаба, фигитумумаба, далотузумаба, AVE1642, табалуумаба, пембролизумаба, пидилизумаба и ниволумаба.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения множественная миелома субъекта является рефрактерной к лечению с применением даратумумаба.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения множественная миелома субъекта является рефрактерной к лечению с применением IMiD, ингибитора протеасом и дексаметазона.

Способы согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать лечение субъекта с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой с применением трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток до введения композиции Т-клеток с CAR к BCMA.

Способы согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать истощение лимфоцитов у субъекта до введения композиции Т-клеток с CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению, например, направленная на истощение лимфоцитов химиотерапия заканчивается за 1-4 дня (например, 1, 2, 3 или 4 дня) до введения. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения истощение лимфоцитов включает введение одного или более из мелфалана, цитоксана, циклофосфида и флударабина. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения субъекта подвергают истощению лимфоцитов с применением 300 мг/м² циклофосфида и 30 мг/м² флударабина до введения композиции Т-клеток с CAR к BCMA, согласно настоящему изобретению.

Все публикации, заявки на патенты и выданные патенты, процитированные в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, заявка на патент или выданный патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было подробно описано с помощью иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, специалист в данной области техники легко поймет в соответствии с принципами настоящего изобретения, что определенные изменения и модификации могут быть внесены в настоящее изобретение, не отступая от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены исключительно с целью иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалисты в данной области техники легко установят множество некритических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу аналогичных результатов.

Примеры

Пример 1.

Конструирование CAR к BCMA.

CAR, содержащие мышинные фрагменты антител scFv к BCMA, конструировали для включения промотора MND, функционально соединенного с scFv к BCMA, шарнира и трансмембранного домена из CD8 α и костимулирующих доменов CD137, за которыми располагался внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ -цепи. См., например, фиг. 1. CAR к BCMA, представленный на фиг. 1, содержит последовательность сигнального пептида (SP) CD8 α для поверхностной экспрессии на Т-клетках. Полинуклеотидная последовательность примерного CAR к BCMA, представлена в SEQ ID NO: 10; примерная полипептидная последовательность CAR к BCMA, представлена в SEQ ID NO: 9; и карта вектора примерной конструкции CAR представлена на фиг. 1. В табл. 3 приведена информация об идентичности, номере доступа в GenBank, названии источника и ссылках для различных нуклеотидных сегментов лентивирусного вектора, несущего CAR к BCMA.

Таблица 3

Нуклеотиды	Идентичность	Номер доступа в GenBank	Название источника	Ссылка
1-185	Остов плазмиды pUC19	Номер доступа L09137.2 нуклеотиды 1 – 185	pUC19	New England Biolabs
185-222	Линкер	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
223-800	ЦМВ	Неприменимо	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS и последовательности для упаковки	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Старт-кодон Gag (ATG) изменен на стоп-кодон (TAG)	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
1140-1240	Последовательность gag HIV-1	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	Последовательность gag HIV-1 изменена на второй стоп-кодон	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
1244-1595	Последовательность gag HIV-1	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, изолят HXB3 область env (RRE)	Номер доступа M14100.1 нуклеотиды 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518-2693	Последовательности env HIV-1 S/A	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
2694-2708	Линкер	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
2709-3096	MND	Неприменимо	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755
3097-3124	Линкер	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
3125-3187	Сигнальный пептид	Номер доступа NM_001768	Сигнальный пептид CD8a	Неприменимо
3188-3934	BCMA02 scFv (V _L 1-линкер-V _H 0)	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
3935-4141	Шарнир и TM CD8a	Номер доступа NM_001768	Шарнир и TM CD8a	Milone et al (2009)

				Mol Ther 17(8):1453-64
4144-4269	Сигнальный домен CD137 (4-1BB)	Номер доступа NM_001561	Сигнальный домен CD137	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4270-4606	Сигнальный домен CD3- ζ	Номер доступа NM_000734	Сигнальный домен CD3- ζ	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4607-4717	Ppt и часть 3' U3 HIV-1	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 9005- 9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4718-4834	Часть U3 (делеция 399 п.о.) и R HIV-1	Номер доступа M19921.2 нуклеотиды 9511- 9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4835-4858	Синтетический полиА	Неприменимо	Синтетический	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025
4859-4877	Линкер	Неприменимо	Синтетический	Неприменимо
4878-7350	Остов pUC19	Номер доступа L09137.2 нуклеотиды 2636- 2686	pUC19	New England Biolabs

Пример 2.

Способ получения Т-клеток с CAR к BCMA.

Уникальные продукты Т-клеток с CAR к BCMA02, изготавливали для лечения каждого пациента. Надежность способа изготовления продуктов Т-клеток с CAR к BCMA02, оценивали, получая Т-клетки с CAR к BCMA02, из МКПК 11 здоровых отдельных доноров. Размножение Т-клеток с CAR к BCMA02, от каждого донора было сопоставимо с размножением соответствующей нетрансдуцированной культуры, которое выполняли параллельно (фиг. 2А).

По завершении периода культивирования (10 день) эффективность трансдукции Т-клеток оценивали путем определения количества интегрированных лентивирусов с помощью наборов для кПЦР и специфичных для лентивирусов праймеров (количество копий вектора, VCN). Культуры Т-клеток с CAR к BCMA02, от 11 доноров проявили сопоставимую эффективность трансдукции лентивирусами (фиг. 2В). Было установлено, что частота Т-клеток, положительных в отношении CAR к BCMA02, измеренная методом проточной цитометрии, и экспрессия BCMA сопоставимы у всех доноров (фиг. 2С).

Активность каждого продукта Т-клеток с CAR к BCMA02, оценивали на основании высвобождения ИФН- γ после совместного культивирования с клетками линии K562, модифицированными для экспрессии BCMA. Все продукты Т-клеток с CAR к BCMA02, проявляли терапевтически целесообразные уровни высвобождения ИФН- γ при воздействии клеток линии K562, экспрессирующих BCMA (фиг. 2D).

Пример 3.

Т-клетки с CAR к BCMA02, проявляют терапевтическую активность в клинических исследованиях с участием людей с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой.

Введение.

Разные виды терапии на основе Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), продемонстрировали надежные и устойчивые клинические ответы, наблюдаемые при некоторых гематологических злокачественных новообразованиях. Однако, за исключением CD19, клинические данные, подтверждающие перспективность CAR-Т-клеток, были ограничены. Потенциальную безопасность и эффективность CAR-Т-клеток испытывали в популяции пациентов с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой (ММ) с ограниченными вариантами лечения. Чтобы перенаправить Т-клетки к ММ, основные усилия были сосредоточены на антигене созревания В-клеток (BCMA), который является членом суперсемейства факторов некроза опухолей и практически в равной степени экспрессируется только клетками злокачественной миеломы, плазматическими клетками и некоторыми зрелыми В-клетками. Первоначальное доказательство активности против BCMA, было недавно продемонстрировано с использованием Т-клеток, трансдуцированных гамма-ретровирусным вектором, кодирующим CAR к BCMA, с костимулирующим доменом CD28, однако у пациентов с высокой степенью тяжести заболевания развился значительный синдром высвобождения цитокинов (AH et al., Blood 2016). Поскольку терапевтически эффективная доза Т-клеток с CAR к BCMA02, у людей не может быть предсказана, было проведено исследование с повышением дозы.

Способы.

Т-клетки с CAR к BCMA02, вводили пациентам с рецидивирующей и/или рефрактерной BCMA-положительной ММ, которые ранее получали по меньшей мере 3 схемы лечения, включая ингибитор

протеасом и иммуномодулирующий агент, или которые имели заболевание с двойной рефрактерностью. В общих чертах, моноклеарные клетки периферической крови собирали с помощью лейкофереза и переносили в централизованное производственное учреждение для трансдукции и размножения. Пациентов подвергали истощению лимфоцитов с применением 300 мг/м циклофосфида и 30 мг/м флударабина на -5, -4 и -3 дни исследования и затем вводили Т-клетки с CAR к BCMA02, путем однократной инфузии на 0 день.

Среднее количество копий вектора (VCN) для CAR-Т-клеток определяли для девяти пациентов.

Таблица 4. VCN для CAR-Т-клеток

Пациент	VCN
1	2,08
2	1,97
3	2,11
4	5,98
5	3,01
6	4,13
7	3,38
8	4,01
9	ND

ND=еще не определено.

Результаты.

Девять пациентов получили инфузии Т-клеток с CAR к BCMA02, в трех когортах дозирования $5,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток, $15,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток и $45,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток. Клетки собирали, успешно изготавливали и высвобождали у всех пациентов. Средний возраст при зачислении в исследование для 9 пациентов, получивших инфузии, составил 58 лет (43-68 лет), и 67% были мужчинами. Медиана времени с момента постановки диагноза составила 6 лет (1,3-8,6). Медиана количества предшествующих линий терапии составила 6 (4-10), 100% пациентов ранее перенесли по меньшей мере 1 трансплантацию аутологичных стволовых клеток, 67% ранее получали даратумаб или МАТ к CD38, 89% ранее получали леналидомид, 78% ранее получали помалидомид, 100% ранее получали бортезомиб и 78% ранее получали карфилзомиб.

До настоящего времени не наблюдали ограничивающую дозу токсичность, нейротоксичность >2 степени или синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3 степени или выше. Более того, ни один из пациентов не нуждался в лечении вазопрессорами, тоцилизумабом или кортикостероидами. CRS 1 или 2 степени сообщался у 6/9 (67%) пациентов. Помимо CRS наиболее распространенными нежелательными явлениями, возникшими после начала лечения, были нейтропения (89%), лейкопения (67%) и анемия (44%).

Клинические ответы наблюдали в каждой когорте дозирования. После первоначальной когорты все пациенты продолжили участие в исследовании и общая частота ответов у 6 пациентов, получавших $15,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток или более, составила 83%, в том числе 2 строгих полных ответа (CR) (см. табл. 5). Неожиданным фактом явилось то, что при уровнях дозы выше $5,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток у всех пациентов с вовлечением костного мозга в начальных условиях не детектировали заболевание костного мозга в любой момент времени после 14 дня.

Таблица 5. Ответ, представленный согласно уровню дозы и длительности

Доза	Пациент	Ответ	Время после инфузии bb2121 (недели)
$5,0 \times 10^7$	1	ЧО	13
	2*	СЗ	9
	3*	ПЗ	8
$15,0 \times 10^7$	4	сПО	28+
	5	сПО	21+
	6*	ОХЧО	19+
$45,0 \times 10^7$	7	ЧО	13+
	8	СЗ	11+
	9*	ЧО	4+

* указывает на то, что у пациента было вовлечено $\geq 50\%$ костного мозга в начальных условиях. Ответы оценивали с использованием Унифицированных критериев ответа на терапию множественной миеломы Международной рабочей группы по изучению множественной миеломы (IMWG). ЧО: частичный ответ, СЗ: стабильное заболевание, ПЗ: прогрессирующее заболевание, сПО: строгий полный ответ, ОХЧО: очень хороший частичный ответ, NE: еще не оценен. + обозначает существующий ответ.

Размножение CAR⁺ Т-клеток демонстрировали всякий раз, и оно было сопоставимо с данными из других опубликованных исследований CAR-Т-клеток. У 5 пациентов, получавших $>5,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-

клеток, для которых были доступны данные, диапазон пика CAR⁺ Т-клеток, измеренный методом проточной цитометрии, составил от 10 до 686 CAR⁺ клеток/мкл в периферической крови и от 4 до 527 CAR⁺ клеток/мкл в костном мозге, и диапазон пика количества копий/мкг геномной ДНК в периферической крови составил от 34,231 до 860,204 согласно данным ПЦР.

Выводы.

Т-клетки с CAR к BCMA02, проявили значительную эффективность при уровнях дозы выше $5,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток, в том числе 2 ПО и продолжающийся клинический ответ через 6 месяцев. В отличие от результатов, полученных для других видов терапии на основе CAR-Т-клеток, эффективность Т-клеток с CAR к BCMA02, сопровождалась неожиданно легким и контролируемым CRS, в том числе у пациентов с вовлечением $\geq 50\%$ костного мозга. Эти данные поддерживают терапевтическую эффективность Т-клеток с CAR к BCMA02, для рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы.

Запланированы дополнительные когорты дозирования с уровнями дозы $80,0 \times 10^7$ и $12,0 \times 10^8$ CAR⁺ Т-клеток.

Пример 4.

Т-клетки с CAR к BCMA02, продолжают проявлять терапевтическую активность в клинических исследованиях с участием людей с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой.

Двадцать один пациент получил инфузии Т-клеток с CAR к BCMA02, в трех когортах дозирования: $5,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток (3 пациента), $15,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток (6 пациентов), $45,0 \times 10^7$ CAR⁺ Т-клеток (9 пациентов) и $80,0 \times 10^7$ клеток CAR⁺ Т (3 пациента). Клетки собирали, успешно изготавливали и высвобождали у всех пациентов. Медиана возраста на момент зачисления в исследование для 9 пациентов, получавших инфузии, составила 58 лет (37-74), и 62% были мужчинами. Медиана времени с момента постановки диагноза составила 5 лет (1,0-16,0). Медиана количества предшествующих линий терапии составила 7 (3-14), 100% пациентов ранее перенесли по меньшей мере 1 трансплантацию аутологичных стволовых клеток, 100% ранее получали леналидомид и бортезомиб, 91% ранее получали помалидомид и карфилзомиб, 71% ранее получали даратумумаб и 29% пациентов имели рефрактерность к пяти лекарственным препаратам (бортезомиб, леналидомид, карфилзомиб, помалидомид, даратумумаб).

Все пациенты в когорте активного дозирования достигли объективного ответа длительностью до 54 недель. Фиг. 3. В табл. 6 представлена доза CAR-Т-клеток, количество оцениваемых пациентов, общая частота ответов, лучший ответ, медиана количества предшествующих линий терапии и безопасность для каждой когорты.

Таблица 6. Данные для когорт

Когорта	1	2	3	4
Доза CAR ⁺ Т-клеток	50×10 ⁶	150×10 ⁶	450×10 ⁶	800×10 ⁶
Количество пациентов, оцениваемых для определения эффективности	3	4	8	3
Общая частота ответов в когорте	33%	100%	100%	100%
Лучший ответ	ПЗ (1 пациент) СЗ (1 пациент) ЧО (1 пациент)	ПО (2 пациента, 1 пациент МОЗ-отрицательный) ОХЧО (1 пациент МОЗ-отрицательный) ЧО (1 пациент)	ПО (1 пациент*) ОХЧО (5 пациентов; 1 пациент МОЗ-отрицательный) ЧО (2 пациента; 1 пациент МОЗ-отрицательный) *Пациент умер из-за несвязанной остановки сердца	ОХЧО (1 пациент) ЧО (1 пациент) ПО (1 пациент)
Вовлечение костного мозга		Все пациенты в когортах 2, 3 и 4 с вовлечением костного мозга в начальных условиях не имели детектируемых клеток множественной миеломы в костном мозге на 14 день или позже. Было установлено, что из четырех пациентов, оцениваемых для определения статуса МОЗ, все четыре были МОЗ-отрицательными.		
Медиана количества предшествующих линий терапии	7 (диапазон: 3-14); все пациенты имели по меньшей мере одну предшествующую трансплантацию аутологичных стволовых клеток, а также предшествующее воздействие ингибитора протеасом и иммуномодулирующего агента; 71% пациентов ранее получали даратумумаб или антитело к CD38			
Безопасность	15/21 (71%) пациентов имели CRS, в основном 1 и 2 степени; 2 пациента имели CRS 3 степени, который разрешился в течение 24 часов. 4 пациента получали тоцилизумаб, 1 (CRS 2 степени) получал стероиды. Наиболее распространенные НЯ 3-4 степени, возникшие после начала лечения, у 21 пациента, получившего инфузию, включали цитопении, обычно связанные с истощением лимфоцитов су/fli, а также НЯ гипонатриемии 3 степени (n = 4), синдром высвобождения цитокинов (n = 2), инфекцию верхних дыхательных путей (n = 2) и обморок (n = 2).			

В целом термины, использованные в формуле изобретения ниже, не должны быть истолкованы как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами реализации, раскрытыми в описании и формуле изобретения, и должны быть истолкованы, как включающие все возможные варианты реализации наряду с полным объемом эквивалентов, к которым относятся такие пункты формулы изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничена настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая терапевтически эффективное количество Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) к антигену созревания В-клеток (BCMA), для лечения субъекта с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой, причем указанное терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 15,0×10⁷ до приблизительно 80,0×10⁷ Т-клеток с CAR к BCMA, и причем CAR к BCMA содержит аминокислоты 22-493 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что CAR к BCMA содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что CAR к BCMA кодирует нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 10.

4. Композиция по любому из пп.1-3, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

5. Композиция по любому из пп.1-4, изготовленная в растворе, содержащем криоконсервирующую среду.

6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет приблизительно 15,0×10⁷ Т-клеток с CAR к BCMA.

7. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

8. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

9. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно $15,0 \times 10^7$ до приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

10. Композиция по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что указанные Т-клетки с CAR к ВСМА, получены посредством трансдукции лентивирусным вектором, кодирующим CAR к ВСМА.

11. Композиция по п.10, отличающаяся тем, что количество копий лентивирусного вектора (VCN) составляет приблизительно 2,0 копии на Т-клетку с CAR к ВСМА.

12. Композиция по п.10 или 11, отличающаяся тем, что указанный лентивирусный вектор представляет собой вектор на основе вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1).

13. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию Т-клеток, трансдуцированных лентивирусом, кодирующим CAR к ВСМА, и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что популяция Т-клеток содержит от приблизительно $15,0 \times 10^7$ до приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА, и отличающаяся тем, что указанный CAR к ВСМА содержит аминокислоты 22-493 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что CAR к ВСМА содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

15. Фармацевтическая композиция по п.13 или 14, отличающаяся тем, что CAR к ВСМА кодирует нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 10.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит приблизительно $15,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит приблизительно $80,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-15, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит от приблизительно $15,0 \times 10^7$ до приблизительно $45,0 \times 10^7$ Т-клеток с CAR к ВСМА.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-19, отличающаяся тем, что указанные Т-клетки содержат $CD8^+$ Т-клетки.

21. Композиция или фармацевтическая композиция по любому из пп.1-20, отличающаяся тем, что указанные клетки являются клетками человека.

22. Способ лечения субъекта с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой, включающий однократное внутривенное введение субъекту композиции или фармацевтической композиции по любому из пп.1-21.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что указанная рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома была рефрактерна по меньшей мере к трем схемам лечения, включая ингибитор протеасом и иммуномодулирующий агент, до введения указанной композиции или фармацевтической композиции.

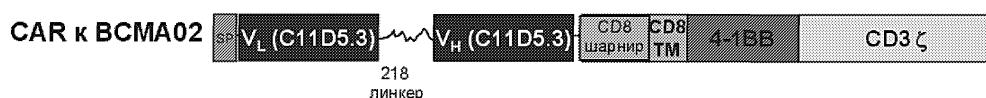
24. Способ по п.22 или 23, отличающийся тем, что указанная рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома имела двойную рефрактерность к одной или более схемам лечения до введения указанной композиции или фармацевтической композиции.

25. Способ по любому из пп.22-24, отличающийся тем, что указанный субъект получал даратумумаб, леналидомид, помалидомид, бортезомиб и/или карфилзомиб до введения указанной композиции или фармацевтической композиции.

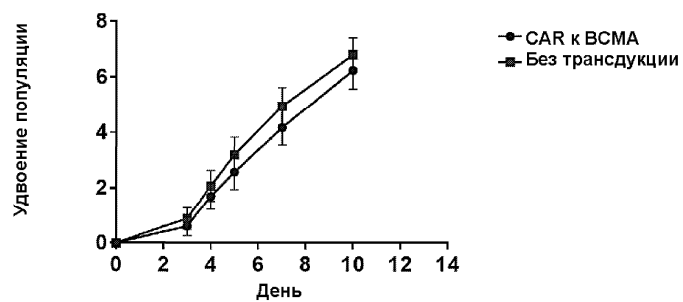
26. Способ по любому из пп.22-25, отличающийся тем, что указанному субъекту были трансплантированы аутологичные гемопоэтические стволовые клетки до введения указанной композиции или фармацевтической композиции.

27. Способ по любому из пп.22-26, отличающийся тем, что указанный субъект перенес истощение лимфоцитов с применением 300 мг/м^2 пиклофосфамида и 30 мг/м^2 флударабина до введения указанной композиции или фармацевтической композиции.

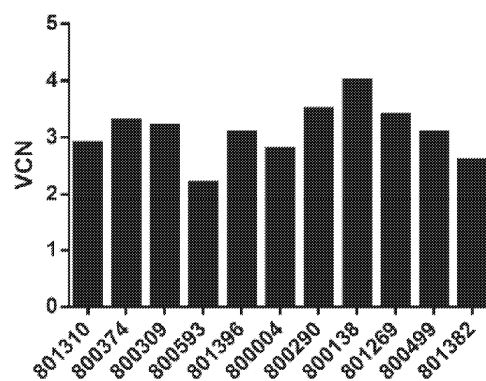
28. Способ по любому из пп.22-27, отличающийся тем, что клетки были получены от субъекта.



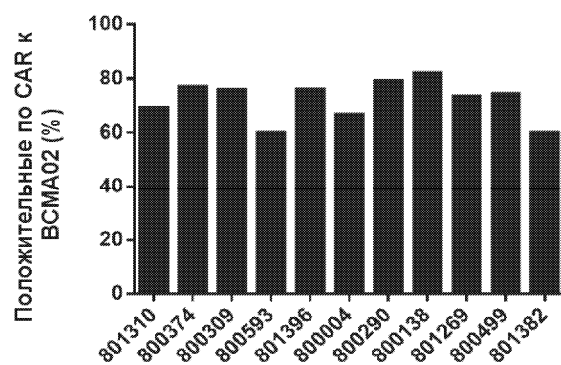
Фиг. 1



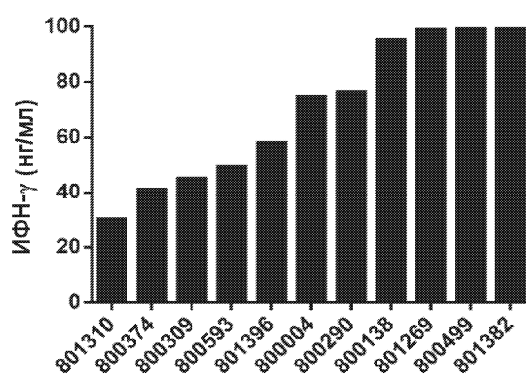
Фиг. 2А



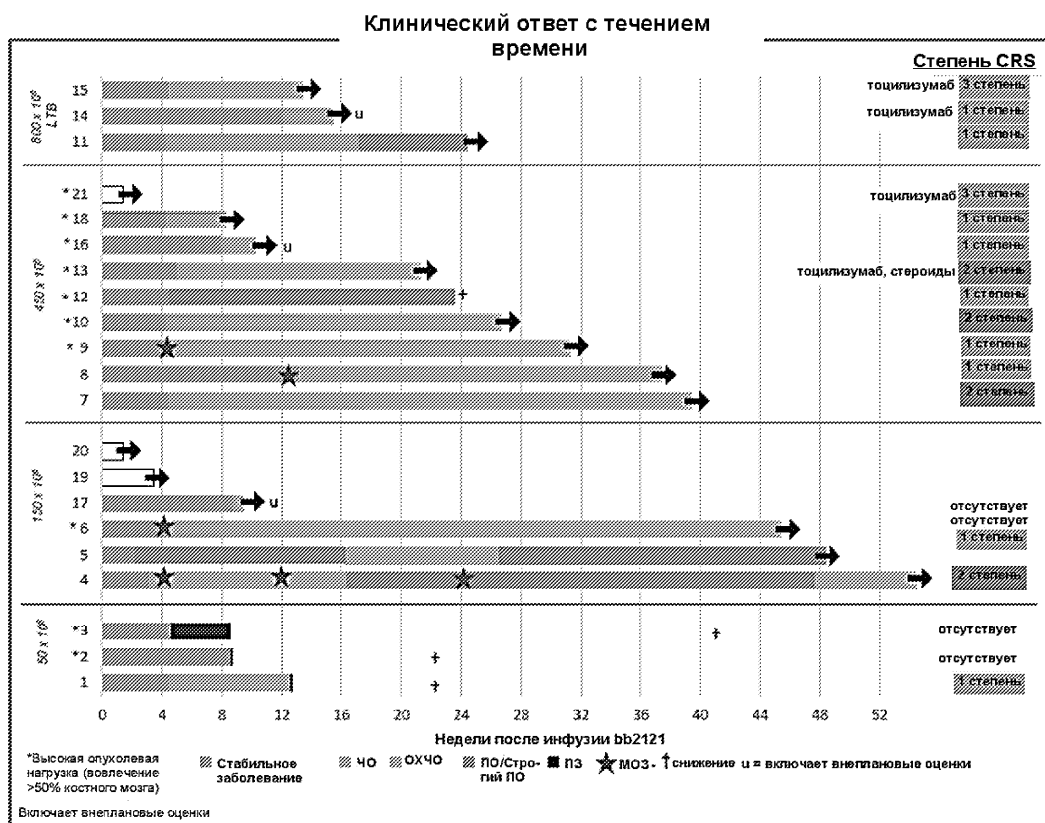
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 2D



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2