(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292893 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.02

(22) Дата подачи заявки
2021.04.09

(51) Int. Cl. ***A61K 35/17*** (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ТЕРАПИЕЙ КЛЕТКАМИ, СКОНСТРУИРОВАННЫМИ С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, НАЦЕЛЕННЫМ НА В-КЛЕТОЧНЫЙ АНТИГЕН СОЗРЕВАНИЯ

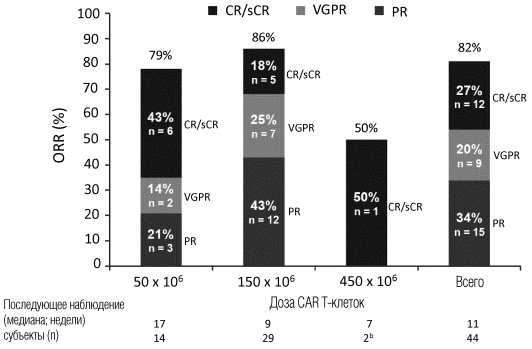
(31) **63/008,564**
(32) **2020.04.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/026702**
(87) **WO 2021/207689 2021.10.14**
(88) **2021.11.18**

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

(72) Изобретатель:
Стирнер Мариана Кота, Муячич Мирна, Деврис Тодд (US)

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

(57) Представлены способы и применения, связанные с адоптивной клеточной терапией, включающей введение доз клеток, таких как Т-клетки, для лечения заболевания и состояний, включая некоторые злокачественные новообразования плазматических клеток. Клетки экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), специфические в отношении В-клеточного антигена созревания (BCMA). В некоторых вариантах осуществления способы предназначены для лечения субъектов с множественной миеломой (ММ).



202292893 A1

202292893 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576157EA/032

СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ТЕРАПИЕЙ КЛЕТКАМИ, СКОНСТРУИРОВАННЫМИ С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, НАЦЕЛЕННЫМ НА В-КЛЕТОЧНЫЙ АНТИГЕН СОЗРЕВАНИЯ

Перекрестная ссылка на родственную заявку

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 63/008564, поданной 10 апреля 2020г., озаглавленной “СПОСОБЫ И ПРИМЕНЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ТЕРАПИЕЙ КЛЕТКАМИ, СКОНСТРУИРОВАННЫМИ С ХИМЕРНЫМ АНТИГЕННЫМ РЕЦЕПТОРОМ, НАЦЕЛЕННЫМ НА В-КЛЕТОЧНЫЙ АНТИГЕН СОЗРЕВАНИЯ”, содержание которой включено посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

Включение перечня последовательностей посредством ссылки

[0002] Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла, озаглавленного 735042023640SeqList.Txt, созданного 8 апреля 2021г., который имеет размер 345310 байт. Информация в электронном формате перечня последовательностей включена посредством ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

[0003] Настоящее изобретение относится, в некоторых аспектах, к способам и применениям, связанным с адоптивной клеточной терапией, включающей введение доз клеток, таких как Т-клетки, для лечения заболевания и состояний, включающих некоторые злокачественные новообразования плазматических клеток. Клетки экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), специфические к В-клеточному антигену созревания (BCMA). В некоторых вариантах осуществления способы предназначены для лечения субъектов с множественной миеломой (ММ).

Предпосылки создания изобретения

[0004] В-клеточный антиген созревания (BCMA) представляет собой трансмембранный белок III типа, экспрессируемый на зрелых В-лимфоцитах. После связывания BCMA с одним из его лигандов, В-клеточным активатором семейства TNF (BAFF) или лигандом, индуцирующим пролиферацию (APRIL), клеточный сигнал про-выживания доставляется в В-клетку, что, как было обнаружено, необходимо для выживания плазматических клеток. Экспрессию BCMA связывают с некоторыми заболеваниями, включая рак, аутоиммунные расстройства и инфекционные заболевания. Доступны различные BCMA-направленные терапии, включая BCMA-связывающие химерные антигенные рецепторы (CAR), и клетки, экспрессирующие такие CAR. Однако остается потребность в улучшенных способах лечения заболеваний и состояний, связанных с BCMA, включая способы адоптивной клеточной терапии с использованием сконструированных анти-BCMA CAR экспрессирующих клеток. В настоящей заявке

представлены варианты осуществления, отвечающие таким потребностям.

Сущность изобретения

[0005] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, имеющего, или у которого подозревается, заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA). Также представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией.

[0006] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), которые включают введение субъекту дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0007] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), которые включают введение клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, который уже получил по меньшей мере одну дозу антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra).

[0008] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включающие введение по меньшей мере одной дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) субъекту, который является кандидатом для клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA.

[0009] В настоящей заявке представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, которые включают введение субъекту дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0010] В настоящей заявке представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, которые включают введение клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, который уже получил по меньшей мере одну дозу антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra).

[0011] В настоящей заявке представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, включающие введение по меньшей мере одной дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) субъекту, который является кандидатом для клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA.

[0012] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект получил по меньшей мере одну дозу IL-1Ra в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0013] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra включает по меньшей мере две дозы IL-1Ra.

[0014] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), которые включают введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0015] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включая введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах примерно или примерно за 24 часа до введения клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0016] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения

субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включающие введение субъекту клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом субъект получил по меньшей мере одну дозу антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах примерно или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и субъекту следует ввести по меньшей мере одну дозу IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0017] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), которые включают введение клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0018] В настоящей заявке представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, которые включают введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0019] В настоящей заявке представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, которые включают введение клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra, которую вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0020] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую до введения дозы сконструированных Т-клеток,

вводят в пределах примерно или примерно за 21, 18, 15 или 12 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 21 час до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 18 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 15 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 12 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0021] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-Ra, вводимая до введения дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере две дозы IL-1Ra, вводимые до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0022] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 6, 5, 4, 3 или 2 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 6 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 5 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 4 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 2 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до, и одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0023] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления способы и применения также включают введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов

осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере 2 дозы IL-1Ra, вводимые после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает 3, 4, 5, 6 или 7 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере 3 дозы IL-1Ra, вводимые после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере 4 дозы IL-1Ra, вводимые после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает 5 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере 6 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере 7 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после дозы сконструированных клеток, включает по меньшей мере 8 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0024] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую после дозы сконструированных клеток, вводят ежедневно в течение нескольких дней подряд. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток представляет собой 4 дозы, где одну из четырех доз вводят каждый день в течение 4 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, представляет собой 5 доз, вводимых ежедневно в течение 5 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления дозу IL-1Ra вводят через каждые 24 часа (q24h) в Дни 2-5.

[0025] В настоящей заявке представлены способы и применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который

имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, включающие введение субъекту по меньшей мере 6 доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, где клеточную терапию вводят в День 1 и: (a) одну дозу IL-1Ra вводят в пределах примерно или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток, необязательно за ночь до введения дозы сконструированных Т-клеток; (b) одну дозу IL-1Ra вводят в пределах примерно или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток в День 1; (c) четыре дозы IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток, при этом одну дозу из четырех доз вводят каждый день в Дни 2, 3, 4 и 5.

[0026] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления способы и применения также включают введение по меньшей мере одной дополнительной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных клеток, если субъект демонстрирует симптомы или признаки синдрома высвобождения цитокинов (CRS). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одна дополнительная доза IL-1Ra включает введение множества доз. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления множество доз вводят ежедневно в течение нескольких дней подряд вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления множество доз вводят два раза ежедневно в течение нескольких дней подряд вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS. В некоторых вариантах осуществления дозу IL-1Ra вводят через каждые 12 часов (q12h). В некоторых вариантах осуществления, если субъект демонстрирует симптомы или признаки синдрома высвобождения цитокинов (CRS), дозу IL-1Ra вводят каждые 12 часов (q12h) вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

[0027] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления ежедневное введение IL-1Ra осуществляют в одно и то же или примерно в одно и то же время каждый день.

[0028] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления IL-1Ra представляет собой рекомбинантный IL-1Ra. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления IL-1Ra включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:256, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокую идентичность последовательности с SEQ ID NO:256, которая сохраняет функцию антагониста IL-1R. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления IL-1Ra включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:256. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления IL-1Ra включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокую идентичность последовательности с SEQ ID NO:256, которая сохраняет функцию антагониста IL-1R. В

некоторых из любых представленных вариантов осуществления IL-1Ra представляет собой анакинру. В некоторых вариантах осуществления анакинра является рекомбинантной анакинрой.

[0029] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза рекомбинантного IL-1Ra находится на уровне или около 500 мг, на уровне или около 400, на уровне или около 300, на уровне или около 200 мг, на уровне или около 100 или на уровне или около 50 мг, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 500 мг, на уровне или около 400, на уровне или около 300, на уровне или около 200 мг, на уровне или около100 или на уровне или около 50 мг, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 500 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 400 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 300 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 200 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза рекомбинантного IL-1Ra составляет от или от около 50 мг до или до около 200 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза рекомбинантного IL-1Ra находится на уровне или около 100 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 50 мг. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления IL-1Ra вводят подкожно.

[0030] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления способы и применения уменьшают тяжесть, облегчают и/или предотвращают появление токсичности, связанной с введением клеточной терапии. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления способы и применения уменьшают тяжесть возникающей токсичностии, связанной с введением клеточной терапии. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления способы и применения ослабляют возникающую токсичность, связанную с введением клеточной терапии. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления способы и применения препятствуют возникновению токсичности, связанной с введением клеточной терапии.

[0031] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления токсичность представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления CRS представляет собой тяжелый CRS или CRS 3 или более высокой степени. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления CRS является тяжелым. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления CRS представляет собой CRS 3 или более высокой степени. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления токсичность представляет собой нейротоксичность (NT). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления

NT представляет собой тяжелую NT, или NT 2 или более высокой степени, или NT 3 или более высокой степени. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления NT представляет собой тяжелую NT. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления NT представляет собой NT 2 или более высокой степени. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления NT представляет собой NT 3 или более высокой степени. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления токсичность представляет собой синдром активации макрофагов (MAS) или гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления токсичность представляет собой синдром активации макрофагов (MAS). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления токсичность представляет собой гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH).

[0032] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления на момент или до введения дозы сконструированных Т-клеток субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из: предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют второй CAR, специфический в отношении BCMA; предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

[0033] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), которые включают введение субъекту клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом на момент или до введения дозы сконструированных Т-клеток субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из: предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют второй CAR, специфический в отношении BCMA; предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

[0034] В настоящей заявке представлены способы и применения для лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), которые включают введение субъекту клеточной терапии, которая включает дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, который предварительно получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из: предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют второй CAR, специфический в отношении BCMA; предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-

лекарственное средство (ADC).

[0035] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект был невосприимчивым к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 1 год до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 1 год до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект был невосприимчивым к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 1 год до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий, в пределах или примерно за 6 месяцев до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 6 месяцев до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект был невосприимчивым к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 6 месяцев до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий, в пределах или примерно за 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект был невосприимчивым к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR.

[0036] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой или включает биспецифическое антитело или

биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE включает биспецифическое антитело. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE включает биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE выбран из одного или более из AMG 420/BI 836909, AMG 701, CC-93269, JNJ-64007957, PF-06863135 и REGN5458. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой AMG 420/BI 836909. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой AMG 701. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой CC-93269. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой JNJ-64007957. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой PF-06863135. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный TCE представляет собой REGN5458.

[0037] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный ADC выбран из одного или более из Белантамаба мафодотина (GSK2857916), MEDI2228, CC-99712 и AMG 224. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный ADC представляет собой Белантамаб мафодотин (GSK2857916). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный ADC представляет собой MEDI2228. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный ADC представляет собой CC-99712. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления BCMA-направленный ADC представляет собой AMG 224.

[0038] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR содержит: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий: вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 119; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 97, 101 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-

L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 105, 107 и 108, соответственно; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 96, 100 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 105, 107 и 108, соответственно; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 95, 99 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 105, 107 и 108, соответственно; V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 94, 98 и 102, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 104, 106 и 108, соответственно; или V_H, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, и V_L, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119; (b) спейсер, включающий химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, такой как спейсер, который имеет длину около 228 аминокислот; или спейсер, представленный в SEQ ID NO: 174; (c) трансмембранный домен; и (d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток или его сигнальную часть.

[0039] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления V_H представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; и V_L представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления V_H включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; и V_L включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119.

[0040] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает scFv. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой scFv. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления V_H и V_L соединены гибким линкером. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления гибкий линкер включает аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления гибкий линкер представляет собой аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления V_H является карбокси-концевым по отношению к V_L.

[0041] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность

последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114.

[0042] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает (a) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:113; (b) последовательность нуклеотидов, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с вышеуказанной последовательностью; или (c) вырожденную последовательность (a) или (b). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:113. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает последовательность нуклеотидов, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:113. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:115.

[0043] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен из человеческого CD28. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из человеческого CD28. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен из человеческого CD28. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO:138. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138. В некоторых из любых

представленных вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления трансмембранный домен включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138.

[0044] В некоторых вариантах осуществления первый CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий: вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 125, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 127; и/или VH, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 260, 261 и 262, соответственно, и VL, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 257, 258 и 259, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128.

[0045] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:143. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен

представляет собой последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления цитоплазматический сигнальный домен включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143.

[0046] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS, или его сигнальную часть. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен ICOS. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления 4-1BB представляет собой человеческий 4-1BB. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область включает последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4.

[0047] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CD3-зета (CD3ζ) цепи.

[0048] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR содержит, в порядке от N-конца к C-концу: внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

[0049] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый

CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий: вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116, и вариабельную область легкой цепи(V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 119; (b) спейсер, включающий модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, который имеет длину около 228 аминокислот; (c) трансмембранный домен из человеческого CD28; и (d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

[0050] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 114, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114; (b) спейсер, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:174; (c) трансмембранный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138; и (d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4.

[0051] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 114; (b) спейсер, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174; (c) трансмембранный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138; и (d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.

[0052] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:19. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с вышеуказанной последовательностью. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 13.

[0053] В некоторых вариантах осуществления, где первый CAR содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 312.

[0054] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR и второй CAR связываются с одним и тем же эпитопом BCMA.

[0055] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR и второй CAR связываются с разными эпитопами BCMA.

[0056] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR и второй CAR являются разными.

[0057] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает: V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:257, 258 и 259, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:260, 261 и 262, соответственно; V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127; аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:265; и/или последовательность, кодируемую SEQ ID NO:266. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, 261 и 262, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258 и 259, соответственно. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:263. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает

последовательность, кодируемую SEQ ID NO:264. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:263, и последовательность, кодируемую SEQ ID NO:264. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:263, и/или последовательность, кодируемую SEQ ID NO:264. В некоторых вариантах осуществления второй CAR включает последовательность, кодируемую SEQ ID NO:312.

[0058] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR представляет собой мультивалентный CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 267-304. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR представляет собой мультивалентный CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302.

[0050] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает Центирин-содержащий CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления второй CAR включает аминокислотные остатки 22-334 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 310.

[0060] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления первый CAR и второй CAR являются одинаковыми.

[0061] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, получена из образца, включающего Т-клетки, полученные от того же субъекта, который ранее получил предварительную дозу сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, получена из образца, включающего Т-клетки, полученные от субъекта после того, как субъект уже получил предварительную дозу сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR.

[0062] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, способ дополнительно включает определение в образце для анализа, полученном от субъекта, присутствия или количества (i) клеток, экспрессирующих второй CAR, или (ii) нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, способ дополнительно включает определение в образце для анализа, полученном от субъекта, присутствия или количества клеток, экспрессирующих второй CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые

экспрессируют первый CAR, способ дополнительно включает определение в образце для анализа, полученном от субъекта, присутствия или количества нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления образец для анализа получают от субъекта одновременно с получением образца, включающего Т-клетки для получения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, от того же субъекта.

[0063] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, способ дополнительно включает определение присутствия или количества (i) клеток, экспрессирующих второй CAR, или (ii) нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR, в композиции, включающей дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, способ дополнительно включает определение присутствия или количества клеток, экспрессирующих второй CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, способ дополнительно включает определение присутствия или количества нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR, в композиции, включающей дозу сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления определение присутствия или количества клеток, экспрессирующих второй CAR, осуществляют путем контактирования образца или дозы композиции, включающей сконструированные Т-клетки, с очищенным или рекомбинантным BCMA. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления определение присутствия или количества клеток, экспрессирующих второй CAR, осуществляют путем контактирования образца или дозы сконструированных Т-клеток с BCMA-Fc.

[0064] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления определение присутствия или количества нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR, осуществляют путем количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

[0065] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена и/или первого CAR, или показатель, указывающий на функцию или активность первого CAR после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется или по существу не снижается или не блокируется в присутстви растворимой или слущенной формы BCMA. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена с клетками, экспрессирующими поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается

или не блокируется в присутствии растворимой или слущенной формы BCMA. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления связывание первого CAR с клетками, экспрессирующими поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутстви растворимой или слущенной формы BCMA. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления показатель, указывающий на функцию или активность первого CAR после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутстви растворимой или слущенной формы BCMA. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления концентрация или количество растворимой или слущенной формы BCMA соответствуют концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или крови, или плазме субъекта или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов с множественной миеломой, или концентрации или количеству растворимого или выдделенного BCMA, при которых связывание или показатель снижается или блокируется, или по существу снижается или блокируется, для клеток, экспрессирующих эталонный анти-BCMA рекомбинантный рецептор, такой как эталонный анти-BCMA CAR, в том же анализе.

[0066] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит от или от около 1×10^7 CAR+ Т-клеток до или до около 2×10^9 CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит от или от около 1×10^7 CAR+ Т-клеток до или до около 1×10^9 CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит от или от около 1×10^8 CAR+ Т-клеток до или до около 1×10^8 CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток включает количество, равное или около 5×10^7 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 1×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около $1,5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 2×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около $2,5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 3×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза

сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около $3,5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 4×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около $4,5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 5×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около $5,5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 6×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 8×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 1×10^9 клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около $1,5\times10^9$ клеток или CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит количество, равное или около 2×10^9 клеток или CAR+ Т-клеток.

[0067] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит комбинацию $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, включает комбинацию $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления соотношение $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток и/или $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток составляет или приблизительно составляет 1:1, или составляет от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления соотношение $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток составляет или приблизительно составляет 1:1. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления соотношение $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток составляет от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, включает комбинацию $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления соотношение $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток

составляет или приблизительно составляет 1:1, или составляет от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления соотношение $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток составляет или приблизительно составляет 1:1. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления соотношение $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток составляет от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1.

[0068] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления доза сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, содержит $CD3^+$ CAR+ Т-клетки.

[0069] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления менее чем или около 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% CAR+ Т-клеток в дозе сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, экспрессируют маркер апоптоза, такой как Аннексин V или активная Каспаза 3. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления менее чем или около 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% CAR+ Т-клеток в дозе сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, экспрессируют маркер апоптоза. В некоторых вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой Аннексин V. В некоторых вариантах осуществления маркер апоптоза представляет собой активную Каспазу 3.

[0070] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, субъект получил лимфодеплеционную терапию, которая включает введение флударабина при или около 20-40 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, субъект получил лимфодеплеционную терапию, которая включает введение флударабина при или около 30 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, субъект получил лимфодеплеционную терапию, которая включает введение циклофосфамида при или около 200-400 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, которые экспрессируют первый CAR, субъект получил лимфодеплеционную терапию, которая включает введение циклофосфамида при или около 300 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления лимфодеплеционная терапия включает введение флударабина при или около 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта ежедневно и циклофосфамида при или около 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта ежедневно в течение 3 дней.

[0071] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или расстройство. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA,

представляет собой рак. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления представляет собой BCMA-экспрессирующий рак.

[0072] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой лимфому, лейкоз, или злокачественное новообразование из плазматических клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой лимфому, и лимфома представляет собой лимфому Беркита, неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому Ходжкина, макроглобулинемию Вальденстрема, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфому с нерассеченными ядрами, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому маргинальной зоны, лимфому селезенки, узловую моноцитоидную В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, крупноклеточную лимфому, диффузную смешанно-клеточную лимфому, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому (LPL) или лимфому из клеток мантийной зоны (MCL). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой лейкоз, и лейкоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лейкоз плазматических клеток или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой злокачественное новообразование из плазматических клеток, и злокачественное новообразование из плазматических клеток представляет собой множественную миелому (MM) или плазмоцитому. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой множественную миелому (MM). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой рецидивирующую и/или рефрактерную множественную миелому (R/R MM). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому (R/R MM). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой рецидивирующую множественную миелому (MM). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления рак представляет собой рефрактерную множественную миелому (MM).

[0073] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект получил три или более предшествующих терапий для лечения заболевания или расстройства, например. четыре или более предшествующих терапий. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления три или более предшествующих терапий для лечения заболевания или расстройства, или четыре или более предшествующих терапий выбраны из: аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT); иммуномодулирующего средства; ингибитора протеасом; и анти-CD38 антитела. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления иммуномодулирующее средство выбрано из талидомида, леналидомида и помалидомида. В некоторых из любых

представленных вариантов осуществления ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления анти-CD38 антитело представляет собой или включает даратумумаб.

[0074] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект получил от 3 до 15 или от 4 до 15 предшествующих терапий или около 10 предшествующих терапий. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после одной или более из трех или более предшествующих терапий или был невосприимчив к одной или более из них. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после одной или более предшествующих терапий или был невосприимчив к одной или более из них. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 предшествующих терапий или был невосприимчив к ним. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после по меньшей мере 3 предшествующих терапий или был невосприимчив к ним. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел рецидив после по меньшей мере 4 предшествующих терапий или был невосприимчив к ним. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект был невосприимчив или не отвечал на бортезомиб, карфилзомиб, леналидомид, помалидомид и/или анти-CD38 моноклональное антитело.

[0075] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имел предшествующую аутологичную трансплантацию стволовых клеток. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления у субъекта не было предшествующей аутологичной трансплантации стволовых клеток.

[0076] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект не имеет активного или не имел в анамнезе лейкоза плазматических клеток (PCL). В некоторых из любых представленных вариантов осуществления у субъекта развился вторичный лейкоз плазматических клеток (PCL).

[0077] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект представляет собой взрослого субъекта или субъекта возраста 25 или 35 лет или старше. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект представляет собой взрослого субъекта. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект представляет собой субъекта возраста 25 лет или старше. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления представляет собой субъекта возраста 35 лет или старше.

[0078] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления после диагностирования заболевания или расстройства у субъекта прошло приблизительно 4 года или от 2 до 15 лет, или от 2 до 12 лет.

[0079] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления субъект имеет высокий цитогенетический риск согласно IMWG.

Краткое описание чертежей

[0080] Фиг. 1 показывает процент пациентов с объективным ответом (ORR), включая проценты с полным ответом (CR) и строгим полным ответом (sCR), очень хорошим частичным ответом (VGPR) и частичным ответом (PR) у субъектов-людей с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой (ММ), которым вводили композиции, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR, специфический в отношении В-клеточного антигена созревания (BCMA), в разовой дозе уровня дозы 1 (DL1), содержащей общее количество 5×10^7 CAR+ Т-клеток, в разовой дозе уровня дозы 2 (DL2), содержащей общее количество $1,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток, или в разовой дозе уровня дозы 3 (DL3), содержащей общее количество $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток. [b] У одного субъекта из когорты DL3 не оценивали эффективность из-за отсутствия оценки ответа после базового уровня в День 29.

[0081] Фиг. 2 показывает оценку ответа с течением времени у субъектов в DL1 когортах при самом длительном периоде наблюдения после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток (n=14).

[0082] Фиг. 3 показывает экспансию и длительную персистенцию CAR+ Т-клеток в периферической крови субъектов в DL1, DL2 и DL3 когортах, измеренные путем количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) препаратов геномной ДНК из образцов цельной крови для детекции векторных последовательностей, кодирующих CAR (копии вектора/мкг геномной ДНК). LLOQ - нижний предел количественного определения; LLOD - нижний предел детекции.

[0083] Фиг. 4A показывает уровень растворимого BCMA (sBCMA) (нг/мл) в сыворотке субъектов до введения CAR+ Т-клеток и в различных точках времени после введения (День 29, Месяц 2 и Месяц 3) у субъектов с общим ответом PR или лучше (PR, VGPR, CR или sCR; ответившие на терапию) по сравнению с субъектами с общим ответом, который хуже чем PR (MR или SD; не ответившие на терапию). Фиг. 4B показывает уровень sBCMA до введения CAR+ Т-клеток (предварительное лечение) у субъектов, которые продемонстрировали общий ответ PR или лучше (PR, VGPR, CR или sCR; ответившие на терапию), и у субъектов, которые продемонстрировали ответ хуже чем PR (MR или SD; не ответившие на терапию).

[0084] Фиг. 5A-5D показывают иллюстративные фенотипические профили 40 композиций сконструированных CAR+ Т-клеток, каждая из которых получена от пациента с множественной миеломой. Профили экспрессии CD45RA×CCR7 среди композиций CAR+ Т-клеток показаны для CD4+ популяций (Фиг. 5A) и CD8+ популяций (Фиг. 5B). CD27×CD28 профили экспрессии среди композиций CAR+ Т-клеток показаны для CD4+ популяций (Фиг. 5C) и CD8+ популяций (Фиг. 5D). Каждая композиция CAR+ Т-клеток показана точкой (●), крестиком (×), ромбом (◊) или треугольником (Δ).

Подробное описание изобретения

[0085] В настоящей заявке представлены способы и применения, сконструированные клетки, композиции, комбинации, готовые изделия и соединения, включая связывающиеся, нацеленные или направленные на В-клеточный антиген

созревания (BCMA) и BCMA-экспрессирующие клетки и заболевания. Представленные способы можно использовать для лечения заболеваний или состояний, связанных с BCMA. Было отмечено, что BCMA экспрессируется при некоторых заболеваниях и состояниях, таких как злокачественные опухоли или ткани, или их клетки, например, на злокачественных плазматических клетках, особенно у субъектов с множественной миеломой (MM), включая рецидивирующую/рефрактерную множественную миелому (R/R MM), например, с низкой экспрессией на нормальных тканях. Представленные варианты осуществления включают подходы, полезные для лечения таких заболеваний и состояний и/или для нацеливания на такие типы клеток, в том числе клетки, включающие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, включая химерные антигенные рецепторы (CAR), а также включающие их композиции и готовые изделия.

[0086] В некоторых аспектах представлен способ лечения, который включает введение антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), такого как рекомбинантный IL-1Ra, в комбинации с BCMA-нацеленной клеточной терапией. В вариантах осуществления представленных способов IL-1Ra вводят непосредственно перед введением, одновременно с введением и/или сразу после введения BCMA-нацеленной клеточной терапии (например, анти-BCMA CAR-T клеток). В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят непосредственно перед введением BCMA-нацеленной клеточной терапии (например, анти-BCMA CAR-T клеток), и введение может продолжаться в течение короткого периода времени (например, до одной недели или 5 дней) после введения BCMA-нацеленной терапии, для уменьшения, предотвращения и/или облегчения возможной токсичности, связанной с клеточной терапией. Таким образом, в некоторых аспектах представленные способы обеспечивают профилактическое лечение токсичности, которое может или которое могло бы привести к результату у субъекта при введении BCMA-нацеленной клеточной терапии (например, анти-BCMA CAR-T клеток). В некоторых аспектах представленные подходы также полезны для уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности, такой как синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность (NT)/неврологические явления (NE) и/или синдром активации макрофагов (MAS), которые, в некоторых случаях, могут быть связаны с такими лечениями, включая клеточную терапию, например клеточную терапию с клетками, включающими BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, включая химерные антигенные рецепторы (CAR), и с включающими их композициями. В некоторых аспектах способы и применения замедляют появление токсичности, связанной с введением клеточной терапии, необязательно синдрома высвобождения цитокинов (CRS), на один день или более. В некоторых вариантах осуществления способы и применения замедляют начало развития CRS, связанного с введением клеточной терапии, на один день или более.

[0087] В некоторых аспектах также представлены способы лечения, которые включают введение клеточной терапии, например включающей сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, который связывается, нацеливается или направлен на BCMA, субъектам, которые ранее получили одну или более

предшествующих терапий, направленных на BCMA. В некоторых аспектах субъекты могли уже получить предшествующие терапии, которые направлены на BCMA, включая предшествующие лечения или терапию с BCMA-связывающими или BCMA-нацеленными агентами, такими как BCMA-нацеленный конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), BCMA-нацеленный рекрутер Т-клеток (TCE) или клетки, экспрессирующие BCMA-нацеленный химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых аспектах субъект может не отвечать на предшествующие терапии, такие как предшествующие BCMA-направленные терапии, иметь рецидив после них или является невосприимчивым к ним. В некоторых аспектах представленные способы и применения можно использовать для субъектов, которые не ответили на предшествующие BCMA-направленные терапии, имели рецидив после них или стали невосприимчивыми к ним. В некоторых аспектах представленные варианты осуществления могут привести к благоприятным эффектам, таким как высокая частота ответа, низкое число случаев неблагоприятных событий (например, токсичности), продолжительный ответ и, в некоторых случаях, улучшение ответа с течением времени, например, у субъектов, которые не ответили на предшествующие терапии, такие как предшествующие BCMA-направленные терапии, имели рецидив после них или стали невосприимчивыми к ним.

[0088] Способы, обеспечиваемые настоящим изобретением, включают введение дозы клеток, таких как содержащие или обогащенные Т-клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, такой как CAR, который направлен против BCMA или связывается с ним. BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, как правило, могут содержать антигенсвязывающие домены, которые включают антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как одноцепочечные фрагменты, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), однодоменные фрагменты антител, вариабельные (V_H) области тяжелой цепи), специфические в отношении BCMA. Сконструированные или рекомбинантные клетки, например, сконструированные Т-клетки, экспрессирующие такие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, например анти-BCMA CAR, и/или содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие такие рецепторы, могут быть представлены в виде композиций для применения в представленных способах и для введения терапевтических доз, содержащих такие клетки.

[0089] Адоптивные клеточные терапии (в том числе терапии, включающие введение клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, специфические в отношении представляющего интерес заболевания или расстройства, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие адоптивные иммунные клеточные и адоптивные Т-клеточные терапии) могут быть эффективны при лечении рака и других заболеваний и расстройств. В определенных контекстах имеющиеся подходы к адоптивной клеточной терапии не всегда могут быть полностью удовлетворительными. В некоторых аспектах, способность введенных клеток распознавать и связываться с мишенью, например, антигеном-мишенью, таким как BCMA, перемещаться, локализоваться и успешно проникать в соответствующие участки в

организме субъекта, опухоли и их окружение, активироваться, размножаться, выполнять различные эффекторные функции, включая цитотоксическое уничтожение и секрецию различных факторов, таких как цитокины, сохраняться, в том числе длительно, дифференцироваться, переходить или участвовать в перепрограммировании в определенные фенотипические состояния для обеспечения эффективных и устойчивых вторичных иммунных ответов после клиренса и повторного контакта с целевым лигандом или антигеном, и избегать или уменьшать истощение, анергию, терминальную дифференцировку и/или дифференцировку в супрессивное состояние.

[0090] В некоторых аспектах имеющиеся подходы к лечению заболеваний или расстройств, таких как множественная миелома, являются сложными и не всегда могут быть полностью удовлетворительными. В некоторых аспектах выбор схемы лечения может зависеть от множества факторов, включая доступность лекарственных средств, ответ на предшествующую терапию, агрессивность рецидива, право на аутологичную трансплантацию стволовых клеток (ASCT), а также от того, произошел ли рецидив на фоне терапии или нет. В некоторых аспектах ММ приводит к рецидивам и ремиссиям, и существующий режим в некоторых случаях может привести к рецидиву и/или токсичности лечения. В некоторых случаях субъекты с особенно агрессивным заболеванием, например, субъекты с персистирующим или рецидивирующим заболеванием после различных терапий, субъекты с высокой тяжестью заболевания, например, высокой опухолевой нагрузкой, и/или субъекты с особенно агрессивными типами заболевания, например плазмацитомой, могут особенно трудно поддаваться лечению, а ответы на определенные терапии у этих субъектов могут быть слабыми или иметь короткую продолжительность. В некоторых случаях субъекты, прошедшие интенсивное предварительное лечение, например, субъекты, у которых произошел рецидив после нескольких различных предшествующих терапий, могут демонстрировать низкую частоту ответов и/или высокую частоту нежелательных явлений.

[0091] В некоторых аспектах терапевтический эффект адоптивной клеточной терапии может быть ограничен развитием токсичности (например, CRS, NT или MAS) у субъекта, которому вводятся такие клетки, которая в некоторых случаях может быть тяжелой, при определенных дозах или воздействии введенных клеток. В некоторых случаях, хотя более высокая доза таких клеток может увеличить терапевтический эффект, например, за счет увеличения воздействия клеток, например, за счет стимулирования экспансии и/или персистенции, она также может привести к большему риску развития токсичности или более тяжелой токсичности. В некоторых аспектах некоторые из введенных клеток могут содержать клетки, которые быстро разрастаются или пролиферируют, что также может способствовать риску развития токсичности или более тяжелой токсичности. Кроме того, в некоторых случаях субъекты с более тяжелым бременем заболевания также могут подвергаться большему риску развития токсичности или более тяжелой токсичности. Некоторые существующие методы определения доз клеточной терапии для субъектов не всегда могут быть полностью удовлетворительными.

Увеличение дозы клеток или стимулирование экспансии или пролиферации введенных клеток у субъекта может быть связано с более высокой частотой ответа, но также с увеличением развития токсичности.

[0092] Представленные способы включают введение IL-1Ra (например, рекомбинантного IL-1Ra) до и/или в комбинации с BCMA-нацеленной клеточной терапией, например, для профилактики, и позволяют систематически контролировать токсичность, которая может быть связана с иммунотерапией и/или адоптивной клеточной терапией. Предлагаемые способы имеют преимущества перед существующими подходами в предотвращении, уменьшении тяжести, ослаблении, смягчении, лечении и/или предотвращении возникновения токсичности, такой как CRS, NT и/или MAS, которая может быть связана с клеточной терапией. В некоторых аспектах представленные способы снижения тяжести, ослабления и/или предотвращения возникновения токсичности включают профилактическое введение терапевтического средства, такого как рекомбинантный IL-1Ra, до введения дозы клеток для клеточной терапии. В некоторых аспектах профилактическое введение дополнительного терапевтического средства, такого как рекомбинантный IL-1Ra, может обеспечить преимущество в снижении тяжести, ослаблении и/или предотвращении возникновения токсичности, начинающейся во время введения клеточной терапии, без снижения активности или терапевтического эффекта клеточной терапии. В некоторых аспектах представленные способы и применения позволяют дозировать клетки, которые могут достичь или могут быть связаны с высокой или определенной желаемой степенью вероятности результата лечения (например, благоприятного результата или ответа, такого как полный ответ, строгий полный ответ, или очень хороший частичный ответ, и/или устойчивый ответ или результат), а также связаны с относительно низкой или минимизированной или желаемой степенью вероятности риска развития токсического результата или токсичности после введения субъекту клеточной терапии.

[0093] В некоторых аспектах представленные способы и применения приводят к клеточной терапии, которая демонстрирует длительную персистенцию клеток после введения клеток, наряду с высокой частотой ответа и низким уровнем токсичности (например, CRS или NE, например, CRS 3 степени или выше или нейротоксичность 3 степени или выше). В некоторых аспектах было отмечено, что можно вводить относительно высокую дозу BCMA-связывающих CAR-экспрессирующих клеток, и такие дозы приводят к высокой частоте объективного ответа при низком уровне токсичности, включая очень низкую частоту тяжелой токсичности (например, CRS 3-й или более высокой степени или нейротоксичности 3-й или более высокой степени). В некоторых аспектах представленные способы могут быть использованы для дальнейшего снижения тяжести, ослабления, задержки или предотвращения возникновения токсичности, например, тяжелой токсичности, путем профилактического введения терапевтического средства для ослабления токсичности. В некоторых случаях представленные варианты осуществления изобретения также позволяют улучшить экспансию и/или персистенцию введенных

сконструированных клеток, и в некоторых случаях приводят к продолжительному ответу и/или ответу, который улучшается с течением времени. В некоторых аспектах лечение субъектов с агрессивным или рефрактерным заболеванием (например, субъектов, прошедших интенсивную предварительную терапию, субъектов с высокой опухолевой нагрузкой и/или субъектов с агрессивным типом заболевания) в соответствии с представленными вариантами осуществления изобретения, как было отмечено, обеспечивает безопасное, эффективное и длительное лечение.

[0094] В различных аспектах BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы для использования в представленных способах и применениях, включая полинуклеотиды, кодирующие такие рецепторы, сконструированные клетки и клеточные композиции, проявляют определенные желаемые свойства, которые могут преодолеть или противодействовать определенным ограничениям, которые могут снижать оптимальный ответ на клеточную терапию. В некоторых аспектах клеточную терапию с использованием сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, назначают субъектам, которые ранее получали, но не ответили на предшествующую BCMA-направленную терапию, имели после нее рецидив и/или стали невосприимчивыми к такой терапии.

[0095] В некоторых аспектах наблюдалось, что композиции, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие примерный BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, демонстрировали постоянство клеточного здоровья сконструированных клеток и были связаны с улучшением клинического ответа. В некоторых контекстах сконструированные клетки и композиции клеток для использования в представленных способах и применениях могут обеспечить различные преимущества по сравнению с существующими терапиями, нацеленными на BCMA, например, для профилактики, уменьшения тяжести, ослабления, смягчения, лечения и/или предотвращении возникновения токсичности, а также для улучшения активности рекомбинантных рецепторов и ответа на BCMA-нацеленные клеточные терапии. Кроме того, было замечено, что представленные способы и применения сконструированных клеток или композиций, включающих сконструированные клетки, обеспечивают преимущество при лечении субъектов, что приводит к высокой частоте ответа, стойкому ответу и низкой частоте неблагоприятных событий при различных испытанных уровнях дозы, включая относительно высокие дозы. Кроме того, было замечено, что представленные способы и применения сконструированных клеток или композиций, включающих сконструированные клетки, обеспечивают преимущество при лечении субъектов с особенно агрессивным и/или рефрактерным заболеванием, или субъектов, которые имели рецидив и/или являются невосприимчивыми к многочисленным различным предшествующим методам лечения, включая предшествующие BCMA-направленные методы лечения заболевания.

[0096] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, указанные в настоящей заявке, включены в нее посредством ссылки в полном

объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была включена в нее посредством ссылки. Если определение, изложенное в настоящей заявке, противоречит или иным образом не согласуется с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки, то определение, изложенное в настоящей заявке имеет преимущество над определением, которое включено в настоящую заявку посредством ссылки.

[0097] Заголовки разделов, используемые в настоящей заявке, приведены исключительно в организационных целях и не должны толковаться как ограничивающие изобретение, описанное в настоящей заявке.

I. Способы и применения для сконструированных клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы, специфические в отношении В-клеточного антигена созревания

[0098] В настоящей заявке представлены способы введения и применения, такие как терапевтические и профилактические применения, сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (*например*, CAR), связывающие В-клеточный антиген созревания (BCMA), сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (*например, CAR*), множества сконструированных клеток, экспрессирующих такие рецепторы, и/или включающих их композиций, например, для лечения заболеваний, состояний и расстройств. В некоторых аспектах заболевание, состояние или расстройство включает такие, при которых экспрессируется BCMA, такие как рак или опухоль. В некоторых аспектах представленные способы включают введение сконструированных клеток или их композиций субъектам, которые получили предшествующие лечения или терапию, которые направлены на BCMA, такие как предшествующие лечения или терапия BCMA-связывающими или BCMA-нацеленными агентами, такими как BCMA-нацеленный конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), BCMA-нацеленный рекрутер Т-клеток (TCE) или клетки, экспрессирующие BCMA-нацеленный химерный антигенный рецептор (CAR). Из указанных способов такие как способы лечения и применения представляют собой способы, которые включают введение субъекту сконструированных клеток, таких как множество сконструированных клеток, экспрессирующих анти-BCMA рекомбинантный рецептор (например, CAR). Также представлены способы комбинированной терапии и/или лечения. В некоторых аспектах также представлены профилактические и терапевтические способы и применения, которые включают введение сконструированных клеток или их композиций и дополнительного средства.

[0099] В некоторых аспектах также представлены способы комбинированной терапии, которые включают введение дополнительного терапевтического средства, например терапевтического средства для профилактического применения для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности (например, синдрома высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичности (NT)/неврологических явлений (NE)

и/или синдрома активации макрофагов (MAS), которая, в некоторых случаях, может быть связана с клеточной терапией. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), например, анакинру. В некоторых аспектах представленные способы и применения включают лечение конкретных субъектов, таких как субъекты, которые ранее получили BCMA-направленную терапию, такую как предшествующая терапия, которая включала BCMA-связывающую молекулу (например, химерные антигенные рецепторы (CAR), рекрутеры Т-клеток, антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство). В некоторых аспектах представленные способы обеспечивают возможность лечения субъектов, которые ранее получили предшествующую BCMA-направленную терапию и не ответили на предшествующую BCMA-направленную терапию, имели рецидив после нее и/или стали невосприимчивыми к ней.

[0100] Такие представленные способы и применения включают терапевтические способы и применения, например включающие введение сконструированных клеток (*например*, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, специфический в отношении BCMA) или содержащих их композиций, и/или в комбинации с дополнительным терапевтическим средством (например, рекомбинантным IL-1Ra), субъекту, имеющему заболевание, состояние или расстройство, связанное с BCMA, такое как заболевание, состояние или расстройство, связанное с экспрессией BCMA (например, множественную миелому), и/или при котором клетки или ткани экспрессируют, *например,* специфически экспрессируют BCMA. В некоторых вариантах осуществления клетку и/или композицию вводят в эффективном количестве для осуществления лечения заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления клетку и/или дополнительное терапевтическое средство (например, рекомбинантный IL-1Ra) вводят в эффективном количестве для уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности, которая, в некоторых случаях, может быть связана с клеточной терапией.

[0101] В настоящей заявке представлены применения клеток (например, сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, такие как CAR), композиций и/или дополнительного терапевтического средства (например, рекомбинантного IL-1Ra) в таких способах и лечениях и для изготовления или получения лекарственного средства для осуществления таких терапевтических и/или профилактических способов. В некоторых аспектах представлены сконструированные клетки и/или содержащие их композиции для применения для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, такого как заболевание или расстройство, связанное с BCMA, например, множественной миеломы. В некоторых аспектах представлены одно или более дополнительных терапевтических средств (например, рекомбинантный IL-1Ra) для применения для изготовления лекарственного средства для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности, которая может быть связана с клеточной терапией, такой как любая клеточная терапия, описанная в настоящей заявке. В некоторых аспектах представлены комбинации, такие как

комбинации, включающие сконструированные клетки и/или содержащие их композиции и дополнительное терапевтическое средство (например, рекомбинантный IL-1Ra) для применения для изготовления одного или более лекарственных средств для лечения заболевания или расстройства.

[0102] В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют путем введения сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или включающих их композиций и/или дополнительного терапевтического средства (например, рекомбинантного IL-1Ra) субъекту, который имеет, имел или у которого подозревается заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления способы, таким образом, лечат заболевание или состояние или расстройство у субъекта. Также в настоящей заявке представлено применение любой из композиций, таких как фармацевтические композиции, представленные в настоящей заявке, для лечения заболевания или расстройства, связанного с BCMA, например, применение в схеме лечения. В некоторых вариантах осуществления способ, таким образом, уменьшает тяжесть, облегчает и/или предотвращает возникновение токсичности, которая, в некоторых случаях, может быть связана с клеточной терапией, у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, подлежащее лечению сконструированными клетками (*например*, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, специфический в отношении BCMA) и/или композициями, включающими сконструированные клетки. Также в настоящей заявке представлено применение любой из композиций, таких как фармацевтические композиции, представленные в настоящей заявке, и/или комбинаций, таких как комбинация фармацевтических композиций представленных в настоящей заявке, для лечения заболевания или расстройства, связанного с BCMA, такое как применение в схеме лечения; и/или для профилактической схемы лечения, например, для уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения возникновения токсичности, которая, в некоторых случаях, может быть связана с клеточной терапией.

[0103] Представленные варианты осуществления, в некоторых контекстах, также основаны на наблюдении из клинического исследования, что введение сконструированных клеток, экспрессирующих определенный BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, таких как клетки, описанные в настоящей заявке, приводит к высокой частоте ответа и низкой частоте неблагоприятных событий, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS) или неврологические явления (NE; или нейротоксичность; NT). В некоторых аспектах представленные способы и применения позволяют вводить относительно высокую дозу сконструированных клеток для клеточной терапии, что может привести к высокой частоте ответа с низкой частотой неблагоприятных событий.

A. Терапевтические способы и применения

[0104] В настоящей заявке представлены способы введения и применения, такие как терапевтические применения, сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы (например, CAR), сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, CAR), множества

сконструированных клеток, экспрессирующих рецепторы, и/или включающих их композиций.

[0105] Как используется в настоящей заявке, "лечение" (и его грамматические варианты, такие как "лечить" или "лечащий") относится к полному или частичному облегчению или уменьшению тяжести заболевания, состояния или расстройства, или симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или фенотипа, связанного с ним. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются этим, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или временное облегчение состояния заболевания, а также ремиссию или улучшение прогноза. Эти термины не подразумевают полного излечения заболевания или полного устранения какого-либо симптома или эффекта(эффектов) на все симптомы или конечные результаты.

[0106] Как используется в настоящей заявке, "задержка развития заболевания" означает отсрочить, препятствовать, замедлить, задержать, стабилизировать, подавить и/или отложить развитие заболевания (например, рака). Эта задержка может быть различной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или субъекта, которого лечат. Достаточная или значительная задержка может, по сути, включать профилактику, в том смысле, что у субъекта не развивается заболевание. Например, рак на поздней стадии, такой как развитие метастаз, может быть отсрочен.

[0107] "Предотвращение", как используется в настоящей заявке, включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированные клетки и композиции, описанные в настоящей заявке, используются для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания и/или для снижения тяжести, ослабления и/или предотвращения наступления неблагоприятного события или побочного эффекта, например, токсичности.

[0108] Как используется в настоящей заявке, "подавление" функции или активности означает снижение функции или активности по сравнению с другими такими же состояниями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, антитело, композиция или клетка, подавляющая рост опухоли, снижает скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие антитела, композиции или клетки.

[0109] "Эффективное количество" агента, например, фармацевтической композиции, антитела, клеток или композиции, в контексте введения относится к количеству, эффективному в дозах/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

[0110] "Терапевтически эффективное количество" агента, например,

фармацевтической композиции, антитела, клеток или состава относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или расстройства, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также популяции вводимых клеток. В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают введение молекул, антител, клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, в терапевтически эффективных количествах.

[0111] Под "профилактически эффективным количеством" понимается количество, эффективное в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется для субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

[0112] Как используется в настоящей заявке, "субъект" или "индивидуум" означает млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения "млекопитающее" включает людей, отличных от человека приматов, домашних и сельскохозяйственных животных, а также зоопарковых, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки, обезьяны и т.д. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

[0113] Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы в связи с представленными способами и композициями. Например, методы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2003/0170238, Gruenberg et al; патенте США № 4690915, 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.

1. Субъекты и показания, подлежащие лечению

[0114] Из заболеваний, подлежащих лечению, можно указать любое заболевание или расстройство, связанное с BCMA, или любое заболевание или расстройство, при котором BCMA специфически экспрессируется и/или при котором BCMA выбран в качестве мишени для лечения (также в настоящей заявке взаимозаменяемо указано как “BCMA-связанное заболевание или расстройство”). Рак, связанный с экспрессией BCMA, включает гематологические злокачественные опухоли, такие как множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, а также лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому. Обзор BCMA см. в Coquery *et al.*, *Crit Rev Immunol.*, 2012, 32(4):287-305. Поскольку BCMA вовлечен в опосредование выживания опухолевых клеток, он является потенциальной мишенью для терапии рака. Химерные антигенные рецепторы, содержащие мышиные антитела к человеческому BCMA, и клетки, экспрессирующие такие химерные

рецепторы, были описаны ранее. *См.* Carpenter *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 2013, 19(8):2048-2060.

[0115] В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с BCMA, представляет собой связанное с В-клетками расстройство. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с BCMA, представляет собой одно или более из заболеваний или состояний, выбранных из глиобластомы, лимфоматоидного гранулематоза, посттрансплантационного лимфопролиферативного расстройства, иммунорегуляторного расстройства, болезни тяжелых цепей, первичного или иммуноцит-ассоциированного амилоидоза или моноклональной гаммопатии неопределенного значения.

[0116] В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, связанное с BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или расстройство. Такие аутоиммунные заболевания или расстройства включают, но не ограничиваются этим, системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит (например, ювенильный ревматоидный артрит), ANCA-ассоциированный васкулит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Шагаса, болезнь Грейвса, гранулематоз Вегенера, нодозный полиартериит, синдром Шегрена, обыкновенную пузырчатку, склеродермию, рассеянный склероз, псориаз, IgA нефропатию, IgM полинейропатию, васкулит, сахарный диабет, синдром Рейно, антифосфолипидный синдром, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемия, тяжелую миастению или прогрессирующий гломерулонефрит.

[0115] При некоторых заболеваниях и состояниях BCMA экспрессируется на злокачественных и раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления рак (*например*, BCMA-экспрессирующий рак) представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак (*например*, BCMA-экспрессирующий рак) представляет собой лимфому, лейкоз или злокачественное новообразование из плазматических клеток. Лимфомы, рассматриваемые в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются этим, лимфому Беркита (*например*, эндемическую лимфому Беркита или спорадическую лимфому Беркита), неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому Ходжкина, макроглобулинемию Вальденстрема, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфому с нерассеченными ядрами, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому маргинальной зоны, лимфому селезенки, узловую моноцитоидную В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, крупноклеточную лимфому, диффузную смешанно-клеточную лимфому, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому (LPL) или лимфому из клеток мантийной зоны (MCL). Лейкозы, рассматриваемые в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются этим, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лейкоз плазматических клеток или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL). Также в настоящей

заявке рассматриваются злокачественные новообразования плазматических клеток включая, но не ограничиваясь этим, множественную миелому (*например*, несекреторную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому) или плазмоцитому. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой множественную миелому (ММ), такую как рецидивирующая и/или рефрактерная множественная миелома (R/R ММ). В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой плазмоцитому, такую как экстрамедуллярная плазмоцитома. В некоторых вариантах осуществления субъект не имеет плазмоцитому, такую как экстрамедуллярная плазмоцитома. Заболевания, расстройства или состояния, связанные с BCMA (*например*, BCMA-экспрессирующий рак), которые можно лечить, включают, но не ограничиваются этим, нейробластому, почечно-клеточную карциному, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак молочной железы, эпителиальный плоскоклеточный рак, меланому, миелому (например, множественную миелому), рак желудка, рак головного мозга, рак легких, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, тестикулярный рак, рак щитовидной железы, рак матки, рак надпочечников и рак головы и шеи.

[0118] В некоторых вариантах осуществления способы могут идентифицировать субъекта, у которого имеется, подозревается или имеется риск развития BCMA-ассоциированного заболевания или расстройства. Таким образом, представлены способы выявления субъектов с заболеваниями или расстройствами, связанными с повышенной экспрессией BCMA, и отбора их для лечения с использованием сконструированной клетки, экспрессирующей BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы (например, CAR)

[0119] В некоторых аспектах, например, субъекта можно подвергнуть скринингу на присутствие заболевания или расстройства, связанного с повышенной экспрессией BCMA, такого как BCMA-экспрессирующий рак. В некоторых вариантах осуществления способы включают скринирование на присутствие или выявление присутствия BCMA-связанного заболевания, *например,* опухоли или рака, такого как множественная миелома. Таким образом, в некоторых аспектах, можно получить образец от пациента, у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с повышенной экспрессией BCMA, и проанализировать на уровень экспрессии BCMA. В некоторых аспектах субъект, который имеет положительный результат анализа на BCMA-связанное заболевание или расстройство, может быть выбран для лечения способами по настоящему изобретению, и ему можно вводить терапевтически эффективное количество сконструированных клеток, включающих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), который связывается с BCMA, или их фармацевтическую композицию, как описано в настоящей заявке.

2. Предшествующие терапии

[0120] В некоторых вариантах осуществления до начала введения сконструированных клеток субъект получил одну или более предшествующих терапий. В некоторых аспектах субъекты, подлежащие лечению в соответствии с представленными

способами и применениями, включает субъектов, которые получили одну или более предшествующих терапий. В некоторых аспектах субъекты, подлежащие лечению в соответствии с представленными способами и применениями, включают субъектов, которые получили одну или более предшествующих терапий и имели рецидив после одной или более предшествующих терапий и/или стали невосприимчивым к ним. В некоторых вариантах осуществления субъект получил по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более предшествующих терапий. В некоторых вариантах осуществления субъект получил по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более предшествующих терапий. В некоторых вариантах осуществления любая одна или более из предшествующих терапий представляет собой BCMA-направленную терапию, такую как BCMA-направленную антимиеломную терапию.

[0121] В некоторых вариантах осуществления субъект получил BCMA-направленную терапию до введения сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления до начала введения сконструированных клеток субъект получил 1, 2 или 3 предшествующие BCMA-направленные терапии. В некоторых вариантах осуществления субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из: терапии с использованием рекрутера Т-клеток (TCE), терапии с использованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) и терапии с использованием Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из: BCMA-направленной терапии с использованием рекрутера Т-клеток (TCE), BCMA-направленной терапии с использованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) и BCMA-направленной CAR Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная терапия включает моноклональное антитело. В некоторых аспектах иллюстративные предшествующие BCMA-направленные терапии включают, но не ограничиваются этим, терапии, описанные в Mullard et al., Nat Rev Drug Discov. 2019 Jul;18(7):481-484; Duell et al., (2019) Clin. Pharmacol. Ther., 106: 781-791; O'Donnell et al., Ther Adv Hematol. 2017 Feb; 8(2): 41-53; Borrello et al., J Clin Invest. 2019;129(6):2175-2177; Lin et al. Molecular Cancer (2019) 18:154; и Steiner et al., (2020) memo - Magazine of European Medical Oncology 13:43-49, или любые BCMA-направленные терапии, описанные в настоящей заявке.

[0122] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная терапия представляет собой анти-BCMA моноклональное антитело. Иллюстративное анти-BCMA моноклональное антитело включает SEA-BCMA, афукозилированное моноклональное антитело (см., например, Van Epps et al., Cancer Res July 1 2018 (78) (13 Supplement) 3833; Abdallah et al., Journal of Clinical Oncology 2019 37:15_suppl, TPS8054-TPS8054).

[0123] В некоторых из любых вариантов осуществления субъект не ответил на одну или более предшествующих терапий, имеет персистирующее или рецидивирующее

заболевание после них или был или стал невосприимчивым к ним. В некоторых аспектах субъект имел рецидив или он был невосприимчивым к одной или более предшествующих терапий, например, во время или до введения клеточной терапии с использованием клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, описанные в настоящей заявке (например, BCMA-связывающие CAR). В некоторых аспектах субъект не ответил на одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, имел рецидив после них или был невосприимчивым к ним. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению в соответствии с представленные способами или применениями, включают субъектов, которые не ответили на одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, имели рецидив после них или были невосприимчивыми к ним. В некоторых аспектах BCMA-направленные терапии включают одну или более из: терапии с использованием рекрутера Т-клеток (TCE), терапии с использованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) и CAR Т-клеточной терапии, такой как любая описанная в настоящей заявке. В некоторых аспектах субъекты, подлежащие лечению в соответствии с представленными вариантами осуществления, включают субъектов, которые имели рецидив после или были невосприимчивы к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий, описанных в настоящей заявке.

[0124] В некоторых из любых вариантов осуществления субъект имел рецидив после предшествующей BCMA-направленной терапии или он был невосприимчив к ней в пределах или примерно за 18 месяцев, 1 год, 9 месяцев, 6 месяцев или 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих BCMA-связывающий CAR, описанный в настоящей заявке. В некоторых из любых вариантов осуществления, субъект имел рецидив после предшествующей BCMA-направленной терапии или он был невосприимчив к ней в пределах или примерно за 1 год до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих BCMA-связывающий CAR, описанный в настоящей заявке. В некоторых из любых вариантов осуществления субъект имел рецидив после предшествующей BCMA-направленной терапии или он был невосприимчив к ней в пределах или примерно за 6 месяцев до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих BCMA-связывающий CAR, описанный в настоящей заявке. В некоторых из любых вариантов осуществления субъект имел рецидив после предшествующей BCMA-направленной терапии или он был невосприимчив к ней в пределах или примерно за 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих BCMA-связывающий CAR, описанный в настоящей заявке.

a. Рекрутер Т-клеток (TCE)

[0125] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная терапия представляет собой терапию с использованием рекрутера Т-клеток (TCE). В некоторых аспектах TCE представляют собой антитела, которые одновременно связываются с поверхностью антигена опухолевой клетки и компонентом комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), чтобы вызвать опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток, несущих целевой поверхностный антиген. В некоторых аспектах, после

образования цитолитического синапса, Т-клетки высвобождают перфорин и гранзим В, что в конечном итоге приводит к апоптозу опухолевых клеток. Активация Т-клеток может привести к транзиторному высвобождению цитокинов, что вовлекает другие иммунные клетки и расширяет иммунный ответ против опухолевой ткани и может привести к пролиферации Т-клеток и серийному уничтожению опухолевых клеток. Примеры TCE терапий включают терапию с использованием биспецифического рекрутера Т-клеток (BiTE) и биспецифических антител (см., например, Mullard et al., Nat Rev Drug Discov. 2019 Jul;18(7):481-484; Duell et al., (2019) Clin. Pharmacol. Ther., 106: 781-791; O'Donnell et al., Ther Adv Hematol. 2017 Feb; 8(2): 41-53). В некоторых вариантах осуществления BCMA-направленный TCE нацелен на BCMA и CD3, например, BiTE, включающий два одноцепочечных вариабельных фрагмента (scFv), один из которых направлен против BCMA, слитый с другим, направленным против CD3 антигена, присутствующего на Т-лимфоцитах.

[0126] Иллюстративные предшествующие терапии BCMA-направленным TCE включают, но не ограничиваются этим, AMG 420/BI 836909 (анти-BCMA/анти-CD3 BiTE; Hipp et al., Leukemia (2017) 31:1743-1751; Topp et al. Journal of Clinical Oncology. 2019. 37(15) suppl, 8007-8007), AMG 701 (анти-BCMA/анти-CD3 BiTE с увеличенным периодом полужизни; Cho et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1):135; Cho et al., Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia, 19(10):e54), CC-93269 (анти-BCMA/анти-CD3 биспецифическое антитело; Costa et al. ASH Annual Meeting. 2019. Abstract #143), JNJ-64007957 (анти-CD3/анти-BCMA биспецифическое моноклональное антитело; Girgis et al. Blood. 2016. 128(22):5668), PF-06863135 (анти-CD3/анти-BCMA биспецифическое моноклональное антитело; Lesokhin et al., Blood (2018) 132 (Supplement 1): 3229; Raje et al., Blood (2019) 134 (Supplement_1): 1869) и REGN5458 (анти-BCMA/анти-CD3 BiTE; Cooper et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1):3176).

b. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)

[0127] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная терапия представляет собой терапию с использованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). ADC включают рекомбинантные моноклональные антитела (mAb), ковалентно связанные с биологически активными лекарственными средствами (также называемыми "полезной нагрузкой", например, цитотоксическими химическими веществами) посредством химических линкеров с лабильными связями, например, синтетических химических линкеров. В некоторых аспектах ADC, благодаря части, являющейся антителом, идентифицирует и связывается с антигеном на поверхности клеток-мишеней, таких как опухолевые клетки, а затем поглощается или интернализируется. После интернализации ADC биологически активное лекарственное средство, например, цитотоксические химические вещества, высвобождаются в лизосомах и транспортируются в цитозоль для уничтожения клеток-мишеней. В некоторых аспектах ADC также могут вызывать антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и антитело-зависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз

клеток-мишеней, например, опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления предшествующая терапия, направленная на BCMA, включает ADC, включающий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который является специфическим в отношении BCMA, связывается с ним и/или нацелен на него.

[0128] Иллюстративные BCMA-направленные ADC для предшествующей терапии включают, но не ограничиваются этим, Белантамаб мафодотин (GSK2857916), MEDI2228, CC-99712 и AMG 224. В некоторых вариантах осуществления BCMA-направленный ADC для предшествующей терапии представляет собой Белантамаб мафодотин (GSK2857916), содержащий гуманизированное афукозилированное IgG1 mAb с высокой аффинностью к BCMA (K_D ~ 0,5 нМ), конъюгированное с анти-митотическим средством, монометил ауристатином F, через нерасщепляемый линкер, малеимидокапроил (см., например, Tai et al. Blood. 2014. 123(20):3128-3138). В некоторых вариантах осуществления BCMA-направленный ADC для предшествующей терапии представляет собой MEDI2228, содержащий анти-BCMA антитело, конъюгированное через протеаза-расщепляемый пирролобензодиазепиновый линкер (см., например, Kinneer et al. Blood. 2017. 130 (Supplement_1): 3153; Xing et al., Blood (2019) 134 (Supplement_1): 1817). В некоторых вариантах осуществления BCMA-направленный ADC для предшествующей терапии представляет собой CC-99712. В некоторых вариантах осуществления BCMA-направленный ADC для предшествующей терапии представляет собой AMG 224 (анти-BCMA-MCC-DM1; анти-BCMA представляет собой антитело IgG1 против BCMA человека; MCC представляет собой нерасщепляемый линкер 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, конъюгированный с лизиновыми остатками в антителе; и DM1 представляет собой полусинтетическое производное ансамицинового антибиотика майтансина, конъюгированное с MCC; см., например, O'Donnell et al., Ther Adv Hematol. 2017 Feb; 8(2): 41-53).

c. Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR)

[0129] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная терапия представляет собой терапию с использованием Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает сконструированные клетки, например, сконструированные Т-клетки, экспрессирующие любой из анти-BCMA рекомбинантных рецепторов.

[0130] Иллюстративная предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает, но не ограничивается этим, Идекабтаген виклейсел (Ide-cel, bb2121; Raje et al. N Engl J Med. 2019. 380:1726-1737), JNJ-4528 (Madduri et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 577)/LCAR-B38M (Wang et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 579), P-BCMA-101 (Costello et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 3184), bb21217 (Berdeja et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 927), CT103A (Li et al. Blood. 2019;134(Supplement_1):929), CT053 (Ji et al., Blood. 2019;134(Supplement_1):4435), MTV273, CART-BCMA, C-CAR088 (Yao et al. Blood. 2019;134(Supplement_1):50) или любую BCMA-направленную CAR Т

терапию, описанную, например, в WO 2018/085690; WO 2016/094304; WO 2018/085690; WO 2016/014789; WO 2019/108900; WO/2018/014038; WO 2017/173256; WO 2016/090320, WO 2016/090327, WO 2019/090003; WO 2017/025038; US 2016/0046724; US 2017/0183418; Fu et al., Blood. 2019;134:3154; Cohen et al. J. Clin. Invest. 2019. 129(6): 2210-2221; Ali et al., Blood 2016;128(13):1688 1700; Borrello et al., J Clin Invest. 2019;129(6):2175-2177; Lin et al. Molecular Cancer (2019) 18:154; и Steiner et al., (2020) memo - Magazine of European Medical Oncology 13:43-49).

[0131] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает сконструированные клетки, экспрессирующие любые BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, описанные в настоящей заявке, например любые анти-BCMA CAR, описанные в Разделе III. В некоторых аспектах предшествующая BCMA-направленная CAR Т терапия включает сконструированные клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, описанные в WO 2019/090003. В некоторых аспектах предшествующая BCMA-направленная CAR Т терапия включает сконструированные клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, который представляет собой scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи(V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L), полученную из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в WO 2016/090320, WO 2016/090327, WO 2010/104949, WO 2017/173256 или Carpenter *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 2013, 19(8):2048-2060, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

[0132] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, включающий V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:257, 258 и 259, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:260, 261 и 262, соответственно; и/или V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127; и/или аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:265, и/или последовательность, кодируемую SEQ ID NO:266. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, включающий V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:260, 261 и 262, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258 и 259, соответственно; и/или V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127; и/или аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:263, и/или последовательность, кодируемую SEQ ID NO:264. В некоторых вариантах осуществления предшествующая

BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, включающий последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO:265. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, включающий последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO:263. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:312. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия представляет собой или включает Идекабтаген виклейсел (Ide-cel, bb2121) (см., например, Raje et al. N Engl J Med. 2019. 380:1726-1737; WO 2018/085690; WO 2016/094304; WO 2018/085690 или WO 2016/014789, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте). В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия представляет собой или включает анти-BCMA CAR, последовательность которого представлена в WO 2018/085690; WO 2016/094304; WO 2018/085690 или WO 2016/014789, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

[0133] В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, который представляет собой мультивалентный CAR, такой как связывающийся с двумя эпитопами CAR, например CAR, включающий два разных однодоменных антитела, например VHH, направленных на разные эпитопы на BCMA. В некоторых аспектах предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает анти-BCMA CAR, который связывается с одним или несколькими эпитопами BCMA, выбранными из последовательностей, представленных в SEQ ID NO:303-309. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия представляет собой или включает JNJ-4528 (также называемый LCAR-B38M) (см., например, Madduri et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 577; Wang et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 579; Xu et al. PNAS 2019. 116(19) 9543-9551; Zhao et al., Journal of Hematology & Oncology 11:141 (2018); WO 2018/028647; WO 2017/025038, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте). В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает CAR, включающий аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302, и/или последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 2675-302, и/или CAR, кодируемый последовательностью нуклеотидов, которая кодирует CAR, представленный в любой из SEQ ID NO: 265-302; и/или любой, описанный в WO 2018/028647 или WO 2017/025038, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает CAR, включающий аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности,

представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302.

[0134] В некоторых аспектах предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает Центирин в качестве внеклеточного связывающего домена вместо одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). В некоторых аспектах Центирины представляют собой модифицированные белки домена фибронектина III типа (FN3) с высокой специфичностью и большим диапазоном аффинностей связывания, но они меньше, чем scFv (см., например, Goldberg et al., Protein Eng Des Sel. 2016 Dec;29(12):563-572). В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия представляет собой или включает P-BCMA-101 (Costello et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 3184; Fu et al., Blood. 2019;134:3154; WO 2018/014038 и WO 2019/173636, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте). В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает CAR, включающий аминокислотные остатки 22-334 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 310, и/или последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO:310, и/или CAR, кодируемый последовательностью нуклеотидов, которая кодирует CAR, представленный в любой из SEQ ID NO:310 и/или любой, описанной в WO 2018/014038 или WO 2019/173636, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления предшествующая BCMA-направленная CAR Т-клеточная терапия включает CAR, включающий аминокислотные остатки 22-334 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 310.

[0135] Для субъектов, которые получили предшествующую адоптивную клеточную терапию, такую как предшествующая терапия Т-клетками, экспрессирующими BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, CAR) (CAR Т-клеточная терапия), представленные способы и применения также включают анализ образца, полученного от субъекта, подлежащего лечению, на присутствие, количество и/или уровень ранее введенного BCMA-направленного рекомбинантного рецептора (например, CAR). В некоторых аспектах анализ на присутствие, количество и/или уровень ранее введенного BCMA-направленного рекомбинантного рецептора (например, CAR) можно использовать для детекции существующих клеток у субъекта, которые экспрессируют ранее введенные рекомбинантный рецептор-экспрессирующие клетки, и, если необходимо, выбрать клетки, которые не были ранее сконструированы с предшествующим рекомбинантным рецептором, или клетки, которые не экспрессируют предшествующий рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах такие способы можно использовать уменьшения или предотвращения реконструкции клеток, которые уже сконструированы с предшествующим рекомбинантным рецептором (например, CAR).

[0136] В некоторых из любых вариантов осуществления, если клетки, экспрессирующие предшествующий BCMA-направленный CAR, не присутствуют в образце, полученном от субъекта, или нуклеотидная последовательность, присутствующая в конструкции, кодирующей предшествующий BCMA-направленный CAR, не

присутствует в образце, полученном от субъекта, например в образце, полученном для получения клеток для конструирования, чтобы они экспрессировали BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, представленные в настоящей заявке, субъекта выбирают для введения клеток, сконструированных для экспрессии BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов, представленных в настоящей заявке. В некоторых аспектах субъекта все равно выбирают для введения клеток, сконструированных для экспрессии BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов, представленных в настоящей заявке, даже если клетки, экспрессирующие предшествующий BCMA-направленный CAR присутствуют в образце, полученном от субъекта, или нуклеотидная последовательность, присутствующая в конструкции, кодирующей предшествующий BCMA-направленный CAR, присутствует в образце, полученном от субъекта. В некоторых аспектах способы и применения могут включать выбор Т-клеток, которые не включают предшествующий BCMA-направленный CAR, для получения дозы сконструированных Т-клеток, включающих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, представленные в настоящей заявке, если клетки, экспрессирующие предшествующий BCMA-направленный CAR, присутствуют в образце, полученном от субъекта, или нуклеотидная последовательность, присутствующая в конструкции, кодирующей предшествующий BCMA-направленный CAR, присутствует в образце, полученном от субъекта. В некоторых из любых вариантов осуществления, если клетки, экспрессирующие предшествующий BCMA-направленный CAR, присутствуют в образце, полученном от субъекта, или нуклеотидная последовательность, присутствующая в конструкции, кодирующей предшествующий BCMA-направленный CAR, присутствует в образце, полученном от субъекта, такие клетки, экспрессирующие предшествующий BCMA-направленный CAR или включающие нуклеотид, кодирующий предшествующий BCMA-направленный CAR, исключаются из конструирования, например конструирования для экспрессии BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов, представленных в настоящей заявке, и/или из введения, например исключаются из композиции для введения субъекту.

[0137] В некоторых аспектах, для субъектов, которые получили предшествующую терапию клетками, экспрессирующими BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, CAR Т-клетками), образец, содержащий первичные клетки, полученные от субъекта, например, для конструирования клеток для экспрессии BCMA-специфического CAR, описанного в настоящей заявке, например в Разделе III ниже, анализируют на присутствие предшествующего рекомбинантного рецептора.

[0138] В некоторых аспектах образец от субъекта, подлежащего лечению, может быть оценен путем обнаружения экспрессии предшествующего рекомбинантного рецептора или присутствия последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих предшествующий рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах присутствие предшествующего рекомбинантного рецептора может быть оценено любыми методами, позволяющими определить присутствие, отсутствие, уровень и/или количество белка или нуклеиновой кислоты в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления

присутствие предшествующего рекомбинантного рецептора может быть оценено любыми методами, которые можно использовать для оценки или определения фармакокинетических параметров, биодоступности, персистенции, экспансии и/или количества сконструированных клеток после введения сконструированных клеток или клеточной композиции субъекту, например, субъекту с заболеванием или состоянием для терапии, который получил предшествующую терапию клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, например, предшествующую BCMA-направленную CAR T-клеточную терапию.

[0139] В некоторых аспектах образец от субъекта, подлежащего лечению в соответствии с представленными вариантами осуществления, анализируют на присутствие и/или количество клеток, которые ранее были сконструированы с предыдущим рекомбинантным рецептором, на основании экспрессии предыдущего рекомбинантного рецептора. Присутствие и/или количество клеток, ранее сконструированных с предыдущим рекомбинантным рецептором, в образце от субъекта можно оценить, например, методами на основе нуклеиновых кислот, такими как количественная ПЦР (кПЦР); или методами на основе клеток, такими как проточная цитометрия, или другими анализами, такими как иммуноанализ, ELISA или анализы на основе хроматографии/масс-спектрометрии. Предыдущие рекомбинантные рецепторы или клетки, экспрессирующие предыдущие рекомбинантные рецепторы, могут быть обнаружены с использованием методов проточной цитометрии или количественной ПЦР и экстраполяции на общее количество клеток с использованием известных методов. *См., например,* Brentjens *et al.*, *Sci Transl Med.* 2013 5(177), Park et al, Molecular Therapy 15(4):825-833 (2007), Savoldo *et al.*, *JCI* 121(5):1822-1826 (2011), Davila *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338, Davila *et al.*, *Oncoimmunology* 1(9):1577-1583 (2012), Lamers, *Blood* 2011 117:72-82, Jensen *et al.*, *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 September; 16(9): 1245-1256, Brentjens *et al.*, *Blood* 2011 118(18):4817-4828.

[0140] Иллюстративные методы на основе нуклеиновых кислот для оценки присутствия предшествующего рекомбинантного рецептора включают методы на основе полимеразной цепной реакции, такие как количественная ПЦР (кПЦР), цифровая ПЦР (цПЦР) или капельная цифровая ПЦР (кцПЦР). В некоторых аспектах присутствие, отсутствие и/или количество определенной последовательности может быть обнаружено с использованием зонда или праймера, который может специфически связывать, обнаруживать, распознавать и/или амплифицировать всю или часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей предшествующий рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления праймеры или зонды, используемые для кПЦР или других методов на основе нуклеиновых кислот, являются специфическими для связывания, распознавания и/или амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок (например, предшествующий рекомбинантный рецептор), и/или других компонентов или элементов плазмиды и/или вектора, включая регуляторные элементы, например промоторы, транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы или элементы ответа, или маркеры, например суррогатные маркеры. В некоторых аспектах

иллюстративные методы на основе нуклеиновых кислот для оценки присутствия предшествующих рекомбинантных рецепторов включают высокопроизводительное секвенирование РНК (RNA-seq) или другие высокопроизводительные методы для оценки экспрессии нуклеиновых кислот в образце.

[0141] В некоторых вариантах осуществления для субъектов, получивших предшествующую терапию клетками, экспрессирующим BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, CAR Т-клетками), образец, содержащий первичные клетки, полученные от субъекта, оценивают методом кПЦР с использованием зондов или праймеров, которые могут обнаруживать и/или амплифицировать последовательности, специфические для предшествующего BCMA-направленного рекомбинантного рецептора, или другие компоненты нуклеиновых кислот, используемые для конструирования (например, регуляторные элементы, вирусные последовательности и т.д.). В некоторых аспектах первичные клетки от субъекта используют для конструирования с BCMA-специфическим CAR в соответствии со способами и применениями, представленными в настоящей заявке, если образец от субъекта содержит низкие уровни, например, ниже нижнего предела обнаружения (LLOD) предшествующего рекомбинантного рецептора, как определено методом кПЦР.

[0142] Иллюстративные основанные на клетках или белках методы оценки присутствия предшествующего рекомбинантного рецептора включают проточную цитометрию, иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноферментный анализ (EIA), радиоиммуноанализ (RIA), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), Вестерн-блот, анализ бокового потока, иммуногистохимию, белковый микрочип или иммуно-ПЦР (иПЦР).

[0143] В некоторых вариантах осуществления для субъектов, получивших предшествующую терапию клетками, экспрессирующими BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, CAR Т-клетками), образец, содержащий первичные клетки, полученные от субъекта, оценивают методом проточной цитометрии с использованием реагентов, таких как выделенный или очищенный антиген, например, рекомбинантно экспрессированный антиген, например рекомбинантный BCMA-Fc (растворимый человеческий BCMA, слитый на своем С-конце с Fc-областью IgG). В некоторых аспектах первичные клетки от субъекта используют для конструирования с BCMA-специфическим CAR в соответствии со способами и применениями, представленными в настоящей заявке, если образец от субъекта содержит низкие уровни, например, ниже нижнего предела обнаружения (LLOD) предшествующего рекомбинантного рецептора, как определено методом проточной цитометрии с использованием BCMA-Fc.

d. Другие предшествующие терапии и истории

[0144] В некоторых аспектах субъект, подлежащий лечению в соответствии с представленными способами и применениями, представляет собой субъекта, который имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих терапий. В

некоторых аспектах предшествующие терапии включают лечение при помощи аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT); иммуномодулирующего средства; ингибитора протеасом; и анти-CD38 антитела; кроме случаев, когда субъект не был кандидатом или имел противопоказания к одной или более из терапий. В некоторых аспектах субъект имел рецидив или был невосприимчив к трем или более из предшествующих терапий, включая лечение с применением трех или более терапий, выбранных из (1) аутологичной трансплантации стволовых клеток, (2) ингибитора протеасом и иммуномодулирующего средства, либо отдельно, либо в комбинации, и (3) анти-CD38 моноклонального антитела, как части комбинированной терапии или монотерапии; кроме случаев, когда субъект не являлся кандидатом или имел противопоказания к одной или более терапий. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство выбрано из талидомида, леналидомида или помалидомида. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба или иксазомиба. В некоторых вариантах осуществления анти-CD38 антитело представляет собой или включает даратумумаб. В некоторых вариантах осуществления субъект должен пройти по меньшей мере 2 последовательных цикла лечения по каждой схеме, если только прогрессирующее заболевание не было лучшим ответом на схему.

[0145] В некоторых аспектах субъект может быть подвергнут скринингу на уровень растворимого BCMA (sBCMA), например, из биологического образца субъекта, такого как кровь или сыворотка. В некоторых аспектах субъект может быть подвергнут скринингу на уровень sBCMA до начала лечения клеточной терапией. В некоторых аспектах способы включают скрининг или детекцию уровня или количества sBCMA у субъекта, имеющего заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA, например опухоль или рак, такой как множественная миелома. В некоторых аспектах образец может быть получен от пациента с подозрением на заболевание или расстройство, связанное с BCMA, и проанализирован на уровень или количество sBCMA, например, с использованием анализа для определения уровня растворимого белка, такого как иммуноферментный анализ (ELISA). В некоторых аспектах у субъектов с множественной миеломой (MM) уровни sBCMA могут коррелировать с долей плазматических клеток в биопсии костного мозга. В некоторых аспектах у субъектов с множественной миеломой (MM) уровни sBCMA могут коррелировать со снижением ответа на лечение или сокращением общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования (см., например, Ghermezi et al., Haematologica 2017, 102(4): 785-795). В некоторых аспектах субъект, демонстрирующий низкий уровень sBCMA, может быть выбран для лечения способами по настоящему изобретению и может получать терапевтически эффективное количество сконструированных клеток, включающих рекомбинантный рецептор (например, CAR), связывающийся с BCMA, или содержащую их фармацевтическую композицию, как описано в настоящей заявке. В некоторых аспектах субъект с высоким уровнем sBCMA может быть выбран для лечения способами по настоящему изобретению и может получать терапевтически эффективное

количество сконструированных клеток, включающих рекомбинантный рецептор (например, CAR), связывающийся с BCMA, или содержащую их фармацевтическую композицию, как описано в настоящей заявке, где антиген-связывающий домен CAR имеет низкое сродство к связыванию растворимого BCMA. В некоторых вариантах осуществления способность антигенсвязывающего домена CAR связывать BCMA клеточной поверхности не снижается или существенно не снижается в присутствии sBCMA.

[0146] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет персистирующее или рецидивирующее заболевание, например, после лечения другим BCMA-специфическим антителом и/или клетками, экспрессирующими BCMA-нацеленный химерный рецептор, и/или другой терапии, включая химиотерапию, облучение и/или трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), например аллогенную HSCT или аутологичную HSCT. В некоторых вариантах осуществления введение эффективно лечит субъекта, несмотря на то, что субъект стал устойчив к другой BCMA-нацеленной терапии. В некоторых вариантах осуществления у субъекта нет рецидива, но установлено, что он находится в группе риска рецидива, например, в группе высокого риска рецидива, и поэтому соединение или композицию вводят профилактически, например, для снижения вероятности рецидива или его предотвращения.

[0147] В некоторых вариантах осуществления субъект является подходящим для трансплантации, например трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), например, аллогенной HSCT или аутологичной HSCT. В некоторых таких вариантах осуществления субъект ранее не получал трансплантацию, несмотря на свою пригодность, до введения сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (например, CAR), множества сконструированных клеток, экспрессирующих рецепторы, и/или композиций, включающих их, как предусмотрено в настоящей заявке.

[0148] В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом, не подходящим для трансплантации, например, не подходящим для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), например, аллогенной HSCT или аутологичной HSCT. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекту вводят сконструированные клетки, экспрессирующие BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (например, CAR), множество сконструированных клеток, экспрессирующих рецепторы, и/или композиции, включающие их, в соответствии с представленными вариантами осуществления изобретения.

[0149] В некоторых вариантах осуществления способ может включать или исключать конкретных субъектов для терапии с использованием представленных анти-BCMA антител, рекомбинантных рецепторов и/или клеток, включающих такие рецепторы, на основании конкретных критериев, диагноза или показаний. В некоторых вариантах осуществления во время введения дозы клеток или предшествующей лимфодеплеционной химиотерапии у субъекта не было активного, или в анамнезе, лейкоза плазматических

клеток (PCL). В некоторых вариантах осуществления изобретения, если субъект на момент введения имел активный PCL или PCL в анамнезе, субъект может быть исключен из лечения в соответствии с представленными способами. В некоторых вариантах осуществления, если у субъекта развивается PCL, например, вторичный PCL, во время введения, субъект может быть исключен из лечения в соответствии с представленными способами. В некоторых вариантах осуществления оценку критериев, диагноза или показаний можно осуществить во время скрининга субъектов на соответствие или пригодность для лечения в соответствии с предлагаемыми способами, на различных этапах схемы лечения, во время получения лимфодеплеционной терапии и/или во время или непосредственно перед началом введения сконструированных клеток или их композиции.

3. Введение сконструированных клеток

[0150] В некоторых вариантах осуществления способы включают адоптивную клеточную терапию, при которой субъектам вводят сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы (например, CAR), связывающие BCMA. Такое введение может способствовать активации клеток (например, активации Т-клеток) BCMA-таргетирующим образом, так что клетки заболевания или расстройства становятся мишенью для уничтожения.

[0151] Таким образом, представленные способы и применения включают способы и применения для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение клеток или композиции, содержащей клетки, субъекту, например, имеющему, имеющему риск или у которого подозревается заболевание, состояние или расстройство. В некоторых вариантах осуществления клетки, популяции и композиции вводят субъекту, имеющему конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, например, посредством адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления клетки или композиции вводят субъекту, например, субъекту, имеющему заболевание или состояние или подверженному риску его развития. В некоторых аспектах способы таким образом лечат, например, облегчают, один или несколько симптомов заболевания или состояния, например, уменьшая опухолевую нагрузку при раке, экспрессирующем BCMA.

[0152] Методы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны, и их можно использовать в связи с представленными способами и композициями. Например, методы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, *например*, в публикации патентной заявки США № 2003/0170238, Gruenberg et al; патенте США № 4690915, 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.

[0153] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например адоптивную клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию осуществляют путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из

образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают от субъекта, например, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

[0154] В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например адоптивную клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию осуществляют путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или в конечном итоге получает клеточную терапию, например первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту, того же вида. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически схожи. В некоторых вариантах осуществления второй субъект экспрессирует тот же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

[0155] В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки, клеточные популяции или композиции, является приматом, например человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки, клеточные популяции или композиции, является отличным от человека приматом (NHP). В некоторых вариантах осуществления отличный от человека примат представляет собой обезьяну (например, обезьяну cynomolgus) или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, подростков, молодых людей, взрослых и гериатрических субъектов. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, не относящимся к приматам, таким как грызун (например, мышь, крыса и т.д.). В некоторых примерах пациент или субъект представляет собой валидированную животную модель для заболевания, адоптивной клеточной терапии и/или для оценки токсических явлений, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS).

[0156] Сконструированные клетки, экспрессирующие BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (например, CAR), множество сконструированных клеток, экспрессирующих рецепторы, и/или композиции, включающие их, можно вводить любым подходящим способом, например, путем инъекции, например внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транссептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахороидальной инъекции, интракамеральной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или задней юкстасклеральной доставки. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентерально, интрапульмонально, интраназально и, если желательно для местного лечения, внутрь пораженных тканей. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, интраартериальное, интраперитонеальное, интракраниальное, внутригрудное или подкожное введение. Дозировка и введение могут частично зависеть от того, является ли введение кратковременным или долговременным.

Различные схемы введения включают, но не ограничиваются этим, однократное или многократное введение в различные временные точки, болюсное введение и импульсную инфузию.

[0157] Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза сконструированных клеток или композиций, включающих их, может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа сконструированных клеток или композиций, включающих их, тяжести и течения заболевания, от того, вводятся ли сконструированные клетки или композиции, включающие их, в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и ответа на рекомбинантный рецептор или клетку, а также от усмотрения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции, молекулы и клетки можно вводить пациенту за один раз или в течение нескольких курсов лечения.

[0158] В некоторых вариантах осуществления лечение не вызывает иммунного ответа у субъекта, принимающего терапию, и/или не вызывает такого ответа в такой степени, которая препятствует эффективному лечению заболевания или состояния. В некоторых аспектах степень иммуногенности и/или реакции "трансплантат против хозяина" меньше, чем та, которая наблюдается при другом, но сопоставимом лечении. Например, в случае адоптивной клеточной терапии с использованием клеток, экспрессирующих CAR, включающие представленные анти-BCMA антитела, степень иммуногенности в некоторых вариантах осуществления снижается по сравнению с CAR, включающими другое антитело, связывающееся с аналогичным, например, перекрывающимся эпитопом и/или конкурирующее за связывание с BCMA с антителом, таким как мышиное, обезьянье, кроличье или гуманизированное антитело.

[0159] В некоторых вариантах осуществления, в контексте генетически сконструированных клеток, содержащих рекомбинантные рецепторы, субъекту осуществляют введение в диапазоне от при или около 0,1 миллиона до при или около 100 миллиардов клеток, и/или при таком количестве клеток, которое определено в расчете на килограмм массы тела субъекта, *например*, от 0,1 миллиона до при или около 50 миллиардов клеток (*например*, при или около 5 миллионов клеток, при или около 25 миллионов клеток, при или около 500 миллионов клеток, при или около 1 миллиардов клеток, при или около 5 миллиардов клеток, при или около 20 миллиардов клеток, при или около 30 миллиардов клеток, при или около 40 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений), от 1 миллиона до при или около 50 миллиардов клеток (*например*, при или около 5 миллионов клеток, при или около 25 миллионов клеток, при или около 500 миллионов клеток, при или около 1 миллиардов клеток, при или около 5 миллиардов клеток, при или около 20 миллиардов клеток, при или около 30 миллиардов клеток, при или около 40 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений), таком как от при или около 10 миллионов до при или около 100 миллиардов клеток (*например*, при или около 20 миллионов клеток, при или около 25 миллионов клеток, при или около 30 миллионов

клеток, при или около 40 миллионов клеток, при или около 50 миллионов клеток, при или около 60 миллионов клеток, при или около 70 миллионов клеток, при или около 80 миллионов клеток, при или около 90 миллионов клеток, при или около 10 миллиардов клеток, при или около 25 миллиардов клеток, при или около 50 миллиардов клеток, при или около 75 миллиардов клеток, при или около 90 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений), и в некоторых случаях от при или около 100 миллионов клеток до при или около 50 миллиардов клеток (*например*, при или около 120 миллионов клеток, при или около 150 миллионов клеток, при или около 250 миллионов клеток, при или около 300 миллионов клеток, при или около 350 миллионов клеток, при или около 450 миллионов клеток, при или около 600 миллионов клеток, при или около 650 миллионов клеток, при или около 800 миллионов клеток, при или около 900 миллионов клеток, при или около 1,2 миллиарда клеток, при или около 3 миллиарда клеток, при или около 30 миллиардов клеток, при или около 45 миллиардов клеток), или при любом промежуточном значении в этих пределах, и/или при значении, определенном в расчете на килограмм массы тела субъекта. Также, дозировки могут варьироваться в зависимости от признаков, характерных для заболевания или расстройства, и/или пациента, и/или других лечений.

[0160] В некоторых вариантах осуществления способы включают введение дозы сконструированных клеток или композиции, включающей дозу сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или композиции, содержащие сконструированные клетки, можно использовать в схеме лечения, где схема лечения включает введение дозы сконструированных клеток или композиции, включающей дозу сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления доза может содержать, например, определенное количество или диапазон экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, общее количество Т-клеток или общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, любое количество таких клеток, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления можно вводить композицию, содержащую дозу клеток. В некоторых аспектах число, количество или долю CAR-экспрессирующих (CAR+) клеток в популяции клеток или композиции клеток можно оценить путем детекции суррогатного маркера, например, с использованием проточной цитометрии или других средств, или путем детекции связывания меченой молекулы, например, меченого антигена, который может специфически связываться с рецепторами, описанными в настоящей заявке.

[0161] В соответствии с представленными способами вводимые клетки представляют собой иммунные клетки, сконструированные для экспрессии BCMA-связывающего (анти-BCMA) рекомбинантного рецептора, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления the иммунные клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления вводимые клетки представляют собой CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления вводимые клетки представляют собой CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления вводимые клетки представляют собой комбинацию

CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, такую как комбинация CD4+ CAR Т-клеток и CD8+ CAR Т-клеток, которые в некоторых аспектах находятся в том же сосуде или клеточной композиции или суспензии. В некоторых примерах соотношение вводимых CD4+ клеток и CD8+ клеток (CD4:CD8), например, в суспензии или композиции или сосуде, составляет 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение находится между 1:3 и 3:1 или находится в пределах на уровне или около 1:4 - на уровне или около 4:1, или в пределах от или от около 1:3 до или до около 3:1, или от или от около 1:2 до или до около 2:1, или любые такие соотношения, в пределах допустимой погрешности. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет от или от около 1:3 до или до около 3:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет от или от около 1:2 до или до около 2:1. В некоторых аспектах, среди субъектов, принимающих терапию, и/или среди субъектов, у которых берут образцы и обрабатывают для получения клеточных композиций, соотношение CD4+ CAR-T клеток и CD8+ CAR-T клеток или соотношение CD4+ и CD8+ клеток находится в желательном диапазоне, например от или от около 1:4 до или до около 4:1, или от или от около 1:3 до или до около 3:1, или от или от около 1:2 до или до около 2:1, или в пределах такого желательного соотношения для данного процента таких субъектов, например для по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% таких субъектов.

[0162] В некоторых вариантах осуществления например, где субъект представляет собой человека, доза включает более чем или около 1×10^6 общего количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и менее чем или около 2×10^9 общего количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, находится в диапазоне от или от около $1,0\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ таких клеток, таком как на уровне или около $1,0\times10^7$, $1,5\times10^7$, $2,0\times10^7$, $2,5\times10^7$, 5×10^7, $1,5\times10^8$, 3×10^8, $4,5\times10^8$, 6×10^8, 8×10^8 или $1,2\times10^9$ общего количества таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, например где субъект представляет собой человека, доза включает более чем или около 1×10^6 общего количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и менее чем или около 2×10^9 общего количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), например, находится в диапазоне от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ таких клеток, например, на уровне или около $2,5\times10^7$, 5×10^7, $1,5\times10^8$, 3×10^8, $4,5\times10^8$, 6×10^8, 8×10^8 или $1,2\times10^9$ общего количества таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при 5×10^7

общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при $1,5\times10^8$ общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при 3×10^8 общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при $4,5\times10^8$ общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при 6×10^8 общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при 8×10^8 общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, например, где субъект представляет собой человека, доза включает клетки при или примерно при $1,2\times10^9$ общем количестве клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

[0163] В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток включает клетки в диапазоне от или от около 1×10^5 до или до около 2×10^9 общего количества CAR-экспрессирующих (CAR+) Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около 5×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около $2,5\times10^7$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около 1×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около 5×10^6 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около $2,5\times10^6$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^5 до или до около 1×10^6 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около 5×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около $2,5\times10^7$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около 1×10^7 общего количества

CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около 5×10^6 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^6 до или до около $2,5\times10^6$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около 5×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около $2,5\times10^7$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около 1×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^6$ до или до около 5×10^6 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^6 до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^6 до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^6 до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^6 до или до около 5×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^6 до или до около $2,5\times10^7$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^6 до или до около 1×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^7 до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^7 до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^7 до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^7 до или до около 5×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^7 до или до около $2,5\times10^7$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^7$ до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^7$ до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^7$ до или до около 5×10^7 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^7 до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^7 до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 5×10^7 до или до около 1×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^8 до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около 1×10^8 до или до около $2,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около или $2,5\times10^8$ до или до около 5×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток включает от или от около $1,0\times10^7$ до или до около 8×10^8 общего количества CAR+ (CAR+) Т-клеток, от или от около $1,0\times10^7$ до или до около $6,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $1,5\times10^7$ до или до около $6,5\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $1,5\times10^7$ до или до около 6.0×10^8 общего количества CAR+ Т-клеток, от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $6,0\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток, или от или от около $5,0\times10^7$ до или до около $6,0\times10^8$ общего количества CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток включает от или от около $0,5\times10^8$ до или до около 8×10^8 общего количества CAR+ (CAR+) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток включает от или от около $1,5\times10^8$ до или до около $4,5\times10^8$ общего количества CAR+ (CAR+) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток включает от или от

около $1,5\times10^8$ до или до около $5,4\times10^8$ общего количества CAR+ (CAR+) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 5×10^7 общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,0\times10^7$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,5\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 3×10^8 общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $3,5\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $4,0\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $4,5\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $5,0\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $5,4\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $5,5\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 6×10^8 общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $6,5\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $7,0\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $7,5\times10^8$ общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 8×10^8 общего количества CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,2\times10^9$ общего количества CAR+ клеток.

[0164] В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток находится в пределах от или от около $2,5\times10^7$ CAR+ (CAR+) Т-клеток, общего количества Т-клеток или общего количества мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) до или до около $1,2\times10^9$ CAR+ Т-клеток, общего количества Т-клеток или общего количества клеток PBMC, в пределах от или от около $5,0\times10^7$ CAR+ Т-клеток, общего количества Т-клеток или общего количества мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) до или до около $6,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток, общего количества Т-клеток или общего количества клеток PBMC, в пределах от или от около $5,0\times10^7$ CAR+ Т-клеток до или до около $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток, общего количества Т-клеток или общего количества мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), в пределах от или от около $1,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток до или до около $3,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток, общего количества Т-клеток или общего количества клеток PBMC, при этом каждый диапазон является инклюзивным. В некоторых вариантах осуществления количество относится к общему количеству CD3+ или CD8+, в некоторых случаях также CAR+ (например, CAR+) клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает количество клеток от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ CD3+ или CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ или CD8+ CAR+ клеток, от или от около $5,0\times10^7$ до или до около $6,0\times10^8$ CD3+ или CD8+

общего количества Т-клеток или CD3+ или CD8+ CAR+ клеток, от или от около $5,0\times10^7$ до или до около $4,5\times10^8$ CD3+ или CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ или CD8+ CAR+ клеток, или от или от около $1,5\times10^8$ до или до около $3,0\times10^8$ CD3+ или CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ или CD8+CAR+ клеток, при этом каждый диапазон является инклюзивным.

[0165] В некоторых вариантах осуществления доза генетически сконструированных клеток указана в расчете на общее количество CD3+ CAR+ (CAR+) или CD4+/CD8+ CAR+ (CAR+) клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает количество генетически сконструированных клеток от или от около $1,0\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток, от или от около $1,5\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток, от или от около $2,0\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток, от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток, от или от около $5,0\times10^7$ до или до около $6,0\times10^8$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток, от или от около $5,0\times10^7$ до или до около $4,5\times10^8$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток, или от или от около $1,5\times10^8$ до или до около $3,0\times10^8$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+CAR+ клеток, при этом каждый диапазон является инклюзивным. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около $1,0\times10^7$, $1,5\times10^7$, $2,0\times10^7$, $2,5\times10^7$, 5×10^7, $1,5\times10^8$, 3×10^8, $4,5\times10^8$, 6×10^8, 8×10^8 или $1,2\times10^9$ CD3+ или CD4+/CD8+ общего количества Т-клеток или CD3+ CAR+ или CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около $2,5\times10^7$, 5×10^7, $1,5\times10^8$, 3×10^8, $4,5\times10^8$, 6×10^8, 8×10^8 или $1,2\times10^9$ CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около $1,0\times10^7$, $1,5\times10^7$, $2,0\times10^7$, $2,5\times10^7$, 5×10^7, $1,5\times10^8$, 3×10^8, $4,5\times10^8$, 6×10^8, 8×10^8 или $1,2\times10^9$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около 5×10^7 CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза доза включает клетки при или при около $1,5\times10^8$ CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около 3×10^8 CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около $4,5\times10^8$ CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около 6×10^8 CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около $6,5\times10^8$ CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около 8×10^8 CD3+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза включает клетки при или при около $1,2\times10^9$ CD3+ CAR+ клеток.

[0166] В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около

$1,0\times10^7$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,5\times10^7$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $2,0\times10^7$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $2,5\times10^7$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 5×10^7 CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,5\times10^8$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 3×10^8 CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $4,5\times10^8$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 6×10^8 CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 8×10^8 CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,2\times10^9$ CD4+/CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $2,5\times10^7$ CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 5×10^7 CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,5\times10^8$ CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 3×10^8 CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $4,5\times10^8$ CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 6×10^8 CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $6,5\times10^8$ CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около 8×10^8 CD4+ или CD8+ CAR+ клеток. В некоторых вариантах осуществления доза находится на уровне или около $1,2\times10^9$ CD4+ или CD8+ CAR+ клеток.

[0167] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки дозы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки.

[0168] В некоторых вариантах осуществления например, где субъектом является человек, общее количество CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток дозы включает общее количество CAR-экспрессирующих CD4+ клеток и CAR-экспрессирующих CD8+ клеток в пределах от или от около 1×10^6 до или до около 2×10^9, например, в пределах от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ таких клеток, например в пределах от или от около 5×10^7 до или до около $4,5\times10^8$ таких клеток; например, находится на уровне или около $1,0\times10^7$, на уровне или около $2,5\times10^7$, на уровне или около $2,0\times10^7$, на уровне или около $2,5\times10^7$, на уровне или около 5×10^7, на уровне или около $1,5\times10^8$, на уровне или около 3×10^8, на уровне или около $4,5\times10^8$, на уровне или около 6×10^8, на уровне или около $6,5\times10^8$, на уровне или около 8×10^8 или на уровне или около $1,2\times10^9$ общего количества таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления например, где субъектом является человек, CD8+ Т-клетки дозы, в том числе в дозе, включающей CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, включают от или от около

1×10^6 до или до около 2×10^9 общего количества CD8+клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR), например в пределах от или от около $2,5\times10^7$ до или до около $1,2\times10^9$ таких клеток, например в пределах от или от около 5×10^7 до или до около $4,5\times10^8$ таких клеток; например, общее количество таких клеток находится на уровне или около $2,5\times10^7$, на уровне или около 5×10^7, на уровне или около $1,5\times10^8$, на уровне или около 3×10^8, на уровне или около $4,5\times10^8$, на уровне или около 6×10^8, на уровне или около 8×10^8 или на уровне или около $1,2\times10^9$, или в диапазоне между любыми двумя из вышеперечисленных значений.

[0169] В некоторых вариантах осуществления дозу клеток, например экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят субъекту в виде однократной дозы или вводят только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления изобретения сконструированные клетки для введения или композиции сконструированных клеток для введения проявляют свойства, указывающие на здоровье клеток или соответствуют ему. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85% или 90% CAR+ клеток такой дозы демонстрируют одно или более свойств или фенотипов, указывающих на здоровье клетки или биологически активной CAR клетки, например, отсутствие экспрессии маркера апоптоза.

[0170] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает отсутствие апоптоза и/или признака того, что клетка находится в процессе апоптоза. Апоптоз представляет собой процесс запрограммированной гибели клеток, который включает ряд стереотипных морфологических и биохимических событий, приводящих к характерным изменениям и гибели клеток, включая блеббинг, сморщивание клеток, фрагментацию ядер, конденсацию хроматина, фрагментацию хромосомной ДНК и глобальный распад мРНК. В некоторых аспектах ранние стадии апоптоза могут характеризоваться активацией определенных каспаз, например, 2, 8, 9 и 10. В некоторых аспектах средняя и поздняя стадии апоптоза характеризуются дальнейшей потерей целостности мембраны, конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК, включают биохимические события, такие как активация каспаз 3, 6 и 7.

[0171] В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой отрицательную экспрессию одного или более факторов, связанных с запрограммированной клеточной гибелью, например про-апоптотических факторов, известных для инициации апоптоза, например, членов пути рецепторов гибели, активированных членов митохондриального (внутреннего) пути, таких как члены семейства Bcl-2, например, Bax, Bad и Bid, и каспаз. В некоторых вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие индикатора, например, молекулы Аннексина V или при окрашивании TUNEL, который будет преимущественно связываться с клетками, подвергающимися апоптозу, при инкубации с клеточной композицией или контакте с ней. В некоторых вариантах

осуществления фенотип представляет собой или включает экспрессию одного или более маркеров, которые указывают на апоптотическое состояние клетки. В некоторых вариантах осуществления фенотип представляет собой отсутствие экспрессии и/или активации каспазы, такой как каспаза 3. В некоторых аспектах активация каспазы-3 свидетельствует об усилении или возрождении апоптоза. В некоторых вариантах реализации активация каспазы может быть обнаружена известными методами. В некоторых вариантах осуществления для обнаружения активации каспазы можно использовать антитело, которое специфически связывается с активированной каспазой (т.е. специфически связывается с расщепленным полипептидом). В конкретных вариантах осуществления фенотип представляет собой или включает активную каспазу 3-. В некоторых вариантах реализации маркер апоптоза представляет собой реагент, который обнаруживает в клетке признак, связанный с апоптозом. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой молекулу аннексина V.

[0172] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие сконструированные клетки для введения, содержат некоторое число или количество клеток, которые демонстрируют фенотипы характеризующие или указывающие на здоровье клеток. В некоторых из любых вариантов осуществления, менее чем примерно 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% of the CAR+ Т-клеток в дозе сконструированных Т-клеток экспрессируют маркер апоптоза, необязательно Аннексин V или активную Каспазу 3. В некоторых из любых вариантов осуществления менее чем 5%, 4%, 3%, 2% или 1% CAR+ Т-клеток в дозе сконструированных Т-клеток экспрессируют Аннексин V или активную Каспазу 3.

[0173] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или включающие их композиции вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как другое антитело, или сконструированная клетка, или рецептор, или агент, например цитотоксическое или терапевтическое средство.

[0174] Сконструированные клетки или включающие их композиции, в некоторых вариантах осуществления, вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или в связи с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых контекстах клетки вводят совместно с другой терапией достаточно близко по времени, чтобы популяции клеток усиливали эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или включающие их композиции вводят до введения одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или включающие их композиции вводят после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

[0175] В некоторых вариантах осуществления субъект может получать переходную терапию после лейкафереза и перед лимфодренирующей химиотерапией. Лечащий врач

может определить, необходима ли переходная терапия, например, для контроля заболевания, во время изготовления представленной композиции или клеток. В некоторых вариантах осуществления переходная терапия не включает биологические агенты, такие как антитела (например, даратумумаб). В некоторых вариантах осуществления изобретения переходная терапия прекращается до начала лимфодеплеции. В некоторых вариантах осуществления изобретения переходная терапия прекращается за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней, 45 дней или 60 дней до лимфодеплеции.

[0176] После введения клеток млекопитающему (например, человеку) биологическую активность популяций сконструированных клеток и/или антител в некоторых аспектах измеряют любым из ряда известных методов. Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном, in vivo, например, определяемое методами визуализации, или ex vivo, например, с использованием метода ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления способность сконструированных клеток уничтожать клетки-мишени может быть измерена любым подходящим методом, известным в данной области, таким как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), и Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток также можно измерить с использованием анализа экспрессии и/или секреции определенных цитокинов, таких как CD 107a, IFNγ, IL-2 и TNF. В некоторых аспектах биологическая активность измеряется путем оценки клинических результатов, таких как уменьшение опухолевого бремени или нагрузки

[0177] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки модифицируют любыми способами, чтобы повысить их терапевтическую или профилактическую эффективность. Например, сконструированные CAR или TCR, экспрессируемые популяцией, в некоторых вариантах осуществления конъюгируют непосредственно или опосредованно через линкер с нацеливающим фрагментом. Методы конъюгирования соединений, *например,* CAR или TCR, с нацеливающими фрагментами известны в данной области техники. См., например, Wadwa *et al.*, *J. Drug Targeting,* 3(2):111 (1995) и патент США № 5087616, включенные посредством ссылки во всей полноте.

4. Результаты лечения

[0178] В некоторых вариантах осуществления дозу и/или частоту введения определяют на основании результата терапии, такого как эффективность, ответ и/или безопасность, например отсутствие или уменьшение неблагоприятных событий, таких как токсичност, включая CRS, NT и/или MAS.

a. Ответ

[0179] В некоторых вариантах осуществления эффективность определяют путем оценки статуса заболевания. Иллюстративные методы оценки состояния заболевания включают: измерение белка М в биологических жидкостях, таких как кровь и/или моча, методом электрофореза и иммунофиксации; количественное определение sFLC (κ и λ) в

крови; обследование скелета; визуализацию методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ)/компьютерной томографии (КТ) у субъектов с экстрамедуллярным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления статус заболевания может быть оценен путем исследования костного мозга. В некоторых примерах дозу и/или частоту введения определяют по экспансии и персистенции рекомбинантного рецептора или клетки в крови и/или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления дозу и/или частоту введения определяют на основе противоопухолевой активности рекомбинантного рецептора или сконструированной клетки. В некоторых вариантах осуществления противоопухолевую активность определяют на основании общей частоты ответа (ORR) и/или Единых критериев ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) (см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346). В некоторых вариантах осуществления ответ оценивают путем оценки минимальной остаточной болезни (MRD). В некоторых вариантах осуществления MRD может быть оценена такими методами, как проточная цитометрия и высокопроизводительное секвенирование, например, глубокое секвенирование. В некоторых аспектах субъекты с MRD-отрицательным заболеванием включают субъектов с отсутствием аберрантных клональных плазматических клеток в аспирате костного мозга, исключаемых анализом с минимальной чувствительностью 1 на 10^5 ядросодержащих клеток или выше (т.е. чувствительность 10^{-5}), таким как проточная цитометрия (проточная цитометрия следующего поколения; NGF) или высокопроизводительное секвенирование, например, глубокое секвенирование или секвенирование следующего поколения (NGS).

[0180] В некоторых аспектах устойчивые MRD-отрицательные включают субъектов, которые демонстрируют MRD-отрицательность в костном мозге (NGF или NGS, или оба) и при визуализации, как определено ниже, подтвержденную с разницей минимум в 1 год. Последующие оценки могут быть использованы для дальнейшего уточнения продолжительности отрицательного результата (например, MRD-отрицательный в течение 5 лет). В некоторых аспектах MRD-отрицательные на основании проточного метода включают субъектов, которые демонстрируют отсутствие фенотипически аберрантных клональных плазматических клеток по данным NGF на аспиратах костного мозга при использовании стандартной операционной процедуры EuroFlow для обнаружения MRD при множественной миеломе (или проверенного эквивалентного метода) с минимальной чувствительностью 1 на 10^5 ядросодержащих клеток или выше. В некоторых аспектах определенные методом секвенирования MRD-отрицательные включают субъектов, которые демонстрируют отсутствие клональных плазматических клеток по данным NGS в аспирате костного мозга, где наличие клона определяется как менее двух идентичных чтений секвенирования, полученных после секвенирования ДНК аспирата костного мозга с использованием платформы LymphoSIGHT (или проверенного эквивалентного метода) с минимальной чувствительностью 1 на 10^5 ядросодержащих клеток или выше. В некоторых аспектах визуализация плюс MRD-отрицательные включают субъектов, которые демонстрируют MRD-отрицательность по результатам NGF или NGS плюс исчезновение каждой области повышенного поглощения меченого вещества, обнаруженной на исходном

уровне или предшествующей ПЭТ/КТ, или уменьшение до уровня менее SUV медиастинального пула крови, или уменьшение до уровня менее, чем в окружающей нормальной ткани (см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346).

[0181] В некоторых вариантах осуществления ответ оценивается на основе продолжительности ответа после введения рекомбинантного рецептора или клеток. В некоторых примерах доза и/или частота введения может быть основана на токсичности. В некоторых вариантах осуществления доза и/или частота могут быть определены на основе качества жизни, связанного со здоровьем (HRQoL) субъекта, которому вводится рекомбинантный рецептор и/или клетки. В некоторых вариантах осуществления доза и/или частота введения могут быть изменены, т.е. увеличены или уменьшены, на основании любого из вышеуказанных критериев.

[0182] В некоторых аспектах оценивается выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, наличие или продолжительность выживаемости без событий или симптомов, или выживаемость без рецидивов. В некоторых вариантах осуществления оценивается любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления определяется показатель опухолевой нагрузки. В некоторых вариантах осуществления примеры параметров для определения включают конкретные клинические результаты, свидетельствующие об облегчении или положительной динамике опухоли. Такие параметры включают: продолжительность контроля заболевания, включая объективный ответ (OR), полный ответ (CR), строгий полный ответ (sCR), очень хороший частичный ответ (VGPR), частичный ответ (PR), минимальный ответ (MR), стабильное заболевание (SD), прогрессирующее заболевание (PD) или рецидив (см., например, International Myeloma Working Group (IMWG) Uniform Response Criteria; см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346), частоту объективного ответа (ORR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и общую выживаемость (OS). В некоторых вариантах осуществления ответ оценивают с использованием оценки минимальной остаточной болезни (MRD). Конкретные пороговые значения параметров могут быть установлены для определения эффективности способов, представленных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство, подлежащее лечению, представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления измеримые критерии заболевания при множественной миеломе могут включать (1) сывороточный белок М 1 г/дл или выше; (2) белок М в моче 200 мг или выше/24 часа; (3) уровень свободных легких цепей (sFLC) в сыворотке крови 10 мг/дл или выше, с аномальным отношением κ к λ. В некоторых случаях болезнь легких цепей приемлема только для субъектов без измеримого заболевания в сыворотке или моче.

[0183] В некоторых аспектах ответ на терапию, например в соответствии с представленными вариантами осуществления, можно измерить в обозначенной точке времени после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления точка времени обозначена как, или около этого, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев

после начала введения, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления точка времени обозначена как 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 48 или 52 недели после начала введения, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления точка времени точка времени обозначена как, или около этого, 1 месяц после начала введения. В некоторых вариантах осуществления точка времени обозначена как, или около этого, 3 месяца после начала введения. В некоторых вариантах осуществления точка времени обозначена как, или около этого, 6 месяцев после начала введения. В некоторых вариантах осуществления точка времени обозначена как, или около этого, 9 месяцев после начала введения. В некоторых вариантах осуществления точка времени обозначена как, или около этого, 12 месяцев после начала введения.

[0184] В некоторых вариантах осуществления ответ или результат, определенный через или примерно через 3, 6, 9 или 12 месяцев после обозначенной точки времени, равен или улучшен по сравнению с ответом или результатом, определенным в первоначальной обозначенной временной точке. Например, в некоторых аспектах, если ответ или результат, определенный в начальной обозначенной временной точке, представляет собой стабильное заболевание (SD), прогрессирующее заболевание (PD) или рецидив, субъект, получающий лечение в соответствии с представленными вариантами осуществления, может продемонстрировать равный или улучшенный ответ или результат (например, лучший ответ в соответствии с Едиными критериями ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG); см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346) в последующей временной точке, через или примерно через 3, 6, 9 или 12 месяцев после первоначальной обозначенной временной точки, который равен ответу или результату в первоначально обозначенной временной точке, или ответу или результату, который является объективным ответом (OR), полным ответом (CR), строгим полным ответом (sCR), очень хорошим частичным ответом (VGPR) или частичным ответом (PR). В некоторых аспектах субъекты, получающие лечение в соответствии с представленными вариантами осуществления, могут демонстрировать ответ или результат, который улучшается между двумя временными точками определения. В некоторых аспектах субъект может демонстрировать PR или VGPR в начальной обозначенной временной точке для оценки, например, через 4 недели после начала введения, а затем демонстрировать улучшенный ответ, такой как CR или sCR, в более поздней временной точке, например, через 12 недель после начала введения. В некоторых аспектах выживаемость без прогрессирования (PFS) описывается как продолжительность времени в ходе и после лечения заболевания, например, рака, в течение которого субъект живет с заболеванием, но оно не ухудшается. В некоторых аспектах объективный ответ (OR) описывается как измеримый ответ. В некоторых аспектах объективная частота ответа (ORR; также известная в некоторых случаях как общая частота ответа) описывается как доля пациентов, достигших CR или PR. В некоторых аспектах общая выживаемость (OB) описывается как продолжительность времени с даты постановки диагноза или начала лечения заболевания, например, рака, в течение которого субъекты, у

которых диагностировано заболевание, остаются живыми. В некоторых аспектах выживаемость без событий (EFS) описывается как продолжительность времени после окончания лечения рака, в течение которого субъект не имеет определенных осложнений или событий, которые предполагалось предотвратить или отсрочить лечением. Эти события могут включать возвращение рака или появление определенных симптомов, таких как боль в костях от рака, распространившегося на кости, или смерть.

[0185] В некоторых вариантах осуществления показатель длительности ответа (ДОР) включает время от документального подтверждения ответа опухоли до прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления параметр для оценки ответа может включать стойкий ответ, например, ответ, сохраняющийся после определенного периода времени от начала терапии. В некоторых вариантах осуществления о стойком ответе свидетельствует уровень ответа 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 или результат является стойким в течение более чем 3, 6, 9 или 12 месяцев или около этого.

[0186] В некоторых вариантах осуществления показатель статуса эффективности Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) может быть использован для оценки или отбора субъектов для лечения, например, субъектов, которые имели плохие результаты от предшествующей терапии (см., например, Oken et al. (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655). Шкала ECOG Performance Status описывает уровень функционирования пациента с точки зрения его способности ухаживать за собой, повседневной активности и физической способности (например, ходить, работать и т.д.). В некоторых вариантах осуществления статус эффективности ECOG, равный 0, указывает на то, что субъект может выполнять обычную деятельность. В некоторых аспектах субъекты со статусом эффективности ECOG 1 демонстрируют некоторые ограничения в физической активности, но субъект полностью амбулаторный. В некоторых аспектах пациенты со статусом эффективности ECOG, равным 2, более чем на 50% амбулаторны. В некоторых случаях субъект с показателем ECOG, равным 2, также может быть способен к самообслуживанию; см., например, Sørensen et al., (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению в соответствии со способами или схемами лечения, представленными в настоящей заявке, включают субъектов со статусом эффективности по ECOG 0 или 1.

[0187] В некоторых вариантах осуществления введение может лечить субъекта не смотря на то, что субъект стал резистентным к другой терапии. В некоторых вариантах осуществления при введении субъектам в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке, доза или композиция способна обеспечить достижение объективного ответа (OR) у по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% субъектов, которым она была введена. В некоторых вариантах осуществления OR включает субъектов, которые достигают строгого полного ответа (sCR), полного ответа (CR), очень хорошего

частичного ответа (VGPR), частичного ответа (PR) и минимального ответа (MR). В некоторых вариантах осуществления при введении субъектам в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке, доза или композиция способна обеспечить достижение строгого полного ответа (sCR), полного ответа (CR), очень хорошего частичного ответа (VGPR) или частичного ответа (PR) у по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 85% субъектов, которым она была введена. В некоторых вариантах осуществления при введении субъектам в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке, доза или композиция способна обеспечить достижение строгого полного ответа (sCR) или полного ответа (CR) по меньшей мере у 20%, 30%, 40% 50%, 60% или 70% субъектов, которым она была введена. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы включают около $1,0\times10^7$, $1,5\times10^7$, $2,0\times10^7$, $2,5\times10^7$, $5,0\times10^7$, $1,5\times10^8$, $3,0\times10^8$, $4,5\times10^8$, $6,0\times10^8$ или $8,0\times10^8$ CAR-экспрессирующих (CAR+) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы включают около $5,0\times10^7$, $1,5\times10^8$, $3,0\times10^8$, $4,5\times10^8$, $6,0\times10^8$ или $8,0\times10^8$ CAR-экспрессирующих (CAR+) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы включают около $5,0\times10^7$, $1,5\times10^8$, $3,0\times10^8$, $4,5\times10^8$, $6,0\times10^8$ или $8,0\times10^8$ CAR- CAR-экспрессирующих (CAR+) Т-клеток. В некоторых аспектах конкретный ответ на лечение, например, в соответствии со способпит, обеспечиваемыми настоящим изобретением, можно оценить на основании Единых критериев ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) (см. Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346).

[0188] В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы для достижения конкретных результатов, таких как OR и/или отсутствие токсичности или тяжелой токсичности, включают около $5,0\times10^7$ CAR-экспрессирующих (CAR+) Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы для достижения конкретных результатов, таких как OR и/или отсутствие токсичности или тяжелой токсичности, включают около $1,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы для достижения конкретных результатов, таких как OR и/или отсутствие токсичности или тяжелой токсичности, включают около $3,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы для достижения конкретных результатов, таких как OR и/или отсутствие токсичности или тяжелой токсичности, включают около $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дозы для достижения конкретных результатов, таких как OR и/или отсутствие токсичности или тяжелой токсичности, включают около $6,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток. В некоторых аспектах, иллюстративные дозы для достижения конкретных результатов, таких как OR и/или отсутствие токсичности или тяжелой токсичности, включают около $8,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток.

b. Безопасность

[0189] В некоторых вариантах осуществления токсичность, неблагоприятные события и/или побочные эффекты лечения можно отслеживать и использовать для оценки введения одного или нескольких дополнительных терапевтических средств (например,

рекомбинантного IL-1Ra) и/или для корректировки дозы и/или частоты введения дополнительного терапевтического средства; и/или для корректировки дозы и/или частоты введения рекомбинантного рецептора, например CAR, клеток и или композиций. Например, неблагоприятные события и отклонения лабораторных показателей можно отслеживать и использовать для корректировки дозы и/или частоты введения. Неблагоприятные события включают инфузионные реакции, синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность (NT), синдром активации макрофагов (MAS)/гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH) и синдром лизиса опухоли (TLS). Любое из этих событий может привести к дозолимитирующей токсичности и стать основанием для снижения дозы и/или прекращения лечения. Другие побочные эффекты или нежелательные явления, которые могут быть использованы в качестве руководства для установления дозы и/или частоты введения, включают негематологические нежелательные явления, которые включают, но не ограничиваются этим, усталость, лихорадку или фебрильную нейтропению, повышение уровня трансаминаз в течение определенного времени (например, менее или равного 2 неделям или менее или равного 7 дням), головную боль, боль в костях, гипотензию, гипоксию, озноб, диарею, тошноту/рвоту, нейротоксичность (например, спутанность сознания, афазия, судороги, конвульсии, летаргия и/или изменение психического статуса), диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, другие бессимптомные негематологические клинические лабораторные отклонения, такие как электролитные нарушения. Другие побочные эффекты или нежелательные явления, которые могут быть использованы как указания для установления дозы и/или частоты введения, включают гематологические нежелательные явления, которые включают, но не ограничиваются этим, нейтропению, лейкопению, тромбоцитопению, аплазию у животных и/или аплазию В-клеток и гипогаммаглобинемию.

[0190] В некоторых вариантах осуществления токсический результат у субъекта при введении терапевтического средства (например, CAR Т-клеток) моэно оценивать или контролировать. В некоторых вариантах осуществления токсический результат является или связан с наличием токсического события, такого как синдром высвобождения цитокинов (CRS), тяжелый CRS (sCRS), синдром активации макрофагов (MAS), синдром лизиса опухоли, лихорадка по меньшей мере около 38 градусов Цельсия в течение трех или более дней и уровень С-реактивного белка (CRP) в плазме по меньшей мере около 20 мг/дл, нейротоксичность (NT) и/или тяжелая нейротоксичность (sNT). В некоторых вариантах осуществления изобретения токсический результат представляет собой признак или симптом, конкретные признаки и симптомы и/или их количество или степень, наличие или отсутствие которых может указывать на конкретную степень, тяжесть или уровень токсичности у субъекта. Специалист в данной области может указать или определить конкретный признак, симптом и/или их количество или степень, которые связаны с нежелательным токсическим результатом терапевтического средства (например, CAR-T-клеток).

[0191] В некоторых аспектах токсический результат представляет собой, или

ассоциирован, 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); Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); и Kochenderfer et al., Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78.

[0192] Как правило, CRS вызывается преувеличенным системным иммунным ответом, опосредованным, например, Т-клетками, В-клетками, NK-клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут выделять большое количество медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут вызвать острую воспалительную реакцию и/или вызвать повреждение эндотелия органа, что может привести к микрососудистой утечке, сердечной недостаточности или смерти. Тяжелая, опасный для жизни CRS может привести к легочной инфильтрации и повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови. Другие тяжелые, угрожающие жизни токсические эффекты могут включать сердечную токсичность, дыхательную недостаточность, неврологическую токсичность и/или печеночную недостаточность. В некоторых аспектах лихорадка, особенно высокая температура (≥ 38,5°C или≥101,3°F), ассоциируется с CRS. В некоторых случаях признаки или симптомы CRS имитируют инфекцию. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция также рассматривается у субъектов с симптомами CRS, и может быть проведен мониторинг культур и назначена эмпирическая антибиотикотерапия. Другие симптомы, связанные с CRS, могут включать сердечную дисфункцию, респираторный дистресс-синдром взрослых, почечную и/или печеночную недостаточность, коагулопатии, диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию и синдром капиллярной утечки.

[0193] В контексте введения клеток, экспрессирующих CAR, CRS обычно возникает через 6-20 дней после инфузии клеток, экспрессирующих CAR. См. Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78. В некоторых случаях CRS возникает менее чем через 6 дней или более чем через 20 дней после инфузии CAR Т-клеток. Частота и сроки возникновения CRS могут быть связаны с исходным уровнем цитокинов или тяжестью опухоли на момент инфузии. Обычно CRS сопровождается повышением сывороточных уровней интерферона (IFN)-γ, фактора некроза опухоли (TNF)-α и/или интерлейкина (IL)-2. Другими цитокинами, которые могут быстро индуцироваться при CRS, являются IL-1β, IL-6, IL-8 и IL-10. Было описано, что CRS протекает более тяжело у пациентов с множественной миеломой с большим бременем болезни и ассоциируется с повышением уровня сывороточных цитокинов, включая IL-6, IFN-γ и другие цитокины, а также с повышением уровней маркеров воспаления, С-реактивного белка (CRP) и ферритина (Cohen et al., J Clin Invest. 2019:1-12.; Brudno et al., Blood 2016;127(26):3321 3330; Lee et al., Blood 2015;126(8):104; Davila et al., Sci Transl Med 2014;6(224):224ra225).

[0194] Типичные признаки или симптомы, связанные с CRS, включают лихорадку, ригидность, озноб, гипотензию, одышку, острый респираторный дистресс-синдром

(ARDS), энцефалопатию, повышение аспартатаминотрансаминазы (AST)/аланинаминотрансаминазы (ALT), почечную недостаточность, нарушения сердечной деятельности, гипоксию, неврологические нарушения и смерть. Неврологические осложнения включают бред, приступообразную активность, спутанность сознания, трудности с подбором слов, афазию и/или заторможенность. Другие признаки или результаты, связанные с CRS, включают усталость, тошноту, головную боль, судороги, тахикардию, миалгии, сыпь, синдром острой сосудистой утечки, нарушение функции печени и почечную недостаточность. В некоторых аспектах CRS ассоциируется с повышением одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногенемией или гепатоспленомегалией. Другие типичные признаки или симптомы, связанные с CRS, включают гемодинамическую нестабильность, фебрильную нейтропению, повышение уровня С-реактивного белка (CRP) в сыворотке крови, изменения параметров коагуляции (например, международного нормализованного отношения (INR), протромбинового времени (PTI) и/или фибриногена), изменения функции сердца и других органов и/или абсолютного количества нейтрофилов (ANC).

[0195] В некоторых вариантах осуществления признаки или симптомы, связанные с CRS, включают одно или более из: стойкая лихорадка, например, лихорадка с определенной температурой, например, выше 38 градусов Цельсия или около 38 градусов Цельсия в течение двух или более, например трех или более, например четырех или более дней, или по меньшей мере три дня подряд; лихорадка выше 38 градусов Цельсия или около этого; повышение уровня цитокинов (например, IFNγ или IL-6); и/или по меньшей мере один клинический признак токсичности, такой как гипотензия (например, измеренная по меньшей мере одним внутривенным вазопрессором); гипоксия (например, уровень кислорода в плазме (PO_2) менее 90%); и/или одно или несколько неврологических расстройств (включая изменения психического статуса, притупление чувствительности и судороги). В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность (NT) может наблюдаться одновременно с CRS.

[0196] Типичные CRS-связанные результаты включают повышенные или высокие уровни в сыворотке крови одного или более факторов, включая цитокины и хемокины и другие факторы, связанные с CRS. Типичные результаты также включают увеличение синтеза или секреции одного или нескольких таких факторов. Такой синтез или секреция может осуществляться Т-клеткой или клеткой, которая взаимодействует с Т-клеткой, например, клеткой врожденного иммунитета или В-клеткой.

[0197] Были разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS, чтобы предсказать, какие пациенты с большей вероятностью подвержены риску развития CRS (см. Davila et al. Sci Transl Med 2014;6(224):224ra225). Факторы включают лихорадку, гипоксию, гипотензию, неврологические изменения, повышенный уровень воспалительных цитокинов в сыворотке крови, повышение которых, индуцированное лечением, может хорошо коррелировать как с опухолевой нагрузкой до

лечения, так и с симптомами sCRS. Известны и другие рекомендации по диагностике и лечению CRS (см., например, Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95). В некоторых вариантах осуществления критериями, отражающими степень CRS, являются критерии, подробно описанные в Таблице 1 ниже.

Таблица 1

Иллюстративные критерии классификации для CRS

Степень	Описание симптомов
1 Слабая	Не угрожающие жизни, требуется только симптоматическое лечение, такое как антипиретики и противорвотные средства (например, лихорадка, тошнота, слабость, головная боль, миалгии, общее недомогание)
2 Умеренная	Требует и отвечает на умеренное вмешательство: Потребность в кислороде < 40%, или Гипотензия, реагирующая на жидкости или низкую дозу одного сосудосуживающего средства, или Органная токсичность 2 степени (согласно CTCAE v4.0)
3 Тяжелая	Требует и отвечает на агрессивное вмешательство: Потребность в кислороде ≥ 40%, или Гипотензия, требующая высокой дозы одного сосудосуживающего средства (например, норэпинефрин ≥ 20 мкг/кг/мин, дофамин ≥ 10 мкг/кг/мин, фенилэфрин ≥ 200 мкг/кг/мин или эпинефрин ≥ 10 мкг/кг/мин), или Гипотензия, требующая нескольких сосудосуживающих средств (например, вазопрессин+одно из вышеуказанных средств, или комбинация сосудосуживающих средств, эквивалентная ≥ 20 мкг/кг/мин норэпинефрина), или Органная токсичность 3 степени или трансаминит 4 степени (согласно CTCAE v4.0)
4 Угрожающая жизни	Угрожающие жизни: Требуется дыхательная поддержка аппаратом ИВЛ, или Органная токсичность 4 степени (за исключением трансаминита)
5 Фатальная	Смерть

[0198] В некоторых вариантах осуществления критерии, отражающие степень CRS, представлены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2

Иллюстративные критерии классификации для CRS

	Симптомы/ признаки	CRS 1 степени (слабой)	CRS 2 степени (умеренной)	CRS 3 степени (тяжелой)	CRS 4 степени (угрожающей жизни)
			Степень CRS определена по наиболее тяжелому симптому (за исключением лихорадки)		
Основные показатели жизнедеятельности	Температура ≥ 38,5°C/101,3°F	Да	Да	Да	Да
	SBP ≤ 90 мм рт.ст.	N/A	Отвечает на в/в жидкости или низкую дозу одного сосудосуживающего средства[a]	Нуждается в высокой дозе[a] или в нескольких сосудосуживающих средствах	Угрожающий жизни
	Нуждается в кислороде для достижения (SaO_2) > 90%	N/A	$FiO_{2<40}$%	$FiO_2 \geq 40$%	Требуется дыхательная поддержка аппаратом ИВЛ
Органная токсичность		N/A	2 степень	3 степень или трансаминит 4 степени	4 степень (за исключением трансаминита)

[0199] В некоторых вариантах осуществления терапия с использованием высокой дозы сосудосуживающего средства включают средства, описанные в Таблице 3 ниже.

Таблица 3

Высокие дозы сосудосуживающих средств (все дозы, требуемые в течение ≥ 3 часов)

Сосудосуживающие средства	Доза

Норэпинефрин монотерапия	≥ 20 мкг/мин
Дофамин монотерапия	≥ 10 мкг/кг/мин
Фенилэфрин монотерапия	≥ 200 мкг/мин
Эпинефрин монотерапия	≥ 10 мкг/мин
Если на вазопрессине	Вазопрессин+норэпинефриновый эквивалент (NE) ≥ 10 мкг/мин[a]
Если на комбинации сосудосуживающих средств (не вазопрессин)	Норэпинефриновый эквивалент ≥ 20 мкг/мин[a]

[a] Уравнение эквивалента сосудосуживающего средства согласно испытанию VASST: Доза норэпинефринового эквивалента=[норэпинефрин (мкг/мин)] + [дофамин (мкг/кг/мин) ÷ 2] + [эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин) ÷ 10]

[0200] В некоторых вариантах осуществления токсический результат представляет собой тяжелый CRS. В некоторых вариантах осуществления токсический результат представляет собой отсутствие тяжелого CRS (например, умеренный или слабый CRS). В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS 3 или более высокой степени, такой как представленные в Таблице 1 и Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления тяжелый CRS включает CRS 2 или более высокой степени, такой как CRS степени 2, 3, 4 или 5.

[0201] В некоторых аспектах токсический результат представляет собой или связан с нейротоксичностью. В некоторых вариантах осуществления признаки или симптомы, связанные с клиническим риском нейротоксичности, включают спутанность сознания, делирий, афазию, экспрессивную афазию, притупление чувствительности, миоклонус, летаргию, измененное психическое состояние, судороги, судорогоподобную активность, припадки (необязательно подтвержденные электроэнцефалограммой (ЭЭГ)), повышенные уровни бета-амилоида (A), повышенные уровни глутамата и повышенные уровни кислородных радикалов. В некоторых вариантах осуществления нейротоксичность оценивается по степени тяжести (например, по шкале 1-5 (см., например, Guido Cavaletti & Paola Marmiroli Nature Reviews Neurology 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03). В некоторых вариантах осуществления считается, что у субъекта развивается "тяжелая нейротоксичность" в ответ на введение или вторично после введения клеточной терапии или дозы клеток, если после введения у субъекта проявляются симптомы, ограничивающие самообслуживание (например, купание, одевание и раздевание, прием пищи, пользование туалетом, прием лекарств) из числа следующих: 1) симптомы периферической моторной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических моторных нервов; 2) симптомы периферической сенсорной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических сенсорных нервов, дизестезию, например, искажение сенсорного

восприятия, приводящее к аномальным и неприятным ощущениям, невралгию, например, интенсивные болезненные ощущения вдоль нерва или группы нервов, и/или парестезию, например, функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящие к аномальным кожным ощущениям покалывания, онемения, давления, холода и тепла в отсутствие стимула. В некоторых вариантах осуществления тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность степени 3 или выше, как указано в Таблице 4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая нейротоксичность включает нейротоксичность степени 2 или выше, например, нейротоксичность 2, 3, 4 или 5 степени.

Таблица 4

Иллюстративные критерии классификации для нейротоксичности

Степень	Описание симптомов
1 Бессимптомная или слабая	Слабые симптомы или их отсутствие
2 Умеренная	Присутствие симптомов, которые ограничивают инструментальную деятельность повседневной жизни (ADL), такую как приготовление пищи, покупка товаров бакалеи или одежды, пользование телефоном, контролирование денег
3 Тяжелая	Присутствие симптомов, которые ограничивают самообслуживание ADL, такое как купание, одевание и раздевание, прием пищи, пользование туалетом, прием лекарств
4 Угрожающая жизни	Симптомы, которые угрожают жизни, требующие неотложного вмешательства
5 Фатальная	Смерть

[0202] В некоторых аспектах нейротоксичность может быть связана с CRS или может быть независимой или отдельной от CRS. В некоторых аспектах нейротоксичность может быть связана с ранним началом CRS и быстрым повышением уровня воспалительных цитокинов в сыворотке крови и центральной нервной системе (ЦНС), что может привести к нарушению гематоэнцефалического барьера (BBB) (Gus et al., Cancer Discov 2017;7(12):1404 1419). В некоторых аспектах повышение пиковых сывороточных уровней IL-6, IFN-γ и MIP-1 может быть связано с нейротоксичностью. В некоторых случаях нейротоксичность также связана с увеличением пикового уровня эндогенного IL-1Ra, эндогенного ингибитора провоспалительных эффектов IL-1 альфа (IL-1α) и IL-1 бета (IL-1β), которые в некоторых случаях участвуют в нейротоксичности. В некоторых аспектах уровни цитокинов, обычно связанных с системным воспалением (например, IL-6,

IL-10 и интерферон-гамма (IFNγ)), повышаются в случаях тяжелой нейротоксичности.

[0203] В некоторых вариантах осуществления токсический результат представляет собой дозоограничивающую токсичность. В некоторых вариантах осуществления токсический результат представляет собой отсутствие дозоограничивающей токсичности. В некоторых вариантах осуществления дозоограничивающая токсичность (DLT) определяется как любая токсичность степени 3 или более высокой степени, определенная в соответствии с любыми известными или опубликованными руководствами для оценки конкретной токсичности, такими как любые описанные выше и включая National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0.

[0204] В некоторых аспектах токсичность представляет собой синдром активации макрофагов (MAS) (также называемый гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (HLH)). В некоторых аспектах MAS/HLH связан с нарушением функции NK и цитотоксических Т-клеток и имеет широкий спектр причин, симптомов и исходов. В некоторых аспектах MAS/HLH приводит к гиперинтенсивной воспалительной реакции с некоторыми характеристиками, которые совпадают с CRS. В некоторых аспектах MAS может быть связан с неконтролируемой активацией и пролиферацией введенных клеток и последующей активацией макрофагов. В некоторых аспектах MAS может характеризоваться высокоградусной, не ремиттирующей лихорадкой, цитопенией и гепатоспленомегалией. При MAC наблюдаются, например, повышенные уровни воспалительных цитокинов, сывороточного ферритина, растворимого рецептора IL-2 (sCD25), триглицеридов, снижение циркулирующих природных клеток-киллеров (NK), повышенные уровни трансаминаз, признаки острой печеночной недостаточности, коагулопатия и диссеминированная внутрисосудистая коагулопатия. В некоторых аспектах клинические проявления и наблюдения между MAS и CRS совпадают, но есть и отличительные признаки, такие как гепатоспленомегалия и лимфаденопатия. В некоторых аспектах субъекты с гематологическими злокачественными заболеваниями имеют более высокий риск развития MAS/HLH. В некоторых случаях у субъектов с MAS/HLH или связанным с CRS MAS/HLH синдромом (MALS) наблюдаются повышенные уровни таких цитокинов, как IL-18, IL-8, IP-10, MCP-1, MIG и/или MIP-1β (см., например, Teachy et al., Cancer Discov. 2016;6:664-679; Shimabukuro-Vornhagen, Journal for ImmunoTherapy of Cancer. 2018;6:56).

[0205] Примеры признаков или симптомов, связанных с клиническим риском MAS/HLH, включают постоянную высокую лихорадку (≥ 38,5°C) и увеличенные лимфогематопоэтические органы (сплено/гепатомегалия), иногда сопровождающиеся аденопатией, в некоторых случаях может также присутствовать легочное, неврологическое, кожное и желудочно-кишечное поражение; лабораторные наблюдения, такие как панцитопения, гиперферритинемия, гипофибриногенемия, повышение уровня D-димера, гипертриглицеридемия и нарушения функции печени. В некоторых аспектах текущие инфекции могут быть триггером MAS/HLH, и текущие инфекции контролируют с использованием стандартных тестов на инфекции, вызванные наиболее распространенными вирусами, такими как герпес, цитомегаловирус (CMV) и вирус

Эпштейна-Барр (EBV), а другие инфекционные агенты (например, микобактерии, паразиты и грибы, в частности Candida и Mucor) исключаются в соответствии с конкретными клиническими или эпидемиологическими признаками. В некоторых аспектах аспираты костного мозга проверяют на наличие признаков, связанных с MAS/HLH.

[0206] В некоторых аспектах типичные диагностические критерии MAS/HLH могут быть основаны на консенсусных критериях HLH-2004, дополнительно пересмотренных в 2014 году для HLH, связанных со злокачественными новообразованиями (Lehmberg et al., Haematologica. 2015;100(8):997-1004); в некоторых случаях при соблюдении одного из двух следующих критериев:

1. Молекулярный диагноз, согласующийся с MAS/HLH

2. Диагностические критерии для MAS/HLH удовлетворены (5 из 8 критерии ниже):

a. высокая персистирующая лихорадка (≥ 38,5°C)

b. спленомегалия

c. цитопении (поражающие 2 из 3 линий в периферической крови): Гемоглобин < 90 г/л, тромбоциты < 100×10^9/л и нейтрофилы < $1,0\times10^9$/л

d. триглицериды ≥ 3,0 ммоль/л (т.е. 265 мг/дл) или фибриноген ≤ 1,5 г/л

e. гемофагоцитоз в костном мозге, селезенке и/или лифоузлах

f. низкая или отсутствующая NK-клеточная активность (в соответствии с местным лабораторным референсным диапазоном)

g. ферритин≥500 нг/мл

h. растворимый CD25 (т.е. растворимый IL-2 рецептор)≥2,400 Ед/мл.

[0207] В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с представленными способами может привести к более низкой частоте и/или более низкой степени токсичности, токсического результата или симптома, профиля, фактора или свойства, способствующего токсичности, например, симптома или результата, связанного или указывающего на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность, например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность, или MAS/HLH, например, по сравнению с применением других терапий. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с представленными способами может привести к более высокой частоте ответа, например к более высокой частоте OR, CR, sCR, VGPR или PR, и/или более стойкому ответу, вместе с более низкой частотой и/или более низкой степенью токсичности, токсического результата или симптома, профиля, фактора или свойства, способствующего токсичности, например, симптома или результата, связанного или указывающего на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичность, например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность, или MAS/HLH, например, по сравнению с применением других терапий. В некоторых вариантах осуществления лечение в соответствии с представленными способами может привести как к более высокой частоте ответа, так и к более низкой частоте или степени токсичности. В некоторых аспектах такие результаты могут также сопровождаться более высокой экспансией или длительной персистенцией введенных клеток по сравнению с введением других терапий.

B. Комбинированная терапия

[0208] Также представлены способы комбинированной терапии, которая включает введение и применения, такие как терапевтические и профилактические применения, BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов (*например, CAR*), сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (*например, CAR*), множества сконструированных клеток, экспрессирующих рецепторы, и/или композиций, включающих их и одно или несколько дополнительных терапевтических средств.

[0209] В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (*например*, химерный антигенный рецептор) и/или сконструированные клетки, экспрессирующие указанные молекулы (*например*, рекомбинантный рецептор), описанные в настоящей заявке, вводят как часть комбинированного лечения или комбинированной терапии, например одновременно, последовательно или чередующимся образом, в любом порядке, с одним или более дополнительными терапевтическими вмешательствами. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных терапевтических вмешательств включают, например, антитело, сконструированную клетку, рецептор и/или агент, такой как клетка, экспрессирующая рекомбинантный рецептор, и/или цитотоксическое или терапевтическое средство, например, химиотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение одного или нескольких дополнительных средств, терапий и/или лечений, например, любого из дополнительных средств, терапий и/или лечений, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение одного или нескольких дополнительных средств для лечения или терапии, таких как средства для облегчения токсичности, которая может быть связана с клеточной терапией, такие как антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), например рекомбинантный IL-1Ra, IL-6-нацеленное средство, стероид; лимфодеплеционная терапия или другие средства, такие как иммуномодулирующие средства, ингибитор иммунных контрольных точек, антагонист или агонист пути аденозина или рецептора аденозина, и/или ингибитор киназы. В некоторых вариантах осуществления комбинированное лечение или комбинированная терапия включает дополнительное лечение, такое как хирургическое лечение, трансплантат и/или лучевую терапию. Также представлены способы комбинированного лечения или комбинированной терапии, которые включают BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы (например, CAR), клетки и/или композиции, описанные в настоящей заявке, и одно или более дополнительных терапевтических вмешательств.

[0210] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство повышает безопасность за счет уменьшения или облегчения побочных эффектов вводимых сконструированных клеток или включающих их композиций. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может лечить то же самое заболевание, состояние или сопутствующее заболевание. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может облегчать, уменьшать или устранять одну или более токсичностей,

неблагоприятных эффектов или побочных эффектов, которые связаны с введением клеток и/или композиций, например CAR-экспрессирующих клеток, и в некоторых аспектах его можно использовать в любом профилактическом способе, представленном в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство для комбинированного лечения или комбинированной терапии повышает, усиливает и/или промотирует эффективность и/или безопасность терапевтического эффекта сконструированных клеток или включающих их композиций. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство повышает или улучшает эффективность, выживание или персистенцию вводимых клеток, например, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство выбрано из ингибитора протеинфосфатазы, ингибитора киназы, цитокина, иммуномодулятора, или средства, которое снидает уровень или активность регуляторной Т (Treg) клетки.

[0211] Любое из дополнительных средств, описанных в настоящей заявке, можно получить и вводить в виде комбинированной терапии с сконструированными клетками, экспрессирующими любой BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), описанный в настоящей заявке, или композициями, включающими клетки, например, в фармацевтических композициях, включающих одно или более средств комбинированной терапии и фармацевтически приемлемый носитель, такой как любой описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, экспрессирующие любой BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), описанный в настоящей заявке, или композиции, включающие клетки, можно вводить одновременно, совместно или последовательно, в любом порядке, с дополнительными средствами, терапией или лечением, при этом такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни каждого из средств в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство можно совместно вводить с сконструированными клетками, экспрессирующими любой BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор (например, CAR), описанный в настоящей заявке, или композициями, включающими клетки, например, как часть одной и той же фармацевтической композиции или с использованием того же способа доставки. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство вводят одновременно с сконструированными клетками, экспрессирующими BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композициями, описанными в настоящей заявке, но в отдельных композициях. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой дополнительную сконструированную клетку, например, клетку, сконструированную для экспрессии другого рекомбинантного рецептора, и его вводят в той же самой композиции или в отдельной композиции. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство инкубируют с сконструированной клеткой, например, CAR-экспрессирующими клетками, до введения клеток.

[0212] В некоторых примерах одно или несколько дополнительных средств вводят

после или до введения сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиций, описанных в настоящей заявке, с интервалом в течение выбранного периода времени. В некоторых примерах период времени составляет 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или 3 месяца. В некоторых примерах одно или несколько дополнительных средств вводят многократно, и/или сконструированные клетки, экспрессирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиции, описанные в настоящей заявке, вводят многократно. Например, в некоторых вариантах осуществления дополнительное средство вводят перед введением сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиций, описанных в настоящей заявке, например, за две недели, 12 дней, 10 дней, 8 дней, одну неделю, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день до введения. Например, в некоторых вариантах осуществления дополнительное средство вводят после введения сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиций, описанных в настоящей заявке, например, через две недели, 12 дней, 10 дней, 8 дней, одну неделю, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день после введения.

[0213] Доза дополнительного средства может представлять собой любое терапевтически эффективное количество, например любую величину дозы, и соответствующая доза дополнительного средства может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа, дозы и/или частоты введения рекомбинантного рецептора, клетки и/или композиции, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли рекомбинантный рецептор, клетка и/или композиция в профилактических или терапевтических целях, от предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на рекомбинантный рецептор, клетку и/или композицию, а также от усмотрения лечащего врача. Рекомбинантный рецептор, клетку и/или композицию и/или дополнительное средство и/или терапию можно вводить пациенту однократно, повторно или на протяжении нескольких курсов лечения.

[0214] В некоторых аспектах введение дозы сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные клетки, повторяют. В некоторых аспектах субъект получает одну или несколько дополнительных доз сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные клетки, которые являются такими же, как и начальная доза сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные клетки. В некоторых аспектах субъект получает одну или несколько дополнительных доз сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные клетки, которые отличаются от начальной дозы сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные клетки. В некоторых аспектах дополнительная доза выше, чем начальная доза. В некоторых аспектах дополнительная доза ниже начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят только одну дозу сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные

клетки. В некоторых вариантах осуществления введение дозы сконструированных клеток и/или композиции, содержащей сконструированные клетки, не повторяют.

1. Профилактическая терапия

[0215] В некоторых аспектах, представленные способы и применения включают введение дополнительной терапии в качестве профилактической терапии. В некоторых вариантах осуществления для профилактической терапии дополнительное средство и/или комбинированную терапию вводят до определенного события или на ранней стадии заболевания. В некоторых аспектах профилактическая терапия начинается до введения клеточной терапии и/или до проявления результата клеточной терапии, например, такого как проявление неблагоприятных событий, таких как токсичность от клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления профилактическая терапия включает превентивные меры, такие как терапия для предотвращения неблагоприятных событий, таких как токсичность после введения клеточной терапии. В некоторых аспектах представлены способы для снижения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, подлежащего лечению клеточной терапией. В некоторых аспектах токсичность включает токсичность, которая может быть связана с клеточной терапией.

[0216] В некоторых вариантах осуществления профилактическое терапии может усиливать, повышать и/или промотировать безопасность терапевтического эффекта сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, связывающийся с BCMA, описанных в настоящей заявке, и/или композиций, включающих такие клетки. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство, например, для профилактической терапии, повышает безопасность путем уменьшения или облегчения побочных эффектов сконструированных клеток или композиций. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может облегчать, уменьшать или устранять одну или более токсичностей, побочных эффектов или побочных эффектов, которые связаны с введением сконструированных клеток или композиций, например CAR-экспрессирующих клеток. Как описано выше, неблагоприятные события, такие как токсичность, которая может быть связана с клеточной терапией, например, адоптивной клеточной терапией, могут включать синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность (также называемую неврологическими явлениями; NE) и синдром активации макрофагов (MAS). В некоторых аспектах IL-1, продуцируемый макрофагами, играет роль в запуске CRS. В некоторых аспектах CRS также может быть связан с диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови и может демонстрировать клинические и патологические картины, сходные с MAS.

[0217] В некоторых аспектах дополнительное средство для комбинированной терапии представляет собой антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra). В некоторых вариантах осуществления IL-1Ra вводят в качестве профилактического лечения. В некоторых аспектах IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных клеток, например, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят до введения дозы

сконструированных клеток. В некоторых аспектах введение IL-1Ra продолжают после введения дозы сконструированных клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы клеток.

[0218] В некоторых аспектах IL-1Ra для комбинированной терапии и/или профилактической терапии представляет собой анакинру (Kineret) или ее модифицированную форму, такую как анакинра, модифицированная N-концевым фрагментом Pro-Ala-Ser (PAS) (см., например, Powers et al., J Biol Chem. 2020 Jan 17;295(3):868-882). В некоторых аспектах IL-1Ra представляет собой анакинру. Типичная последовательность анакинра представлена в SEQ ID NO:256. В некоторых аспектах анакинра представляет собой рекомбинантный IL-1Ra, одобренный для введения субъектам с активным ревматоидным артритом (RA) от умеренной до тяжелой степени в возрасте 18 лет и старше. Блокада IL-1 через IL-1Ra может предотвратить тяжелый CRS, сохраняя при этом неизменной противоопухолевую эффективность клеточной терапии. IL-1Ra может проникать через гематоэнцефалический барьер и, таким образом, может снижать тяжесть неврологических событий и может использоваться для уменьшения MAS/HLH. Микроглия человека, активированная IL-1, может продуцировать индуцируемую синтазу оксида азота и провоспалительные цитокины (Tarassishin et al., Glia 62, 999-1013 (2014)), соответственно, блокирование IL-1 может привести к уменьшению или предотвращению тяжелого CRS и тяжелым неврологическим явлениям. В некоторых аспектах введение IL-1Ra в качестве профилактической терапии может привести к отсрочке начала, уменьшению частоты и тяжести неблагоприятных событий, таких как CRS, неврологические явления или MAS.

[0219] В некоторых аспектах, субъект принимает IL-1Ra, например анакинру, в качестве профилактической терапии, например для уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения возникновения токсичности, которая может быть связана с адоптивной клеточной терапией, такой как клеточная терапия, включающая дозу сконструированных клеток, например сконструированных Т-клеток, включающих химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении В-клеточного антигена созревания (BCMA), представленный в настоящей заявке. В некоторых аспектах одна или более доз IL-1Ra, вводимых до введения дозы сконструированных Т-клеток, представляют собой профилактическое введение.

[0220] В некоторых из любых вариантов осуществления субъект принимает по меньшей мере одну дозу IL-1Ra до введения дозы сконструированных клеток. В некоторых аспектах клеточную терапию, включающую дозу сконструированных клеток, включающих CAR, специфический в отношении BCMA, вводят субъекту, который уже получил по меньшей мере одну дозу IL-1Ra. В некоторых вариантах осуществления представленные способы и применения включают введение субъекту по меньшей мере одной дозы IL-1Ra до введения клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих CAR, специфический в отношении BCMA. В некоторых аспектах по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая до введения дозы сконструированных Т-клеток, представляет собой профилактическое введение IL-1Ra.

[0221] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0222] В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения включают введение по меньшей мере двух доз IL-1Ra и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих CAR, специфический в отношении BCMA. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах дозу сконструированных Т-клеток, включающих CAR, специфический в отношении BCMA, вводят субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза IL-1Ra в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra осуществляют после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0223] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту за или примерно за 21, 18, 15, 12, 9, 6 или 3 часов, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных, до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 24, 21, 18, 15 или 12 часов, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных, до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 21 час до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 18 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 15 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту в пределах или примерно за 12 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту накануне вечером или ночью до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах способы и применения включают введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra в пределах или примерно за 6, 5, 4, 3 или 2 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых из любых вариантов осуществления по меньшей мере две дозы IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа и одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 18 часов и одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или

примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 12 часов и одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах одну дозу IL-1Ra вводят субъекту накануне вечером или ночью до введения дозы сконструированных Т-клеток и одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0224] В некоторых аспектах субъекту вводят по меньшей мере две дозы IL-1Ra. В некоторых аспектах субъекту вводят по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доз IL-1Ra.

[0225] В некоторых из любых вариантов осуществления по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят субъекту после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доз IL-1Ra вводят субъекту после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 доз IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах 3, 4, 5, 6 или 7 доз IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления 5 доз IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления 4 дозы IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

[0226] В некоторых из любых вариантов осуществления дозу IL-1Ra вводят ежедневно в течение нескольких дней подряд. В некоторых аспектах такие дозы вводят ежедневно в течение нескольких дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах каждую из 5 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят ежедневно в течение 5 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах каждую из 4 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят ежедневно в течение 4 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток. В некоторых аспектах дозу сконструированных Т-клеток вводят в День 1 и одну из 4 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в каждый День 2, День 3, День 4 и День 5.

[0227] В некоторых аспектах субъекту вводят в общей сложности 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доз IL-1Ra. В некоторых аспектах субъекту вводят в общей сложности 5, 6, 7, 8 или 9 доз IL-1Ra. В некоторых аспектах субъекту вводят в общей сложности 7 доз IL-1Ra. В некоторых аспектах субъекту вводят в общей сложности 8 доз IL-1Ra. В некоторых аспектах субъекту вводят в общей сложности 9 доз IL-1Ra.

[0228] В некоторых из любых представленных вариантов осуществления ежедневное введение IL-1Ra осуществляют в одно и тоже или примерно в одно и тоже время каждый день. В некоторых из любых представленных вариантов осуществления ежедневное введение доз IL-1Ra осуществляют с интервалом в 24 часа (q24h).

[0229] В некоторых аспектах способы и применения также включают введение по меньшей мере одной дополнительной дозы IL-1Ra, если субъект демонстрирует признаки или симптомы токсичности, или при появлении токсичностии, такой как а синдром

высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность (NT) или синдром активации макрофагов (MAS)/гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH). В некоторых аспектах по меньшей мере одну дополнительную дозу IL-1Ra вводят субъекту после введения сконструированных Т-клеток, если субъект демонстрирует признаки или симптомы CRS или при возникновении CRS. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дополнительную дозу IL-1Ra вводят раз в два дня, один раз ежедневно, два раза в день, три раза в день или четыре раза в день. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дополнительную дозу IL-1Ra вводят два раза в день. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дополнительную дозу IL-1Ra вводят один раз в день. В некоторых аспектах по меньшей мере одну дополнительную дозу IL-1Ra вводят вплоть до исчезновения признаков или симптомов CRS. В некоторых аспектах по меньшей мере одна дополнительная доза IL-1Ra представляет собой одну дополнительную дозу. Таким образом, в некоторых аспектах, если субъект демонстрирует признаки или симптомы CRS, или при возникновении CRS дозу IL-1Ra вводят два раза в день. В некоторых аспектах, если субъект демонстрирует признаки или симптомы CRS, или при возникновении CRS дозу IL-1Ra вводят примерно через каждые 12 часов (q12h).

[0230] В некоторых из любых вариантов осуществления, IL-1Ra, вводимый в комбинации с клеточной терапией, например с клеточной терапией, включающей дозу сконструированных Т-клеток, экспрессирующих анти-BCMA химерный антигенный рецептор (CAR), представляет собой рекомбинантный IL-1Ra. В некоторых аспектах рекомбинантный IL-1Ra является негликозилированным. В некоторых аспектах рекомбинантный IL-1Ra представляет собой анакинру. В некоторых из любых вариантов осуществления IL-1Ra включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:256, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокую идентичность последовательности с SEQ ID NO:256, которая сохраняет функцию антагониста IL-1R. В некоторых из любых вариантов осуществления IL-1Ra включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:256. В некоторых аспектах IL-1Ra представляет собой анакинру, и каждая доза анакинры находится на уровне или около 500, 400, 300, 200, 100 или 50 мг, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления каждая из доз анакинры находится на уровне или около 200 мг. В некоторых вариантах осуществления каждая из доз анакинра находится на уровне или около 100 мг.

[0231] В некоторых вариантах осуществления IL-1Ra вводят подкожным путем введения. В некоторых аспектах анакинра вводят при дозе на уровне или около 100 мг ежедневно подкожным путем введения. В некоторых аспектах, если субъект демонстрирует признаки или симптомы CRS, или при возникновении CRS анакинра вводят при дозе на уровне или около 100 мг два раза в день подкожным путем введения.

[0232] В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения включают профилактическое введение рекомбинантного IL-1Ra, такого как анакинра, в комбинации с клеточной терапией, включающей сконструированные Т-клетки,

экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, описанный в настоящей заявке (например, включающий V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127), субъекту, который имеет заболевание или расстройство, такое как множественная миелома (MM), например рецидивирующая или рефрактерная множественная миелома (R/R MM). В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения включают введение двух доз IL-Ra, при этом каждая доза включает 100 мг анакинрв, которые вводят подкожно до введения клеточной терапии, где одну дозу рекомбинантного IL-1Ra вводят накануне ночью или вечером перед введением клеточной терапии и одну дозу рекомбинантного IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения клеточной терапии. В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения также включают продолжение введения IL-1Ra после введения клеточной терапии ежедневно в течение 5 дней подряд, при этом каждая доза включает 100 мг анакинрв, которую вводят подкожно. В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения также включают продолжение введения IL-1Ra после введения клеточной терапии ежедневно в течение 4 дней подряд, при этом каждая доза включает 100 мг анакинра, которую вводят подкожно. В некоторых из любых вариантов осуществления, если субъект демонстрирует признаки или симптомы CRS или при возникновении CRS одну или более доз рекомбинантного IL-1Ra вводят два раза в день до устранения CRS. В некоторых из любых вариантов осуществления рекомбинантный IL-1Ra вводят в одно и то же или примерно в одно и то же время каждый день. В некоторых из любых вариантов осуществления одну дозу IL-1Ra вводят примерно через каждые 24 часа. В некоторых из любых вариантов осуществления одну дозу IL-1Ra вводят примерно через каждые 12 часов.

[0233] В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения включают введение двух доз IL-1Ra, при этом каждая доза включает 100 мг анакинра, которые вводят подкожно до введения клеточной терапии, где одну дозу IL-1Ra вводят накануне ночью или вечером перед введением клеточной терапии и одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения клеточной терапии (День 1) и ежедневное введение одной дозы IL-1Ra (например q24h), такой как доза, включающая около 100 мг анакинра, осуществляют подкожно в Дни 2-5.

[0234] В некоторых из любых вариантов осуществления способы и применения включают введение двух доз IL-1Ra, при этом каждая доза включает 100 мг анакинра, которые вводят подкожно до введения клеточной терапии, где одну дозу рекомбинантного IL-1Ra вводят накануне ночью или вечером перед введением клеточной терапии и одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения клеточной терапии (День 1) и, если субъект демонстрирует признаки или симптомы или возникновение CRS, ежедневное введение двух доз IL-1Ra (например q12h), таких как доза, включающая около 100 мг анакинра, осуществляют подкожно в Дни 2-5.

[0235] В некоторых из любых вариантов осуществления представленные способы и

применения, например профилактические способы и применения, уменьшают тяжесть, облегчает и/или предотвращают возникновение токсичности. В некоторых из любых вариантов осуществления токсичность представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS). В некоторых из любых вариантов осуществления CRS представляет собой тяжелый CRS или CRS 3 или более высокой степени. В некоторых из любых вариантов осуществления токсичность представляет собой нейротоксичность (NT). В некоторых из любых вариантов осуществления NT представляет собой тяжелую NT или NT 2 или более высокой степени, или NT 3 или более высокой степени. В некоторых из любых вариантов осуществления токсичность представляет собой синдром активации макрофагов (MAS) или гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH).

[0236] В некоторых вариантах осуществления способы используют для профилактического лечения субъекта, который идентифицирован как имеющий риск развития токсичности после введения сконструированных Т-клеток (например CAR Т-клеток). Например, некоторые субъекты могут иметь факторы риска, которые делают их подверженными развитию токсичности или имеющими вероятность развития токсичности, такой как тяжелый CRS, после введения адоптивной Т-клеточной терапии (например, CAR Т-клеток). Следовательно, представлены способы идентификации субъекта с риском развития токсичности после введения сконструированных Т-клеток (например, CAR Т-клеток) и выбора субъекта для лечения любым из профилактических способов, описанных в настоящей заявке, до введения субъекту сконструированных Т-клеток (например, CAR Т-клеток).

[0237] В некоторых вариантах осуществления токсичность представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS). 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); Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); и Kochenderfer et al., Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78. Были разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS, чтобы предсказать, какие пациенты с большей вероятностью подвержены риску развития sCRS (см. Davilla et al. Science Translational Medicine. 2014;6(224):224ra25). Примеры функций CRS описаны в Разделе I.4.b.

[0238] В некоторых вариантах осуществления субъектв выбирают для лечения любым из способов, описанных в настоящей заявке, если установлено, что субъект имеет риск развития токсичности после введения сконструированных Т-клеток (например, CAR Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления субъекта идентифицируют как имеющего риск развития токсичности (например, CRS), если у субъекта проявляются один или несколько факторов. В некоторых вариантах осуществления факторы включают лихорадку, гипоксию, гипотензию, неврологические изменения и/или повышенные уровни маркеров воспаления. В некоторых вариантах осуществления маркером воспаления является С-реактивный белок (CRP), скорость оседания эритроцитов (ESR), альбумин,

ферритин, β2-микроглобулин (β2-M), лактатдегидрогеназа (LDH), цитокин или хемокин. В некоторых случаях маркером воспаления является LDH. В некоторых примерах маркер воспаления представляет собой цитокин или хемокин, который представляет собой IL-7, IL15, MIP-1альфа или TNF-альфа. В некоторых вариантах осуществления факторы включают волюметрический показатель опухолевой нагрузки. В некоторых вариантах осуществления волюметрический показатель опухолевой нагрузки представляет собой сумму произведений диаметров (SPD), самых больших диаметров опухоли (LD), сумму самых больших диаметров опухоли (SLD), объем опухоли, объем некроза, соотношение некроз-опухоль (NTR), перитуморальный отек (PTE) и отношение отека к опухоли (ETR).

[0239] В некоторых вариантах осуществления субъекта идентифицируют как имеющего риск развития токсичности после введения сконструированных Т-клеток, если уровень маркера воспаления в образце от субъекта выше порогового значения. В некоторых вариантах осуществления маркер воспаления представляет собой LDH. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение равно или около 300 единиц на литр, равно или около 400 единиц на литр, равно или около 500 единиц на литр или равно или около 600 единиц на литр. В некоторых вариантах осуществления маркер воспаления представляет собой LDH и пороговое значение равно или около 300 единиц на литр, равно или около 400 единиц на литр, равно или около 500 единиц на литр или равно или около 600 единиц на литр.

[0240] В некоторых вариантах осуществления субъекта идентифицируют как имеющего риск развития токсичности после введения сконструированных Т-клеток, если волюметрический показатель опухолевой нагрузки у субъекта выше порогового значения. В некоторых вариантах осуществления волюметрический показатель опухолевой нагрузки представляет собой SPD. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение равно или около 30 $см^2$, равно или около 40 $см^2$, равно или около 50 $см^2$, равно или около 60 $см^2$ или равно или около 70 $см^2$. В некоторых вариантах осуществления волюметрический показатель представляет собой SPD и пороговое значение равно или около 30 $см^2$, равно или около 40 $см^2$, равно или около 50 $см^2$, равно или около 60 $см^2$, или равно или около 70 $см^2$.

2. Лимфодеплеционная терапия

[0241] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой лимфодеплеционную терапию. Считается, что лимфодеплеционная химиотерапия улучшает приживление и активность рекомбинантных клеток, экспрессирующих рецепторы, таких как CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционная химиотерапия может усиливать пролиферацию адоптивно перенесенных опухолеспецифических Т-клеток in vivo за счет гомеостатической пролиферации. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия может уменьшать количество или устранять CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки, которые могут подавлять функцию нацеленных на опухоль адоптивно перенесенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционная химиотерапия перед адоптивной терапией

Т-клетками может усиливать экспрессию фактора 1 стромальных клеток (SDF-1) в костном мозге, усиливая хоминг модифицированных Т-клеток к месту первичной опухоли посредством связывания SDF-1 с CXCR-4, экспрессированным на поверхности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционная химиотерапия может дополнительно снижать опухолевую нагрузку у субъекта и потенциально снижать риск и тяжесть CRS.

[0242] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецию у субъекта осуществляют, например, до введения сконструированных клеток, например CAR-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеция включает введение одного или более из мелфалана, Цитоксана, циклофосфамида и/или флударабина. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционную химиотерапию вводят субъекту до, одновременно или после введения (например, инфузии) сконструированных клеток, например, CAR-экспрессирующих клеток. В одном примере лимфодеплеционную химиотерапию вводят субъекту до введения сконструированных клеток, например, CAR-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционную химиотерапию вводят за 1-10 дней до введения сконструированных клеток, например, за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 дней до начала введения сконструированных клеток, или по меньшей мере за 2 дня до, например, по меньшей мере за 3, 4, 5, 6, или 7 дней до начала введения сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят прекондиционирующий агент не более чем за 7 дней, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня до начала введения сконструированных клеток. Количество дней после лимфодеплеционной химиотерапии, по прошествии которых вводят сконструированные клетки, можно определить с учетом клинических или логистических обстоятельств. В некоторых примерах можно осуществить корректировки доз или другие изменения режима лимфодеплеционной химиотерапии с учетом состояния здоровья субъекта, например, функции соответствующего органа субъекта, что определяется лечащим врачом.

[0243] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплеционная химиотерапия включает введение лимфодеплецирующего средства, такого как циклофосфамид, флударабин или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид при дозе между или примерно между 20 мг/кг и 100 мг/кг массы тела субъекта, например, между или примерно между 40 мг/кг и 80 мг/кг. В некоторых аспектах субъекту вводят около 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления где лимфодеплецирующее средство включает циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид при дозе между или между примерно 100 мг/м^2 и 500 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, например, между или между примерно 200 мг/м^2 и 400 мг/м^2, или 250 мг/м^2 и 350 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях субъекту вводят около 100 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях субъекту вводят около 150 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях субъекту вводят около 200 мг/м^2 циклофосфамида.

В некоторых случаях субъекту вводят около 250 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых случаях субъекту вводят около 300 мг/м^2 циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, вводить ежедневно, через день или через три дня. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 2-4 дней. В некоторых случаях субъекту вводят около 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней, до начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят в общей сложности количество, равное или около 300 мг/м^2, 400 мг/м^2, 500 мг/м^2, 600 мг/м^2, 700 мг/м^2, 800 мг/м^2, 900 мг/м^2, 1000 мг/м^2, 1200 мг/м^2, 1500 мг/м^2, 1800 мг/м^2, 2000 мг/м^2, 2500 мг/м^2, 2700 мг/м^2, 3000 мг/м^2, 3300 мг/м^2, 3600 мг/м^2, 4000 мг/м^2 или 5000 мг/м^2 циклофосфамида, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных, до начала введения клеточной терапии.

[0244] В некоторых вариантах осуществления, где лимфодеплецирующее средство включает флударабин, субъекту вводят флударабин при дозе между или между примерно 1 мг/м^2 и 100 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, например между или между примерно 10 мг/м^2 и 75 мг/м^2, 15 мг/м^2 и 50 мг/м^2, 20 мг/м^2 и 40 мг/м^2, или 24 мг/м^2 и 35 мг/м^2, включительно. В некоторых случаях субъекту вводят около 10 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях субъекту вводят около 15 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях субъекту вводят около 20 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях субъекту вводят около 25 мг/м^2 флударабина. В некоторых случаях субъекту вводят около 30 мг/м^2 флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, вводить ежедневно, через день или через три дня. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 2-4 дней. В некоторых случаях субъекту вводят около 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят в общей сложности количество, равное или около 10 мг/м^2, 20 мг/м^2, 25 мг/м^2, 30 мг/м^2, 40 мг/м^2, 50 мг/м^2, 60 мг/м^2, 70 мг/м^2, 80 мг/м^2, 90 мг/м^2, 100 мг/м^2, 120 мг/м^2, 150 мг/м^2, 180 мг/м^2, 200 мг/м^2, 250 мг/м^2, 270 мг/м^2, 300 мг/м^2, 330 мг/м^2, 360 мг/м^2, 400 мг/м^2 или 500 мг/м^2 циклофосфамида, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных, до начала введения клеточной терапии.

[0245] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующее средство включает одно средство, такое как циклофосфамид или флударабин. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят циклофосфамид только, без флударабина или другого лимфодеплецирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, до введения, субъект получил лимфодеплеционную терапию, включающую введение циклофосфамида на уровне или около 200-400 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно на уровне или около 300 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят флударабин только, например, без

циклофосфамида или другого лимфодеплецирующего средства. В некоторых вариантах осуществления, до введения, субъект получил лимфодеплеционную терапию, включающую введение флударабина при или примерно при 20-40 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно при или примерно при 30 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней.

[0246] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецирующее средство включает комбинацию средств, такую как комбинация циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать циклофосфамид при любой дозе или схеме введения, например, как те, которые описаны выше, и флударабин при любой дозе или схеме введения, например, как те, которые описаны выше. Например, в некоторых аспектах субъекту вводят флударабин при или примерно при 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта ежедневно и циклофосфамид при или примерно при 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта ежедневно в течение 3 дней.

[0247] В некоторых вариантах осуществления противорвотную терапию, за исключением дексаметазона или других стероидов, можно вводить до лимфодеплеционной химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления Месна можно применять для субъектов с геморрагическим циститом в анамнезе.

3. Другие дополнительные терапии

[0248] В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство для снятия боли, такое как ацетаминофен, или антигистаминное средство, такое как дифенгидрамин, можно вводить до, во время или после введения рекомбинантного рецептора, сконструированных Т-клеток или композиции или дозы сконструированных Т-клеток, представленных в настоящей заявке, для облегчения или уменьшения или устранения незначительных побочных эффектов, связанных с лечением. В некоторых примерах можно вводить трансфузии эритроцитов и тромбоцитов и/или колониестимулирующие факторы для снижения или устранения одного или нескольких видов токсичности, неблагоприятных эффектов или побочных эффектов, связанных с введением клеток и/или композиций, например CAR-экспрессирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления профилактические или эмпирические противоинфекционные средства (например, триметоприм/сульфаметоксазол для профилактики пневмоцистной пневмонии (PCP), антибиотики широкого спектра действия, противогрибковые средства или противовирусные средства для лечения фебрильной нейтропении) можно вводить для лечения побочных эффектов, возникающих в результате лечения. В некоторых примерах, при необходимости, может быть предусмотрена профилактика для лечения лимфопении и/или нейтропении, возникающей в результате лечения.

[0249] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия, лечение или средство включает химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, трансплантацию, адоптивную клеточную терапию, антитела, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, цитокины, ингибиторы роста, антигормональные средства, ингибиторы киназ, антиангиогенные средства, кардиопротекторы,

иммуностимулирующие средства, иммунодепрессанты, ингибиторы иммунных контрольных точек, антибиотики, ингибиторы ангиогенеза, модуляторы метаболизма или другие терапевтические средства, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное средство, клетку, токсин, липид, углевод или их комбинации, или любой другой тип терапевтического средства, например, облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия, агент или лечение включают хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, трансплантацию, введение клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например CAR, ингибитор киназы, ингибитор контрольной точки иммунного ответа, ингибитор пути mTOR, иммунодепрессанты, иммуномодуляторы, антитела, иммуноаблятивные средства, антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты антител, другие терапии с использованием антител, цитотоксины, стероиды, цитокины, пептидные вакцины, гормональную терапию, антиметаболиты, модуляторы метаболизма, лекарственные средства, которые ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин или киназу p70S6 FK506) или ингибируют киназу p70S6, алкилирующие средства, антрациклины, алкалоиды барвинка, ингибиторы протеасом, агонисты GITR, ингибиторы протеинтирозинфосфатазы, ингибиторы протеинкиназы, онколитический вирус и/или другие виды иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство или лечение представляет собой трансплантацию костного мозга, абляционную Т-клеточную терапию с использованием химиотерапевтических средств, таких как флударабин, дистанционную лучевую терапию (XRT), циклофосфамид и/или терапию антителами.

[0250] В некоторых вариантах осуществления клетки, BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы и/или композиции, например клетки, экспрессирующие CAR, вводят в комбинации с другими сконструированными клетками, например, другими клетками, экспрессирующими CAR. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор киназы, например, ингибитор тирозинкиназы Брутона (Btk), например, ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист или агонист аденозинового пути или рецептора аденозина. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуномодулятор, такой как талидомид или производное талидомида (например, леналидомид). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор гамма-секретазы, такой как ингибитор гамма-секретазы, который ингибирует или уменьшает внутримембранное расщепление мишени гамма-секретазы, например, BCMA, на клетке (такой как опухолевая/раковая клетка). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия, средство или лечение представляет собой цитотоксическое или химиотерапевтическое средство, биологическую терапию (например, антитело, например, моноклональное антитело или клеточную терапию) или ингибитор (например, ингибитор

киназы).

[0251] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Иллюстративные химиотерапевтические средства включают антрациклин (например, доксорубицин, такой как липосомальный доксорубицин); алкалоид барвинка (например, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин); алкилирующее средство (например, циклофосфамид, декарбазин, мелфалан, ифосфамид, темозоломид); антитело иммунной клетки (например, алемтузумаб, гемтузумаб, ритуксимаб, тозитумомаб); антиметаболит (включая, например, антагонисты фолиевой кислоты, пиримидиновые аналоги, пуриновые аналоги и ингибиторы аденозиндезаминазы, такие как флударабин); агонист TNFR-родственного белка (GITR), индуцированного глюкокортикоидами TNFR; ингибитор протеасомы (например, аклациномицин A, глиотоксин или бортезомиб); иммуномодулятор, такой как талидомид или производное талидомида (например, леналидомид).

[0252] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия или лечение представляет собой клеточную терапию, например адоптивную клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия включает введение сконструированных клеток, например, дополнительной CAR-экспрессирующей клетки. В некоторых вариантах осуществления дополнительная сконструированная клетка представляет собой CAR-экспрессирующую клетку, которая экспрессирует такой же или другой рекомбинантный рецептор, как сконструированные клетки, представленные в настоящей заявке, например, анти-BCMA CAR-экспрессирующие клетки. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, например, CAR, экспрессируемый на дополнительной сконструированной клетке, распознает другой антиген и/или эпитоп. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, например, CAR, экспрессируемый на дополнительной сконструированной клетке, распознает другой эпитоп того же антигена, что и рекомбинантные рецепторы, описанные в настоящей заявке, например, BCMA. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, например, CAR, экспрессируемый на дополнительной сконструированной клетке, распознает другой антиген, например, другой опухолевый антиген или комбинацию антигенов. Например, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, например, CAR, экспрессируемый на дополнительной сконструированной клетке, нацеливается на раковые клетки, которые экспрессируют маркеры ранней стадии дифференцировки, например, раковые стволовые клетки, тогда как другие CAR-экспрессирующие клетки нацеливаются на раковые клетки, которые экспрессируют маркеры поздней стадии дифференцировки. В таких вариантах осуществления дополнительную сконструированную клетку вводят до, одновременно или после введения (например, инфузии) CAR-экспрессирующих клеток, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления дополнительная сконструированная клетка экспрессирует аллогенный CAR.

[0253] В некоторых вариантах осуществления конфигурации одной или более из

CAR молекул включают первичный внутриклеточный сигнальный домен и два или более, например 2, 3, 4, или 5 или более, костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления одна или более из CAR молекул может содержать такой же или другой первичный внутриклеточный сигнальный домен, такие же или другие костимулирующие сигнальные домены, или такое же количество или другое количество костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления одна или более CAR молекул могут быть сконфигурированы как расщепленный CAR, где одна из CAR молекул включает антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), тогда как другая CAR молекула включает антигенсвязывающий домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3 зета).

[0254] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой любую из клеток, сконструированных для экспрессии одного или более анти-BCMA рекомбинантного рецептора, и/или клеток, сконструированных для экспрессии дополнительных молекул, например, рекомбинантных рецепторов, например CAR, которые нацелены на другой антиген. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает любую из клеток или множества клеток, описанных в настоящей заявке, например, в Разделе III. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой клетку, сконструированную для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR, нацеленного на другой эпитоп и/или антиген, например, другой антиген, связанный с заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой клетку, сконструированную для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR, нацеленного на второй или дополнительный антиген, экспрессируемый при множественной миеломе, например, GPRC5D, CD38, CD138, CS-1, BAFF-R, TACI и/или FcRH5.

[0255] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуномодулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает иммуномодулирующее средство, которое может стимулировать, усиливать и/или иным образом повышать противоопухолевый иммунный ответ, например, противоопухолевый иммунный ответ от введенных сконструированных клеток, например, путем ингибирования иммуносупрессивной передачи сигналов или усиления передачи иммуностимулирующих сигналов. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой пептид, белок или малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления белок может представлять собой слитый белок или рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство связывается с иммунологической мишенью, такой как рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый на иммунных клетках, таких как Т-клетки, В-клетки или антигенпрезентирующие клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, слитый белок, малую молекулу или полипептид. В некоторых

вариантах осуществления рекомбинантные рецепторы, клетки и/или композиции вводят в комбинации с дополнительным средством, которое представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как моноклональное антитело.

[0256] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство блокирует, ингибирует или противодействует компоненту пути иммунной контрольной точки. Иммунная система имеет несколько ингибирующих путей, которые участвуют в поддержании аутотолерантности и модуляции иммунных ответов. Опухоли могут использовать определенные пути иммунных контрольных точек в качестве основного механизма иммунной резистентности, особенно против Т-клеток, которые специфичны в отношении опухолевых антигенов (Pardoll (2012) Nature Reviews Cancer 12:252-264), например, сконструированных клеток, таких как CAR-экспрессирующие клетки. Поскольку многие такие иммунные контрольные точки инициируются взаимодействиями лиганд-рецептор, они могут быть легко заблокированы антителами против лигандов и/или их рецепторов.

[0257] Таким образом, терапия молекулами-антагонистами, блокирующими пути иммунных контрольных точек, такими как малые молекулы, ингибиторы нуклеиновых кислот (например, РНКи) или молекулы антител, становится многообещающим направлением иммунотерапии рака и других заболеваний. В отличие от большинства противораковых средств, ингибиторы контрольных точек не обязательно нацелены непосредственно на опухолевые клетки, а скорее нацелены на рецепторы лимфоцитов или их лиганды, чтобы усилить эндогенную противоопухолевую активность иммунной системы.

[0258] Используемый в настоящей заявке термин «ингибитор контрольной точки иммунного ответа» относится к молекулам, которые полностью или частично восстанавливают, ингибируют, препятствуют или модулируют один или несколько белков контрольных точек. Белки контрольных точек регулируют активацию или функцию Т-клеток. Эти белки отвечают за костимулирующие или ингибирующие взаимодействия Т-клеточных ответов. Белки иммунных контрольных точек регулируют и поддерживают аутотолерантность, а также продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов. В некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить дополнительное средство, которое может усиливать или стимулировать иммунный ответ, например, иммунный ответ, вызванный сконструированными клетками, экспрессирующими BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композициями, представленными в настоящей заявке, против заболевания или состояния, например, рака, такого как любой из описанных в настоящей заявке.

[0259] Ингибиторы иммунных контрольных точек включают любое средство, которое блокирует или ингибирует статистически значимым образом ингибирующие пути иммунной системы. Такие ингибиторы могут включать низкомолекулярные ингибиторы или могут включать антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются и блокируют или ингибируют рецепторы иммунных контрольных точек,

лиганды и/или взаимодействие рецептор-лиганд. В некоторых вариантах осуществления модуляция, усиление и/или стимуляция определенных рецепторов могут преодолевать активность компонентов пути иммунных контрольных точек. Иллюстративные молекулы иммунных контрольных точек, которые могут быть нацелены на блокирование, ингибирование, модуляцию, усиление и/или стимуляцию, включают, но не ограничиваются этим, PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274, B7-H1), PDL2 (CD273, B7-DC), CTLA-4, LAG-3 (CD223), TIM-3, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), GITR (TNFRSF18, AITR), CD40, OX40 (CD134, TNFRSF4), CXCR2, опухоль-ассоциированные антигены (TAA), B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (относится к CD2 семейству молекул и экспрессируется на всех NK, γδ и CD8+ (αβ) Т-клетках памяти), CD160 (также указанный как BY55), CGEN-15049, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9, аденозин и рецептор трансформирующего фактора роста (TGFR; например, TGFR бета). Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, или другие связывающие белки, которые связываются с одной или более из любых из указанных молекул и блокируют или ингибируют, и/или усиливают или стимулируют их активность.

[0260] Иллюстративные ингибиторы иммунных контрольных точек включают Тремелимумаб (CTLA-4-блокирующее антитело, также известное как тицилимумаб, CP-675,206), анти-OX40, PD-L1 моноклональное антитело (Анти-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (блокатор PD-1), ниволумаб (анти-PD-1 антитело), CT-011 (анти-PD-1 антитело), BY55 моноклональное антитело, AMP224 (анти-PD-L1 антитело), BMS-936559 (анти-PD-L1 антитело), MPLDL3280A (анти-PD-L1 антитело), MSB0010718C (анти-PD-L1 антитело) и ипилимумаб (анти-CTLA-4 антитело, также известное как Yervoy®, MDX-010 и MDX-101). Иллюстративные иммуномодулирующие антитела включают, но не ограничиваются этим, Даклизумаб (Зенапакс), Бевацизумаб (Авастин®), Базиликсимаб, Ипилимумаб, Ниволумаб, пембролизумаб, MPDL3280A, Пидилизумаб (CT-011), MK-3475, BMS-936559, MPDL3280A (Атезолизумаб), тремелимумаб, IMP321, BMS-986016, LAG525, урелумаб, PF-05082566, TRX518, MK-4166, дацетузумаб (SGN-40), лукатумумаб (HCD122), SEA-CD40, CP-870, CP-893, MEDI6469, MEDI6383, MOXR0916, AMP-224, MSB0010718C (Авелумаб), MEDI4736, PDR001, rHIgM12B7, Улокуплумаб, BKT140, Варлилумаб (CDX-1127), ARGX-110, мгА271, лирилумаб (BMS-986015, IPH2101), IPH2201, ARGX-115, Эмастузумаб, CC-90002 и MNRP1685A или их антитело-связывающ фрагмент. Другие иллюстративные иммуномодуляторы включают, например, афутузумаб (доступный от Roche®); пегфилграстим (Neulasta®); леналидомид (CC-5013, Ревлимид®); талидомид (Таломид®), актимид (CC4047); и IRX-2 (смесь человеческих цитокинов, включая интерлейкин 1, интерлейкин 2 и интерферон гамма, CAS 951209-71-5, доступная от IRX Therapeutics).

[0261] Белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1) представляет собой белок контрольной точки иммунного ответа, который экспрессируется в В-клетках, NK-

клетках и Т-клетках (Shinohara et al., 1995, Genomics 23:704-6; Blank et al., 2007, Cancer Immunol Immunother 56:739-45; Finger et al., 1997, Gene 197:177-87; Pardoll (2012) Nature Reviews Cancer 12:252-264). Основная роль PD-1 заключается в ограничении активности Т-клеток в периферических тканях при воспалении в ответ на инфекцию, а также в ограничении аутоиммунитета. Экспрессия PD-1 индуцируется в активированных Т-клетках, и связывание PD-1 с одним из его эндогенных лигандов ингибирует активацию Т-клеток путем ингибирования стимулирующих киназ. PD-1 также блокирует «стоп-сигнал» TCR. PD-1 в высокой степени экспрессируется на клетках Treg и может усиливать их пролиферацию в присутствии лиганда (Pardoll (2012) Nature Reviews Cancer 12:252-264). Антитела против PD-1 использовались для лечения меланомы, немелкоклеточного рака легкого, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, колоректального рака, рака головы и шеи, тройного негативного рака молочной железы, лейкоза, лимфомы и почечно-клеточного рака (Topalian et al., 2012, N Engl J Med 366:2443-54; Lipson et al., 2013, Clin Cancer Res 19:462-8; Berger et al., 2008, Clin Cancer Res 14:3044-51; Gildener-Leapman et al., 2013, Oral Oncol 49:1089-96; Menzies & Long, 2013, Ther Adv Med Oncol 5:278-85). Иллюстративные анти-PD-1 антитела включают ниволумаб (Opdivo от BMS), пембролизумаб (Keytruda от Merck), пидилизумаб (CT-011 от Cure Tech), ламбролизумаб (MK-3475 от Merck) и AMP-224 (Merck), ниволумаб (также указанный как Opdivo, BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полностью человеческое IgG4 моноклональное антитело, которое специфически блокирует PD-1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с PD-1, описаны в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное IgG1k моноклональное антитело, который связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизированные анти-PD-1 моноклональные антитела описаны в WO2009/101611. Пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб и также указанный как Keytruda, MK03475; Merck) представляет собой гуманизированное IgG4 моноклональное антитело, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие гуманизированное анти-PD-1 антитела описаны в US 8354509 и WO2009/114335. Другие анти-PD-1 антитела включают AMP 514 (Amplimmune), среди прочих, например, анти-PD-1 антитела, описанные в US 8609089, US 2010028330, US 20120114649 и/или US 20150210769. AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342), представляет собой PD-L2 Fc-слитый растворимый рецептор, который блокирует взаимодействие между PD-1 и B7-H1.

[0262] PD-L1 (также известный как CD274 и B7-H1) и PD-L2 (также известный как CD273 и B7-DC) являются лигандами для PD-1, обнаруженными на активированных Т-клетках, В-клетках, миелоидных клетках, макрофагах и некоторых видах опухолевых клеток. Противоопухолевые терапии были сосредоточены на антителах против PD-L1. Комплекс PD-1 и PD-L1 ингибирует пролиферацию CD8+ Т-клеток и снижает иммунный ответ (Topalian et al., 2012, N Engl J Med 366:2443-54; Brahmer et al., 2012, N Engl J Med 366:2455-65). Анти-PD-L1 антитела использовались для лечения немелкоклеточного рака

легкого, меланомы, колоректального рака, почечно-клеточного рака, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака яичников, рака молочной железы и гематологических злокачественных новообразований (Brahmer et al., 2012, N Eng J Med 366:2455-65; Ott et al., 2013, Clin Cancer Res 19:5300-9; Radvanyi et al., 2013, Clin Cancer Res 19:5541; Menzies & Long, 2013, Ther Adv. Med Oncol 5:278-85; Berger et al., 2008, Clin Cancer Res 14:13044-51). Иллюстративные анти-PD-L1 антитела включают MDX-1105 (Medarex), MEDI4736 (Medimmune) MPDL3280A (Genentech), BMS-935559 (Bristol-Myers Squibb) и MSB0010718C. MEDI4736 (Medimmune) представляет собой человеческое моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1 и ингибирует взаимодействие лиганда с PD-1. MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой человеческое Fc-оптимизированное IgG1 моноклональное антитело, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие человеческие моноклональные антитела к PD-L1 описаны в патенте США № 7943743 и публикации США № 20120039906. Другие анти-PD-L1 связывающие агенты включают YW243.55.S70 (см. WO2010/077634) и MDX-1105 (также указан как BMS-936559, и, например, анти-PD-L1 связывающие агенты, описанные в WO2007/005874).

[0263] Цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген (CTLA-4), также известный как CD152, представляет собой коингибирующую молекулу, которая регулирует активацию Т-клеток. CTLA-4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется исключительно на Т-клетках. CTLA-4 ингибирует активацию Т-клеток и, как сообщается, ингибирует активность хелперных Т-клеток и усиливает регуляторную иммуносупрессивную активность Т-клеток. Хотя точный механизм действия CTLA-4 еще не изучен, было высказано предположение, что он ингибирует активацию Т-клеток, превосходя CD28 в связывании с CD80 и CD86, а также активно передавая ингибиторные сигналы Т-клеткам (Pardoll (2012)). Nature Reviews Рак 12:252-264). Антитела против CTLA-4 использовались в клинических испытаниях для лечения меланомы, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (Robert & Ghiringhelli, 2009, Oncologist 14:848-61; Ott et al. , 2013, Clin Cancer Res 19:5300; Weber, 2007, Oncologist 12:864-72; Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89). Важной особенностью анти-CTLA-4 является кинетика противоопухолевого эффекта с лаг-периодом до 6 месяцев после первоначального лечения, необходимого для физиологического ответа. В некоторых случаях опухоли могут увеличиваться в размерах после начала лечения до того, как станет заметно их уменьшение (Pardoll (2012) Nature Reviews Cancer 12:252-264). Примеры антител против CTLA-4 включают ипилимумаб (Bristol-Myers Squibb) и тремелимумаб (Pfizer). Ипилимумаб недавно получил одобрение FDA для лечения метастатической меланомы (Wada et al., 2013, J Transl Med 11:89).

[0264] Ген-3 активации лимфоцитов (LAG-3), также известный как CD223, является еще одним белком иммунной контрольной точки. LAG-3 связан с ингибированием активности лимфоцитов и в некоторых случаях с индукцией анергии лимфоцитов. LAG-3 экспрессируется на различных клетках иммунной системы, включая В-клетки, NK-клетки и дендритные клетки. LAG-3 является природным лигандом для рецептора MHC класса II,

который в значительной степени экспрессируется на инфильтрирующих меланому Т-клетках, включая те, которые обладают сильной иммуносупрессивной активностью. Примеры антител против LAG-3 включают BMS-986016 (Bristol-Myers Squib), которые представляют собой моноклональные антитела, нацеленные на LAG-3. IMP701 (Immutep) представляет собой антитело-антагонист LAG-3, а IMP731 (Immutep и GlaxoSmithKline) представляет собой истощающее антитело к LAG-3. Другие ингибиторы LAG-3 включают IMP321 (Immutep), который представляет собой рекомбинантный слитый белок растворимой части LAG-3 и Ig, который связывается с молекулами MHC класса II и активирует антигенпрезентирующие клетки (APC). Другие антитела описаны, например, в WO 2010/019570 и US 2015/0259420.

[0265] Было показано, что Т-клеточный домен иммуноглобулина и домен муцина-3 (TIM-3), первоначально идентифицированный на активированных клетках Th1, является негативным регулятором иммунного ответа. Блокада TIM-3 способствует опосредованному Т-клетками противоопухолевому иммунитету и обладает противоопухолевой активностью в ряде моделей опухолей у мышей. Комбинации блокады TIM-3 с другими иммунотерапевтическими средствами, такими как TSR-042, анти-CD137-антитела и др., могут быть аддитивными или синергетическими для усиления противоопухолевых эффектов. Экспрессия TIM-3 связана с рядом различных типов опухолей, включая меланому, NSCLC и рак почки, и, кроме того, было показано, что экспрессия внутриопухолевого TIM-3 коррелирует с неблагоприятным прогнозом для ряда типов опухолей, включая NSCLC, цервикальный рак и рак желудка. Блокада TIM-3 также представляет интерес для повышения иммунитета к ряду хронических вирусных заболеваний. Также было показано, что TIM-3 взаимодействует с рядом лигандов, включая галектин-9, фосфатидилсерин и HMGB1, хотя какие из них, если таковые имеются, имеют отношение к регуляции противоопухолевого ответа, в настоящее время неясно. В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител, малые молекулы или пептидные ингибиторы, нацеленные на TIM-3, могут связываться с IgV доменом TIM-3 для ингибирования взаимодействия с его лигандами. Иллюстративные антитела и пептиды, которые ингибируют TIM-3, описаны в US 2015/0218274, WO2013/006490 и US 2010/0247521. Другие анти-TIM-3 антитела включают гуманизированное варианты RMT3-23 (Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551) и клон 8B.2C12 (Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541). Биспецифические антитела, которые ингибируют TIM-3 и PD-1, описаны в US 2013/0156774.

[0266] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор CEACAM (например, ингибитор CEACAM-1, CEACAM-3, и/или CEACAM-5). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CEACAM представляет собой молекулу анти-CEACAM антитела. Иллюстративные анти-CEACAM-1 антитела описаны в WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 и WO 2014/022332, например, моноклональное антитело 34B1, 26H7 и 5F4; или его рекомбинантная форма, описанные, например, в US 2004/0047858, US 7,132,255 и WO 99/052552. В некоторых

вариантах осуществления анти-CEACAM антитело связывается с CEACAM-5, как описано, например, Zheng et al. PLoS One. (2011) 6(6): e21146), или перекрестно реагирует с CEACAM-1 и CEACAM-5, как описано, например, в WO 2013/054331 и US 2014/0271618.

[0267] 4-1BB, также известный как CD137, представляет собой трансмембранный гликопротеин, относящийся к суперсемейству TNFR. 4-1BB рецепторы присутствуют на активированных Т-клетках и В-клетках и моноцитах. Иллюстративное анти-4-1BB антитело представляет собой урелумаб (BMS-663513), которое обладает потенциальной иммуностимулирующей и противоопухолевой активностью.

[0268] Член 4 (TNFRSF4) суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, также известный как OX40 и CD134, является еще одним членом суперсемейства TNFR. OX40 не экспрессируется конститутивно на покоящихся наивных Т-клетках и действует как вторичная костимулирующая молекула иммунной контрольной точки. Примерами антител против OX40 являются MEDI6469 и MOXR0916 (RG7888, Genentech).

[0269] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает молекулу, которая уменьшает популяцию регуляторных Т-клеток (Treg). Способы, которые уменьшают количество (например, истощают) Treg-клеток, известны в данной области и включают, например, деплецию CD25, введение циклофосфамида и модулирование функции гена семейства TNFR (GITR), индуцированных глюкокортикоидами. GITR является членом суперсемейства TNFR, который активируется на активированных Т-клетках, что укрепляет иммунную систему. Уменьшение количества Treg-клеток у субъекта перед аферезом или перед введением сконструированных клеток, например, клеток, экспрессирующих CAR, может уменьшить количество нежелательных иммунных клеток (например, Treg) в микроокружении опухоли и уменьшить риск рецидива у субъекта. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает молекулу, нацеленную на GITR и/или модулирующую функции GITR, такую как агонист GITR и/или антитело к GITR, которое истощает регуляторные Т-клетки (Treg). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления молекула, нацеленная на GITR, и/или молекула, модулирующая функцию GITR (например, агонист GITR и/или Treg-истощающие антитела к GITR), вводят перед сконструированными клетками, например, клетками, экспрессирующими CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления агонист GITR можно вводить перед аферезом клеток. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят субъекту перед введением (например, инфузией или повторной инфузией) сконструированных клеток, например, клеток, экспрессирующих CAR, или перед аферезом клеток. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид и анти-GITR антитело вводят субъекту перед введением (например, инфузией или повторной инфузией) сконструированных клеток, например, клеток, экспрессирующих CAR, или перед аферезом клеток.

[0270] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство является агонистом GITR. Иллюстративные агонисты GITR включают, например, слитые белки GITR и анти-GITR антитела (например, бивалентные анти-GITR антитела), такие как,

например, GITR слитый белок, описанный в патенте США № 6111090, европейском патенте № 090505B 1, патенте США № 8586023, публикациях PCT №№: WO 2010/003118 и 2011/090754, или анти-GITR антитело, описанное, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B 1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, публикации PCT № WO 2011/028683, публикации PCT № WO 2013/039954, публикации PCT № WO2005/007190, публикации PCT № WO 2007/133822, публикации PCT № WO2005/055808, публикации PCT № WO 99/40196, публикации PCT № WO 2001/03720, публикации PCT № WO99/20758, публикации PCT № WO2006/083289, публикации PCT № WO 2005/115451, патенте США № 7618632 и публикации PCT № WO 2011/051726, каждый из этих документов включен посредством ссылки во всей полноте. Иллюстративное анти-GITR антитело представляет собой TRX518.

[0271] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство повышает инфильтрацию опухоли или трансмиграцию вводимых клеток, например CAR-экспрессирующих клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления дополнительное средство стимулирует CD40, такой как CD40L, например, рекомбинантный человеческий CD40L. Кластер дифференциации 40 (CD40) также является членом суперсемейства TNFR. CD40 представляет собой костимулирующий белок, присутствующий на антигенпрезентирующих клетках, и опосредует различные иммунные и воспалительные ответы. CD40 также экспрессируется на некоторых злокачественных опухолях, где он промотирует пролиферацию. Иллюстративными анти-CD40 антителами являются дацетузумаб (SGN-40), лукатумумаб (Novartis, антагонист), SEA-CD40 (Seattle Genetics) и CP-870.893. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство, которое повышает инфильтрацию опухоли, включает ингибитор тирозинкиназы сунитниб, гепараназу и/или хемокиновые рецепторы, такие как CCR2, CCR4 и CCR7.

[0272] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает талидомидные лекарственные средства или их аналоги и/или их производные, такие как леналидомид, помалидомид или апремиласт. См, например, Bertilaccio et al., Blood (2013) 122:4171, Otahal et al., Oncoimmunology (2016) 5(4):e1115940; Fecteau et al., Blood (2014) 124(10):1637-1644 и Kuramitsu et al., Cancer Gene Therapy (2015) 22:487-495). Леналидомид ((RS)-3-(4-Амино-1-оксо-1,3-дигидро-2H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион; также известный как Ревлимид) является синтетическим производным талидомида и обладает множественными иммуномодулирующими эффектами, включая усиление образования иммунных синапсов между Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками (APC). Например, в некоторых случаях леналидомид модулирует ответы Т-клеток и приводит к увеличению продукции интерлейкина (IL)-2 в CD4+ и CD8+ Т-клетках, индуцирует сдвиг ответов Т-хелперов (Th) с Th2 на Th1, ингибирует экспансию регуляторной субпопуляции Т-клеток (Treg) и улучшает функционирование иммунологических синапсов при фолликулярной лимфоме и хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) (Otahal et al., Oncoimmunology (2016) 5(4):e1115940). Леналидомид также обладает непосредственной

противоопухолевой активностью у пациентов с множественной миеломой (ММ) и непосредственно или опосредованно модулирует выживаемость опухолевых клеток CLL, воздействуя на поддерживающие клетки, такие как клетки-няни, присутствующие в микроокружении лимфоидных тканей. Леналидомид также может усиливать пролиферацию Т-клеток и продукцию интерферона-γ в ответ на активацию Т-клеток посредством лигирования CD3 или опосредованной дендритными клетками активации. Леналидомид также может индуцировать злокачественные В-клетки для экспрессии более высоких уровней иммуностимулирующих молекул, таких как CD80, CD86, HLA-DR, CD95 и CD40 (Fecteau et al., Blood (2014) 124(10):1637-1644). В некоторых вариантах осуществления леналидомид вводят при дозе от около 1 мг до около 20 мг ежедневно, например, от около 1 мг до около 10 мг, от около 2,5 мг до около 7,5 мг, от около 5 мг до около 15 мг, например, около 5 мг, 10 мг, 15 мг или 20 мг ежедневно. В некоторых вариантах осуществления леналидомид вводят при дозе от около 10 мкг/кг до 5 мг/кг, например, от около 100 мкг/кг до около 2 мг/кг, от около 200 мкг/кг до около 1 мг/кг, от около 400 мкг/кг до около 600 мкг/кг, например, около 500 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят при дозе около 350-550 мг/м^2 (например, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м^2), например, внутривенно. В некоторых вариантах осуществления леналидомид вводят при низкой дозе.

[0273] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор В-клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой один или более ингибиторов В-клеток, выбранных из ингибиторов CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, CD79a, CD79b, CD179b, FLT-3 или ROR1, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления ингибитор В-клеток представляет собой антитело (например, моно- или биспецифическое антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой сконструированную клетку, экспрессирующую рекомбинантные рецепторы, которые нацелены на В-клеточные мишени, например, CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD123, CD79a, CD79b, CD179b, FLT-3 или ROR1.

[0274] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор CD20, например, анти-CD20 антитело (например, анти-CD20 моно- или биспецифические антитело) или его фрагмент. Иллюстративные анти-CD20 антитела включают, но не ограничиваются этим, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб (также известный как GA101 или RO5072759), велтузумаб, обинутузумаб, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), окаратузумаб (также известный как AME-133v или оказатузумаб) и Pro131921 (Genentech). См, например, Lim et al. Haematologica. (2010) 95(1):135-43. В некоторых вариантах осуществления анти-CD20 антитело включает ритуксимаб. Ритуксимаб представляет собой химерное мышиное/человеческое моноклональное антитело IgG1 каппа, которое связывается с CD20 и вызывает цитолиз CD20-экспрессирующей клетки. В некоторых вариантах осуществления дополнительное

средство включает ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD20 представляет собой малую молекулу.

[0272] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор CD22, например, анти-CD22 антитело (например, анти-CD22 моно- или биспецифические антитело) или его фрагмент. Иллюстративные анти-CD22 антитела включают эпратузумаб и RFB4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD22 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноспецифическое антитело, необязательно конъюгированное с вторым средством, таким как химиотерапевтическое средство. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой конъюгат анти-CD22 моноклональное антитело-MMAE (например, DCDT2980S). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv из анти-CD22 антитела, например, scFv антитела RFB4. В некоторых вариантах осуществления scFv слит с экзотоксином-A Pseudomonas или его фрагментом (например, BL22). В некоторых вариантах осуществления scFv слит с экзотоксином-A Pseudomonas (например, моксетумомаб пасудотокс) или его фрагментом (например, 38 кДа фрагментом). В некоторых вариантах осуществления анти-CD22 антитело представляет собой анти-CD19/CD22 биспецифическое антитело, необязательно конъюгированное с токсином. Например, в некоторых вариантах осуществления анти-CD22 антитело включает анти-CD19/CD22 биспецифическую часть (например, два scFv лиганда, распознающих человеческие CD19 и CD22), необязательно связанную с дифтерийным токсином (DT) или его частью, например, первыми 389 аминокислотами дифтерийного токсина (DT), DT 390, например, лиганд-направленного токсина, такого как DT2219ARL). В некоторых вариантах осуществления биспецифическая часть (например, анти-CD 19/анти-CD22) связана с токсином, таким как дегликозилированная цепь рицина A (например, Комботокс).

[0276] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой цитокин или представляет собой средство, которое индуцирует повышенную экспрессию цитокина в микроокружении опухоли. Цитокины выполняют важные функции, связанные с экспансией, дифференцировкой, выживанием и гомеостазом Т-клеток. Цитокины, которые можно вводить субъекту, получающему сконструированные клетки, экспрессирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиции, представленные в настоящей заявке, включают один или несколько из IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления вводимый цитокин представляет собой IL-7, IL-15 или IL-21 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления введение цитокина субъекту, который имеет субоптимальный ответ на введение сконструированных клеток, например, CAR-экспрессирующих клеток, улучшает эффективность и/или противоопухолевую активность вводимых клеток, например, CAR-экспрессирующих клеток.

[0277] Под «цитокином» подразумевается общий термин для белков, высвобождаемых одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В число цитокинов входят гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионил гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиероидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста гепатоцитов; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; мюллеров ингибирующий фактор; мышиный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета- и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и kit лиганд (KL). В контексте настоящей заявки термин “цитокин” включает белки из природных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные эквиваленты цитокинов с природной последовательностью. Например, иммуномодулирующее средство представляет собой цитокин, и цитокин представляет собой IL-4, TNF-α, GM-CSF или IL-2.

[0278] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает полипептид интерлейкина-15 (IL-15), полипептид рецептора альфа интерлейкина-15 (IL-15Rα) или их комбинацию, например hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 представляет собой гетеродимерный нековалентный комплекс IL-15 и IL-15Rα. hetIL-15 описан, например, в U.S. 8124084, U.S. 2012/0177598, U.S. 2009/0082299, U.S. 2012/0141413 и U.S. 2011/0081311. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство может содержать один или более цитокинов. Например, интерлейкин может включать инъекцию лейкоцитарного интерлейкина (Multikine), которая представляет собой комбинацию природных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство представляет собой агонист Toll-подобного рецептора (TLR), адъювант или цитокин.

[0279] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, которое облегчает или нейтрализует один или более токсических или побочных эффектов, связанных с клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство выбрано из стероида (например, кортикостероида), ингибитора TNFα и ингибитора IL-6 или передачи сигналов IL-6.

Примером ингибитора TNFα является молекула анти-TNFα антитела, такая как, ифликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол и голимумаб. Другим примером ингибитора TNFα является гибридный белок, такой как этанерцепт. Низкомолекулярные ингибиторы TNFα включают, но не ограничиваются этим, производные ксантина (например, пентоксифиллин) и бупропион. Примером ингибитора IL-6 является молекула антитела против рецептора IL-6 (анти-IL-6R), такая как тоцилизумаб, сарилумаб, элсилимомаб, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 и FM101. В некоторых вариантах осуществления молекула анти-IL-6R антитела представляет собой тоцилизумаб. В некоторых аспектах тоцилизумаб блокирует взаимодействие между интерлейкином-6 (IL-6), воспалительным цитокином, и его рецептором IL-6 (IL-6R). В некоторых аспектах ингибитор IL-6 представляет собой анти-IL-6 антитело. В некоторых аспектах типичным анти-IL-6 антителом является силтуксимаб. В некоторых аспектах силтуксимаб блокирует передачу сигналов IL-6 путем связывания самого IL-6 и предотвращения активации иммунных эффекторных клеток посредством IL-6.

[0280] В некоторых аспектах дополнительное средство, которое облегчает или нейтрализует один или более токсических или побочных эффектов, связанных с клеточной терапией, включает анти-GM-CSF средство, такое как лензилумаб, которое представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, которое нейтрализует GM-CSF (Sterner et al., Blood (2018) 132 (Supplement 1): 961; Sterner et al., Blood. 2019;133(7):697-709); деплетирующее Т-клетки антитело алемтузумаб, антитимоцитарный глобулин (ATG), циклофосфамид, руксолитиниб или ибрутиниб (Borrega et al., HemaSphere. April 2019; 3(2):191).

[0281] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист IL-1R, такой как анакинра. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой анакинру. В некоторых аспектах анакинра вводят субъекту, который имеет тяжелый CRS, который не отвечает на лечение тоцилизумабом и кортикостероидами. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой анакинру, и иллюстративная доза для анакинры находится на уровне или около 25 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 125 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг ежедневно, или в любом диапазоне, определяемым любыми из вышеперечисленных, ежедневно, например, 100 мг ежедневно. В некоторых аспектах иллюстративная ежедневная доза анакинры находится на уровне или около 100 мг. В некоторых аспектах иллюстративная ежедневная доза анакинры находится на уровне или около 200 мг. В некоторых аспектах анакинра вводят подкожно. В некоторых аспектах анакинру вводят вплоть до устранения CRS, например, при ежедневной дозе 100 мг, вводимой п/к. В некоторых аспектах анакинру вводят вплоть до устранения CRS, например, при ежедневной дозе 200 мг, вводимой п/к, например, разделенной на две 100 мг дозы. В некоторых аспектах, если субъект демонстрирует тяжелый CRS, а в некоторых случаях в комбинации с неврологическими явлениями или

MAS/HLH, анакинру вводят при дозе 100 мг два раза в день (например, через каждые 12 часов) п/к до устранения неблагоприятных событий, такие как CRS, неврологических явлений и/или MAS/HLH.

[0282] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой модулятор уровней аденозина и/или компонента пути аденозина. Аденозин может действовать как иммуномодулирующий агент в организме. Например, аденозин и некоторые аналоги аденозина, которые неселективно активируют подтипы аденозиновых рецепторов, снижают продукцию нейтрофилами продуктов воспалительного окисления (Cronstein et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 451:291, 1985; Roberts et al., Biochem. J ., 227:669, 1985; Schrier et al., J. Immunol., 137:3284, 1986; Cronstein et al., Clinical Immunol. Immunopath, 42:76, 1987). В некоторых случаях концентрация внеклеточного аденозина или аналогов аденозина может увеличиваться в определенных средах, например, в микроокружении опухоли (TME). В некоторых случаях передача сигналов аденозина или аналога аденозина зависит от гипоксии или факторов, участвующих в гипоксии или ее регуляции, например, гипоксия-индуцируемого фактора (HIF). В некоторых вариантах осуществления усиление передачи сигналов аденозина может повышать внутриклеточный цАМФ и цАМФ-зависимую протеинкиназу, что приводит к ингибированию продукции провоспалительных цитокинов и может приводить к синтезу иммуносупрессивных молекул и развитию Treg (Sitkovsky et al., Cancer Immunol Res (2014) 2(7):598-605). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может снижать или реверсировать иммуносупрессивные эффекты аденозина, аналогов аденозина и/или передачу сигналов аденозина. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может уменьшать или реверсировать вызываемую гипоксией иммуносупрессию A2-аденосинергических Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство выбрано из числа антагонистов рецепторов аденозина, внеклеточных агентов, разрушающих аденозин, ингибиторов образования аденозина эктоферментами CD39/CD73 и ингибиторов передачи сигналов гипоксия-HIF-1α. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист или агонист аденозинового рецептора.

[0283] Ингибирование или снижение уровня внеклеточного аденозина или аденозинового рецептора за счет ингибитора внеклеточного аденозина (такого как средство, которое предотвращает образование, разрушает, делает неактивным и/или снижает внеклеточный аденозин) и/или ингибитора рецептора аденозина (такого как антагонист рецептора аденозина) может усиливать иммунный ответ, такой как ответ, опосредованный макрофагами, нейтрофилами, гранулоцитами, дендритными клетками, Т- и/или В-клетками. Кроме того, ингибиторы Gs-белок-опосредованного цАМФ-зависимого внутриклеточного пути и ингибиторы опосредованного Gi-белком, стимулируемым аденозиновым рецептором, внутриклеточного пути, также могут усиливать острое и хроническое воспаление.

[0284] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство

представляет собой антагонист или агонист рецептора аденозина, например антагонист или агонист одного или нескольких рецепторов аденозина A2a, A2b, A1 и A3. A1 и A3 ингибируют, а A2a и A2b стимулируют, соответственно, активность аденилатциклазы. Некоторые аденозиновые рецепторы, такие как A2a, A2b и A3, могут подавлять или ослаблять иммунный ответ при воспалении. Таким образом, антагонистическое действие в отношении иммуносупрессивных аденозиновых рецепторов может усиливать, стимулировать или повышать иммунный ответ, например, иммунный ответ от введенных клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство ингибирует продукцию внеклеточного аденозина и запускаемую аденозином передачу сигналов через аденозиновые рецепторы. Например, усиление иммунного ответа, локальное воспаление ткани и целевое разрушение ткани можно усилить путем ингибирования или уменьшения аденозин-продуцирующей локальной тканевой гипоксии; путем деградации (или приведения в неактивное состояние) аккумулированного внеклеточного аденозина; путем предотвращения или уменьшения экспрессии аденозиновых рецепторов на иммунных клетках; и/или путем ингибирования/противодействия передаче сигналов аденозиновыми лигандами через аденозиновые рецепторы.

[0285] Антагонистом является любое вещество, которое имеет тенденцию сводить на нет действие другого, как агент, который связывается с клеточным рецептором, не вызывая биологической реакции. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой химическое соединение, которое является антагонистом рецептора аденозина, такого как рецептор A2a, A2b или A3. В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой пептид или пептидомиметик, который связывается с аденозиновым рецептором, но не запускает зависимый от белка Gi внутриклеточный путь. Иллюстративные антагонисты описаны в патентах США №№ 5565566; 5545627, 5981524; 5861405; 6066642; 6326390; 5670501; 6117998; 6232297; 5786360; 5,424,297; 6313131, 5504090; и 6322771.

[0286] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист рецептора A2 (A2R), такой как антагонист A2a. Примеры антагонистов A2R включают KW6002 (истрадефилин), SCH58261, кофеин, параксантин, 3,7-диметил-1-пропаргилксантин (DMPX), 8-(м-хлорстирил)кофеин (CSC), MSX-2, MSX-3, MSX-4, CGS-15943, ZM-241385, SCH-442416, преладенант, випаденант (BII014), V2006, ST-1535, SYN-115, PSB-1115, ZM241365, FSPTP и ингибирующую нуклеиновую кислоту, направленную на экспрессию A2R, например миРНК или кшРНК, или любые антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, нацеленные на A2R. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антагонист A2R, описанный, например, в Ohta et al., Proc Natl Acad Sci U S A (2006) 103:13132-13137; Jin et al., Cancer Res. (2010) 70(6):2245-2255; Leone et al., Computational and Structural Biotechnology Journal (2015) 13:265-272; Beavis et al., Proc Natl Acad Sci U S A (2013) 110:14711-14716; и Pinna, A., Expert Opin Investig Drugs (2009) 18:1619-1631; Sitkovsky et al., Cancer Immunol Res

(2014) 2(7):598-605; US 8080554; US 8716301; US 20140056922; WO2008/147482; US 8883500; US 20140377240; WO02/055083; US 7141575; US 7405219; US 8883500; US 8450329 и US 8987279).

[0287] В некоторых вариантах осуществления антагонист представляет собой антисмысловую молекулу, молекулу ингибирующей нуклеиновой кислоты (например, малую ингибирующую РНК (миРНК)) или каталитическую молекулу нуклеиновой кислоты (например, рибозим), которая специфически связывается с мРНК, кодирующей аденозиновый рецептор. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая молекула, молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты или каталитическая молекула нуклеиновой кислоты связывает нуклеиновые кислоты, кодирующие A2a, A2b или A3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая молекула, молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты или каталитическая нуклеиновая кислота нацелена на биохимические пути, расположенные ниже рецептора аденозина. Например, антисмысловая молекула или каталитическая нуклеиновая кислота могут ингибировать фермент, участвующий в Gs белок- или Gi белок-зависимом внутриклеточном пути. В некоторых вариантах реализации дополнительный агент включает доминантно-негативную мутантную форму рецептора аденозина, такую как A2a, A2b или A3.

[0288] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство, которое ингибирует внеклеточный аденозин, включает средства, которые делают внеклеточный аденозин нефункциональным (или снижают такую функцию), такие как вещество, которое модифицирует структуру аденозина для ингибирования способности аденозина передавать сигнал через аденозиновые рецепторы. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой внеклеточный аденозин-генерирующий или аденозин-разрушающий фермент, его модифицированную форму или его модулятор. Например, в некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой фермент (например, аденозиндезаминазу) или другую каталитическую молекулу, которая селективно связывает и разрушает аденозин, тем самым устраняя или значительно снижая способность эндогенно образованного аденозина передавать сигнал через аденозиновые рецепторы и прекращать воспаление.

[0289] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой аденозиндезаминазу (ADA) или ее модифицированную форму, например рекомбинантную ADA и/или модифицированную полиэтиленгликолем ADA (ADA-PEG), которая может ингибировать локальное накопление внеклеточного аденозина в тканях. ADA-PEG используется для лечения пациентов с ADA SCID (Hershfield (1995) Hum Mutat. 5:107). В некоторых вариантах осуществления средство, которое ингибирует внеклеточный аденозин, включает средства, которые предотвращают или уменьшают образование внеклеточного аденозина и/или предотвращают или уменьшают аккумуляцию внеклеточного аденозина, тем самым отменяя или существенно уменьшая иммуносупрессивные эффекты аденозина. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство специфически ингибирует ферменты и белки, участвующие в

регуляции синтеза и/или секреции провоспалительных молекул, включая модуляторы ядерных факторов транскрипции. Подавление экспрессии аденозиновых рецепторов или экспрессии Gs белок- или Gi белок-зависимого внутриклеточного пути или цАМФ-зависимого внутриклеточного пути может привести к повышению/усилению иммунного ответа.

[0290] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может направленно воздействовать на эктоферменты, которые генерируют или продуцируют внеклеточный аденозин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство нацелено на эктоферменты CD39 и CD73, которые функционируют в тандеме для выработки внеклеточного аденозина. CD39 (также называемый эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазой) превращает внеклеточный АТФ (или АДФ) в 5'АМФ. Впоследствии CD73 (также называемый 5'нуклеотидазой) превращает 5'АМФ в аденозин. Активность CD39 обратима под действием NDP-киназы и аденилаткиназы, тогда как активность CD73 необратима. CD39 и CD73 экспрессируются на опухолевых стромальных клетках, включая эндотелиальные клетки и Treg, а также на многих раковых клетках. Например, экспрессия CD39 и CD73 на эндотелиальных клетках повышается в гипоксических условиях микроокружения опухоли. Гипоксия опухоли может быть результатом неадекватного кровоснабжения и дезорганизованной сосудистой сети опухоли, нарушающей доставку кислорода (Carroll and Ashcroft (2005), Expert. Rev. Mol. Med. 7(6):1-16). Гипоксия также ингибирует аденилаткиназу (АК), которая превращает аденозин в АМФ, что приводит к очень высокой внеклеточной концентрации аденозина. Таким образом, аденозин высвобождается в высоких концентрациях в ответ на гипоксию, которая является состоянием, которое часто возникает в микроокружении опухоли (TME), внутри или вокруг солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой одно или несколько антител к CD39 или их антигенсвязывающих фрагментов, антител к CD73 или их антигенсвязывающих фрагментов, например, MEDI9447 или TY/23, α-β-метилен-аденозин дифосфат (ADP), ARL 67156, POM-3, IPH52 (см., например, Allard et al. Clin Cancer Res (2013) 19(20):5626-5635; Hausler et al., Am J Transl Res (2014) 6(2):129-139; Zhang, B., Cancer Res. (2010) 70(16):6407-6411).

[0291] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор передачи сигналов гипоксия-индуцируемого фактора 1 альфа (HIF-1α). Иллюстративные ингибиторы HIF-1α включают дигоксин, акрифлавин, сиртуин-7 и генетеспиб.

[0292] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает ингибитор протеинтирозинфосфатазы, например ингибитор протеинтирозинфосфатазы, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-1, например, ингибитор SHP-1, описанный в настоящей заявке, такой как, например, стибоглюконат натрия. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеинтирозинфосфатазы представляет

собой ингибитор SHP-2, например, ингибитор SHP-2, описанный в настоящей заявке.

[0293] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор киназы. Ингибиторы киназы, такие как ингибитор киназы CDK4, ингибитор киназы BTK, ингибитор киназы MNK или ингибитор киназы DGK, могут регулировать конститутивно активные пути выживания, существующие в опухолевых клетках, и/или модулировать функцию иммунных клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTK), например, ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, ингибитор CDK4/6. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, такой как, например, рапамицин, аналог рапамицина, OSI-027. Ингибитор mTOR может представлять собой, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK или двойной ингибитор PI3K/mTOR. В некоторых вариантах осуществления другие иллюстративные ингибиторы киназы включают ингибитор AKT перифозин, ингибитор mTOR темсиролимус, ингибиторы киназы Src дазатиниб и фостаматиниб, ингибиторы JAK2 пакритиниб и руксолитиниб, ингибиторы PKCβ энзастаурин и бриостатин и ингибитор AAK алисертиб.

[0294] В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, выбранный из ибрутиниба (PCI- 32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; и LFM-A13. В некоторых вариантах осуществления ингибитор BTK не снижает и не ингибируют киназную активность интерлейкин-2-индуцируемой киназы (ITK) и выбран из GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; и LFM-A13.

[0295] В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, например ибрутиниб (1-[(3R)-3-[4-Амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-ой; также известный как PCI-32765). В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, например, ибрутиниб (PCI-32765), и ибрутиниб вводят при дозе около 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг (например, 250 мг, 420 мг или 560 мг) ежедневно в течение некоторого периода времени, например, ежедневно в течение 21-дневного цикла или ежедневно в течение 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления осуществляют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более циклов введения ибрутиниба. В некоторых вариантах осуществления ингибитор BTK представляет собой ингибитор BTK, описанный в международной заявке WO 2015/079417.

[0296] В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор PI3K. PI3K занимает центральное место в пути PI3K/Akt/mTOR, участвующем в

регуляции клеточного цикла и выживании лимфомы. Иллюстративный ингибитор PI3K включает иделалисиб (ингибитор PI3Kδ). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иделалисиб и ритуксимаб.

[0297] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR). В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из темсиролимуса; ридафоролимуса (также известного как AP23573 и MK8669); эверолимуса (RAD001); рапамицина (AY22989); симапимода; AZD8055; PF04691502; SF1126; и XL765. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), такой как вемурафениб, дабрафениб и траметиниб.

[0298] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, которое регулирует про- или антиапоптотические белки. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает ингибитор B-клеточной лимфомы 2 (BCL-2) (например, венетоклакс, также называемый ABT-199 или GDC-0199; или ABT-737). Венетоклакс представляет собой малую молекулу (4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметил-1-циклогексен-1-ил]метил}-1-пиперазинил)-N-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2H-пиран-4-илметил)амино]фенил}сульфонил)-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид), который ингибирует антиапоптотический белок, BCL-2. Другие средства, которые модулируют про- или антиапоптотический белок, включают ингибитор BCL-2 ABT-737, навитоклакс (ABT-263); ингибитор миРНК Mcl-1 или Mcl-1 ретиноид N-(4-гидроксифенил)ретинамид (4-HPR) для максимальной эффективности. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство обеспечивает проапоптотические стимулы, такие как рекомбинантный фактор некроза опухоли-зависимый апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL), который может активировать путь апоптоза путем связывания с TRAIL рецепторами смерти DR-4 и DR-5 на поверхности опухолевых клеток, или антитела-агонисты TRAIL-R2.

[0299] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). IDO представляет собой фермент, катализирующий расщепление аминокислоты L-триптофана до кинуренина. Многие виды рака гиперэкспрессируют IDO, например, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, шейки матки, желудка, яичников, головы и легких. Плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), макрофаги и дендритные клетки (DC) могут экспрессировать IDO. В некоторых аспектах снижение уровня L-триптофана (например, катализируемое IDO) приводит к иммуносупрессивной среде за счет индукции анергии и апоптоза Т-клеток. Таким образом, в некоторых аспектах ингибитор IDO может повышать эффективность сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиций, описанных в настоящей заявке, например, путем снижения супрессии или гибели введенной CAR-экспрессирующей клетки. Примеры ингибиторов IDO включают, но не ограничиваются этим, 1-метилтриптофан, индоксимод

(New Link Genetics) (см., например, идентификационные номера клинических испытаний NCT01191216; NCT01792050) и INCB024360 (Incyte Corp.) (см., например, идентификационные номера клинических испытаний NCT01604889; NCT01685255).

[0300] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает цитотоксическое средство, например, CPX-351 (Celator Pharmaceuticals), цитарабин, даунорубицин, восароксин (Sunesis Pharmaceuticals), сапацитабин (Cyclacel Pharmaceuticals), идарубицин или митоксантрон. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает гипометилирующее средство, например, ингибитор ДНК-метилтрансферазы, например, азацитидин или децитабин.

[0301] В другом варианте осуществления дополнительная терапия представляет собой трансплантацию, например, аллогенную трансплантацию стволовых клеток.

[0302] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой онколитический вирус. В некоторых вариантах осуществления онколитические вирусы способны избирательно реплицироваться и вызывать гибель или замедление роста раковой клетки. В некоторых случаях онколитические вирусы не действуют или оказывают минимальное влияние на нераковые клетки. Онколитический вирус включает, но не ограничивается этим, онколитический аденовирус, онколитический вирус простого герпеса, онколитический ретровирус, онколитический парвовирус, онколитический вирус коровьей оспы, онколитический вирус Sinbis, онколитический вирус гриппа или онколитический РНК-вирус (например, онколитический реовирус, онколитический вирус болезни Ньюкасла (NDV), онколитический вирус кори или онколитический вирус везикулярного стоматита (VSV)).

[0303] Другие примеры комбинированной терапии, лечения и/или средств включают антиаллергенные средства, противорвотные средства, анальгетики и дополнительные терапии. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство включает цитопротекторные средства, такие как нейропротекторы, поглотители свободных радикалов, кардиопротекторы, нейтрализаторы экстравазации антрациклина и питательные вещества.

[0304] В некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в качестве дополнительного средства, конъюгировано или иным образом связано с терапевтическим средством, например, химиотерапевтическим средством (например, цитоксаном, флударабином, ингибитором гистондеацетилазы, деметилирующим средством, пептидной вакциной, противоопухолевым антибиотиком, ингибитором тирозинкиназы, алкилирующим средством, антимикротрубочковым или антимитотическим средством), противоаллергическим средством, средством от тошноты (или противорвотным средством), болеутоляющим средством или цитопротекторным средством, описанными в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

[0305] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может модулировать, ингибировать или стимулировать определенные факторы на уровне ДНК,

РНК или белка для усиления или повышения эффективности сконструированных клеток, экспрессирующих BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и/или композиций, представленных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство может модулировать факторы на уровне нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, внутри вводимых клеток, например, клеток, сконструированных для экспрессии рекомбинантных рецепторов, например CAR. В некоторых вариантах осуществления ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например миРНК или кшРНК, или кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками (CRISPR), нуклеазу на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу цинковых пальцев (ZFN), можно использовать для ингибирования экспрессии ингибиторной молекулы в сконструированной клетке, например, в клетке, экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой кшРНК. В некоторых вариантах осуществления ингибирующая молекула ингибируется в сконструированной клетке, например, в клетке, экспрессирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, функцию Т-клеток, функционально связана с промотором, например HI- или U6-происходящим промотором, таким образом, что молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, экспрессируется в сконструированной клетке, например, в клетке, экспрессирующей CAR. См., например, Brummelkamp TR, et al. (2002) Science 296: 550- 553; Miyagishi M, et al. (2002) Nat. Biotechnol. 19: 497-500.

[0306] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство способно нарушать ген, кодирующий ингибиторную молекулу, такую как любые описанные в настоящей заявке ингибиторы иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой делецию, например, делецию всего гена, экзона или области, и/или замену экзогенной последовательностью, и/или мутацию, например, сдвиг рамки считывания или миссенс-мутацию, внутри гена, обычно внутри экзона гена. В некоторых вариантах осуществления нарушение приводит к включению преждевременного стоп-кодона в ген, так что ингибиторная молекула не экспрессируется или не экспрессируется в форме, которая способна экспрессироваться на поверхности клеток и/или способна опосредовать клеточную сигнализацию. Нарушение обычно осуществляется на уровне ДНК. Нарушение обычно является постоянным, необратимым или не транзиторным.

[0307] В некоторых аспектах нарушение осуществляется путем редактирования генов, например, с использованием ДНК-связывающего белка или ДНК-связывающей нуклеиновой кислоты, которые специфически связываются с геном или гибридизуются с ним в области, на которую нацелено нарушение. В некоторых аспектах белок или нуклеиновая кислота связаны или образуют комплекс с нуклеазой, например, в химерном

или слитом белке. Например, в некоторых вариантах осуществления нарушение осуществляется при помощи слияния, включающего ДНК-нацеливающий белок и нуклеазу, такую как нуклеаза с цинковыми пальцами (ZFN) или TALEN-эффекторная нуклеаза (TALEN), или РНК-управляемая нуклеаза, например, система нуклеиновая кислота с кластерными короткими палиндромными повторами с регулярными промежутками (CRISPR)-Cas, такая как система CRISPR-Cas9, специфичная для разрушаемого гена. В некоторых вариантах осуществления способы получения или создания генетически сконструированных клеток, например CAR-экспрессирующих клеток, включают введение в популяцию клеток молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR), и молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих агент, нацеленный на ингибиторную молекулу, представляющую собой нуклеазу для редактирования генов, такую как слияние ДНК-нацеленного белка и нуклеазы, такой как ZFN или TALEN, или РНК-управляемой нуклеазы, такой как система CRISPR-Cas9, специфическая в отношении молекулы-ингибитора.

II. BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы и кодирующие полинуклеотиды

[0308] В некоторых аспектах представлены BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы или химерные антигенные рецепторы, которые связываются или распознают BCMA молекулы, полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы (например, химерные антигенные рецепторы; CAR), и клетки, экспрессирующие такие рецепторы. В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, и композиции, включающие такие клетки, используют в соответствии со способами или применениями, представленными в настоящей заявке. BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, как правило, содержат антитела (*например*, антигенсвязывающие фрагменты антител) и/или другие связывающие пептиды, которые специфически распознают, например, специфически связываются с BCMA, например, с белками BCMA, такими как белок BCMA человека. В некоторых аспектах такие агенты связываются с внеклеточной частью BCMA. Также представлены клетки, например, сконструированные клетки, включающие такие полинуклеотиды или экспрессирующие такие рецепторы, и композиции, включающие такие сконструированные клетки. В некоторых аспектах также представлены способы, в которых используются такие клетки и композиций, и их применения, например, в терапевтических методах.

[0309] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, например CAR, оптимизированы или содержат определенные признаки, предназначенные для оптимизации, например, для использования кодонов, для снижения гетерогенности РНК и/или для модификации, например, чтобы увеличить или сделать более последовательной среди партий клеточных продуктов экспрессию, такую как поверхностная экспрессия, кодируемого рецептора. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, модифицированы по сравнению с эталонным

полинуклеотидом, например, для удаления криптических или скрытых сайтов сплайсинга, чтобы уменьшить гетерогенность РНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, кодон-оптимизированы, например, для экспрессии в клетке млекопитающего, например, человека, такой как Т-клетка человека. В некоторых аспектах модифицированные полинуклеотиды приводят к улучшенному, например, повышенному или более однородному или более постоянному уровню экспрессии, например, поверхностной экспрессии при экспрессии в клетке. Такие полинуклеотиды можно использовать в конструкциях для создания сконструированных клеток, которые экспрессируют кодируемый BCMA-связывающий белок клеточной поверхности. Таким образом, также представлены клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы, кодируемые полинуклеотидами, представленными в настоящей заявке, и их применение в адоптивной клеточной терапии, такой как лечение заболеваний и расстройств, связанных с экспрессией BCMA, таких как множественная миелома.

[0310] Среди полинуклеотидов существуют такие, которые кодируют рекомбинантные рецепторы, такие как антигенные рецепторы, которые специфически распознают, например, специфически связывают, BCMA, такой как человеческий BCMA. В некоторых аспектах также представлены кодируемые рецепторы, такие как рецепторы, содержащие BCMA-связывающие полипептиды, и включающие их композиции и готовые изделия, и их применения. В некоторых аспектах такие полинуклеотиды можно использовать для конструирования иммунных клеток, например, Т-клеток, для экспрессии BCMA-связывающего рекомбинантного рецептора, например, с использованием способов, описанных в настоящей заявке, например, в Разделе III, для получения сконструированных клеток или клеточных композиций для применения в способах, таких как терапевтические и/или профилактические способы, представленные в настоящей заявке.

[0311] Среди BCMA-связывающих полипептидов есть антитела, такие как одноцепочечные антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты антител) или их части. В некоторых примерах рекомбинантные рецепторы представляют собой химерные антигенные рецепторы, например, которые содержат анти-BCMA антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. В любом из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в CAR, которое специфически распознает антиген, например, BCMA, специфически связывается с антигеном. Представленные полинуклеотиды могут быть включены в конструкции, такие как конструкции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК), которые можно вводить в клетки для экспрессии кодируемых BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов.

[0312] В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид, в некоторых случаях кодируемый выше нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, или

соединенную на 5'-конце нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих антигенсвязывающий домен. В некоторых случаях полинуклеотид, содержащий нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, например, химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, кодирующую сигнальный пептид. В некоторых аспектах сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, происходящий из нативного полипептида. В других аспектах сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид. В некоторых аспектах неограничивающие примеры сигнального пептида включают сигнальный пептид каппа-цепи IgG, представленный в SEQ ID NO: 166, кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 167 или 168-171; альфа-цепь GMCSFR, представленную в SEQ ID NO:154, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:155; сигнальный пептид CD8-альфа, представленный в SEQ ID NO:146; или сигнальный пептид CD33, представленный в SEQ ID NO:142. В некоторых случаях полинуклеотид, кодирующий BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, может содержать нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие дополнительные молекулы, такие как суррогатный маркер или другие маркеры, или могут содержать дополнительные компоненты, такие как промоторы, регуляторные элементы и/или мультицистронные элементы. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, может быть функционально связана с любым из дополнительных компонентов.

[0313] Кроме того, в некоторых случаях оптимальный ответ на терапию может зависеть от способности сконструированных рекомбинантных рецепторов, таких как CAR, стабильно и надежно экспрессироваться на поверхности клеток и/или связывать антиген-мишень. Например, в некоторых случаях гетерогенность транскрибируемой РНК из введенного трансгена (например, кодирующего рекомбинантный рецептор) может влиять на экспрессию и/или активность рекомбинантного рецептора, в некоторых случаях при экспрессии в клетке, такой как человеческая Т-клетка, используемая в клеточной терапии. В некоторых случаях длина и тип спейсера в рекомбинантном рецепторе, таком как CAR, могут влиять на экспрессию, активность и/или функцию рецептора.

[0314] Представленные варианты осуществления в некоторых контекстах основаны на наблюдении, что определенные спейсеры и оптимизация нуклеиновокислотных последовательностей могут привести к последовательной и надежной экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, используемые в предложенных способах, обладают преимуществами по сравнению с доступными подходами для клеточной терапии, в частности, BCMA-нацеленной клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы содержат полностью человеческие антигенсвязывающие домены с низкой аффинностью к связыванию растворимого BCMA.

В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы содержат модифицированный спейсер, который приводит к усиленному связыванию с BCMA, экспрессируемым на поверхности клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы демонстрируют пониженную антиген-независимую тоническую передачу сигналов, что в некоторых случаях может приводить к уменьшению истощения клеток из-за антиген-независимой передачи сигналов и отсутствию ингибирования растворимым BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы демонстрируют активность или эффективность в отношении клеток-мишеней, которые экспрессируют BCMA с низкой плотностью или низким уровнем. В некоторых аспектах преимущества описанных BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов включают то, что их можно использовать у субъектов, которые ранее получали и/или не отвечали на предшествующие терапии, направленные на BCMA, имели после них рецидив или стали невосприимчивыми к ним, включая предшествующие лечения или терапию BCMA-связывающими или BCMA-нацеленными агентами, такими как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), BCMA-нацеленный Т-клеточный рекрутер (TCE) или клетки, экспрессирующие BCMA-нацеленный химерный антигенный рецептор (CAR). Как указано в настоящей заявке, преимуществами BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов являются стабильность, высокая экспрессия, сниженная антиген-независимая (например, тоническая) передача сигналов, низкое связывание растворимым BCMA, высокая частота ответа, низкая частота неблагоприятных событий (например, токсичности), пролонгированный ответ и, в некоторых случаях, улучшение ответа с течением времени, и, таким образом, их можно использовать у субъектов, которые не отвечали на BCMA-направленные предшествующие терапии, имели после них рецидив или стали невосприимчивыми к ним.

[0315] Кроме того, в некоторых случаях определенные рекомбинантные рецепторы могут проявлять антиген-независимую активность или передачу сигналов (также известную как «тоническая передача сигналов»), что может привести к нежелательным эффектам, например, из-за повышенной дифференцировки и/или истощения Т-клеток, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах такая активность может ограничивать активность, эффект или эффективность Т-клеток. В некоторых случаях во время конструирования и размножения клеток ex vivo для экспрессии рекомбинантного рецептора клетки могут демонстрировать фенотипы, указывающие на истощение, из-за тонической передачи сигналов через рекомбинантный рецептор.

[0316] В некоторых случаях свойства конкретных антигенов-мишеней, с которыми специфически связываются, распознают или на которые нацелены рекомбинантные рецепторы, могут влиять на активность рецептора. В некоторых случаях антиген созревания В-клеток (BCMA) обычно экспрессируется на злокачественных плазматических клетках и является привлекательной терапевтической мишенью для клеточной терапии. В некоторых случаях BCMA может расщепляться гамма-секретазой с образованием

растворимого BCMA (sBCMA) или «слущенной» формы BCMA, уменьшая экспрессию BCMA на поверхности клеток-мишеней. В некоторых случаях активность BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов, таких как анти-BCMA химерные антигенные рецепторы (CAR), может быть заблокирована или ингибирована присутствием растворимого BCMA. Необходимы улучшенные стратегии для оптимального ответа на клеточные терапии, в частности, на рекомбинантные рецепторы, которые специфически связываются, распознают или нацелены на BCMA, такой как BCMA, экспрессируемый на поверхности клеток-мишеней.

[0317] BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, например, экспрессируемые в клетках, используемых в способах и применениях, представленных в настоящей заявке, как правило, содержат внеклеточный связывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен. Среди BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов есть полипептиды, содержащие антитела, включая одноцепочечные белки клеточной поверхности, *например*, рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы, содержащие такие антитела.

[0318] Среди BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов есть одноцепочечные белки клеточной поверхности, такие как рекомбинантные рецепторы (*например*, антигенные рецепторы), которые включают одно из представленных антител или его фрагмент (*например*, BCMA-связывающий фрагмент). Рекомбинантные рецепторы включают антигенные рецепторы, которые специфически связывают или специфически распознают BCMA, такие как антигенные рецепторы, содержащие представленные анти-BCMA антитела, *например*, антигенсвязывающие фрагменты. Среди антигенных рецепторов есть функциональные не-TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). Также представлены клетки, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, и их применения в адоптивной клеточной терапии, например, в лечении заболеваний и расстройств, связанных с экспрессией BCMA.

[0319] Иллюстративные антигенные рецепторы, включая CAR, и способы для конструирования и введения таких антигенных рецепторов в клетки, включают те, которые описаны, например, в международных патентных публикациях №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013166321, WO2013071154, WO2013123061, публикациях патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118 и европейской патентной заявке № EP2537416, каждый из этих документов включен в настоящую заявку во всей полноте; и/или те, которые описаны, 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, описанный в патенте США № 7446190, и те, которые описаны, в публикаци международной патентной заявки № WO2014055668. Иллюстративные CAR включают CAR, раскрытые в любой из указанных выше

публикаций, таких как WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, US 7446190 и US 8389282, и в которых антигенсвязывающая часть, *например,* scFv, заменена антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке.

[0320] В некоторых аспектах BCMA-специфические CAR, используемые в представленных вариантах осуществления, включают такие, которые описаны, например, в WO 2019/090003.

[0321] В некоторых аспектах BCMA-специфический CAR, используемый в представленных вариантах осуществления, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15-20, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или примерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 15-20. В некоторых вариантах осуществления CAR имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или аминокислотную последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или примерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:19.

[0322] В некоторых вариантах осуществления CAR кодируется полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 9-14, или последовательностью, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или примерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 9-14. В некоторых вариантах осуществления CAR кодируется полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO: 14, или последовательностью, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или примерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления CAR кодируется полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:13, или последовательностью, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или примерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CAR кодируется полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах осуществления CAR кодируется полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:14, или последовательностью, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или примерно по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах

осуществления CAR кодируется полинуклеотидом, таким как полинуклеотид с нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:14.

[0323] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий домен, включает (a) последовательность нуклеотидов, представленную в любой из SEQ ID NO: 30, 31, 50, 51, 59, 60, 82, 84, 113 и 115; (b) последовательность нуклеотидов, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с любой из SEQ ID NO: 30, 31, 50, 51, 59, 60, 82, 84, 113 и 115; или (c) вырожденную последовательность (a) или (b). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий домен, включает (a) последовательность нуклеотидов, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 29, 49, 58, 83, 114, 126, 128, 129, 130; (b) последовательность нуклеотидов, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью нуклеотидов, кодирующей аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 29, 49, 58, 83, 114, 126, 128, 129, 130; или (c) вырожденную последовательность (a) или (b).

A. Антигенсвязывающий домен

[0324] Среди химерных рецепторов существуют химерные антигенные рецепторы (CAR). Химерные рецепторы, такие как CAR, как правило, включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, который включает, или содержится в, или содержит одно из представленных анти-BCMA антител. Таким образом, химерные рецепторы, *например, CAR*, типично включают в их внеклеточных частях один или более BCMA-связывающих доменов, таких как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или одну или более вариабельных областей антитела, и/или молекул антител, таких как описанные в настоящей заявке.

[0325] Термин “антитело” используется в настоящей заявке в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, в том числе интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, в том числе антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, $F(ab')_2$ фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), вариабельные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (например, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически сконструированные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептидные тела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, например, биспецифические или триспецифические, антитела, диатела, триантела и тетратела, тандемный ди-scFv, тандемный три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как включающий функциональные фрагменты антител, также называемые в настоящей заявке «антигенсвязывающими фрагментами». Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и

его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

[0326] Термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», синонимичные терминам «гипервариабельная область» или «HVR», известны в данной области техники и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антиген-специфичность и/или аффинность связывания. Как правило, имеется три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). В данной области техники известно, что «каркасные области» и «FR» относятся к не-CDR частям вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, имеется четыре FR в каждой вариабельной области полноразмерной тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой вариабельной области полноразмерной легкой цепи (FR- L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[0327] Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая описанные Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации “Kabat”); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (система 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.” (система 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 (система 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, (система нумерации “Aho”); and Martin *et al.*, “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (система нумерации “AbM”).

[0328] Границы данной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от системы, используемой для идентификации. Например, система Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как система Chothia основана на структурной информации. Нумерация для систем Kabat и Chothia основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, при этом вставки обозначаются буквами вставки, например, «30a», а в некоторых антителах появляются делеции. В этих двух схемах определенные вставки и делеции («вставки/делеции») размещаются в разных положениях, что приводит к дифференциальной нумерации. Система Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом похожа на схему нумерации Chothia. Система AbM представляет собой компромисс между определениями Kabat и Chothia, основанный на том, что используется в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular AbM.

[0329] В таблице 5 ниже перечислены примеры границ положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированные в сответствии с системой Kabat, Chothia, AbM и Contact, соответственно. Для CDR-H1 нумерация остатков приведена

с использованием обеих систем нумерации Kabat и Chothia. FR расположены между CDR, например, с FR-L1, расположенной перед CDR-L1, FR-L2, расположенной между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3, расположенной между CDR-L2 и CDR-L3, и так далее. Следует отметить, что, поскольку показанная система нумерации Kabat размещает вставки в H35A и H35B, конец петли CDR-H1 Chothia при нумерации с использованием показанного соглашения о нумерации Kabat варьируется между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 5

Границы областей CDR в соответствии с различными системами 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 (намерация согласно Kabat[1])	H31--H35B	H26--H32.34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (намерация согласно 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

[0330] Таким образом, если не указано иное, “CDR”, или “определяющая комплементарность область”, или индивидуальные определенные CDR (*например*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такой как его вариабельная область, должны рассматриваться как охватывающие какую-либо (или определенную) определяющую комплементарность область, определенную в соответствии с любой из указанных выше систем, или других известных систем. Например, когда указано, что конкретная CDR (*например*, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности V_H или V_L области, следует понимать, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (*например*, CDR-H3) в вариабельной области, как определено в соответствии с любой из указанных выше систем, или других известных систем. В некоторых вариантах осуществления определены специфические последовательности CDR. Иллюстративные последовательности CDR представленных антител описаны с использованием различных систем нумерации, хотя следует понимать, что представленное антитело может включать

CDR, описанные в соответствии с любой из других указанных выше систем нумерации или других систем нумерации, известных специалистам в данной области.

[0331] Подобным образом, если не указано иное, FR или индивидуальные определенные FR (*например*, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такой как его вариабельная область, должны рассматриваться как охватывающие какую-либо (или определенную) каркасную область, определенную в соответствии с любой из известных систем. В некоторых случаях определяют систему для идентификации конкретной CDR, FR или FRs или CDRs, например, CDR определяют методом Kabat, Chothia, AbM, IMGT или Contact или в соответствии с другими известными системами. В других случаях, представлена конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0332] Термин “вариабельная область” или “вариабельный домен” относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела, как правило, имеют схожие структуры, при этом каждый домен включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (см., *например*, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman и Co., page 91 (2007). Одного V_H или V_L домена может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, могут быть выделены с использованием V_H или V_L домена из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных V_L или V_H доменов соответственно. См., например, Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

[0333] Среди антител, включенных в CAR, есть фрагменты антител. «Фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» 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 ограничиваются этим, Fv, Fab, Fab’, Fab’-SH, $F(ab')_2$; диатела; линейные антитела; вариабельные области тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные антитела, содержащие только область V_H; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в CAR представляет собой или включает фрагмент антитела, включающий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, включающие вариабельную (V_H) область тяжелой цепи и/или вариабельную (V_L) область легкой цепи, такие как scFv.

[0334] Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, включающие всю или часть вариабельной области тяжелой цепи или всю или часть вариабельной области легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело.

[0335] Фрагменты антител можно получить различными способами, включая, но не

ограничиваясь этим, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой рекомбинантно-продуцируемые фрагменты, такие как фрагменты, включающие структуры, которые не встречаются в природе, такие как фрагменты с двумя или более областями или цепями антител, соединенными синтетическими линкерами, например, пептидными линкерами, и/или которые получены или могут быть получены путем ферментативного расщепления встречающихся в природе интактных антител. В некоторых аспектах фрагменты антител представляют собой scFv.

[0336] «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR происходят из нечеловеческих CDR, а все или по существу все аминокислотные остатки FR происходят из человеческих FR. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую из человеческого антитела. «Гуманизированная форма» нечеловеческого антитела относится к варианту нечеловеческого антитела, который подвергся гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности по отношению к человеку, при сохранении специфичности и аффинности исходного нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления некоторые FR остатки в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены CDR остатки), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0337] Среди антител против BCMA, включенных в CAR, есть человеческие антитела. «Человеческое антитело» представляет собой антитело с аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности аминокислот, продуцируемой человеком или клеткой человека, или нечеловеческим источником, в котором используются репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела, включая библиотеки человеческих антител. Термин исключает гуманизированные формы нечеловеческих антител, содержащих нечеловеческие антигенсвязывающие области, такие как те, в которых все или по существу все CDR являются нечеловеческими. Термин включает антигенсвязывающие фрагменты антител человека.

[0338] Человеческие антитела могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования интактных человеческих антител или интактных антител с вариабельными областями человека в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют локусы эндогенных иммуноглобулинов, или которые присутствуют внехромосомно или случайным образом интегрированы в хромосомы животного. У таких трансгенных животных локусы эндогенного иммуноглобулина обычно инактивированы. Человеческие антитела также могут быть получены из библиотек человеческих антител, включая библиотеки фагового дисплея и бесклеточные библиотеки, содержащие антитело-кодирующие последовательности,

происходящие из человеческого репертуара.

[0339] Среди антител, включенных в CAR, есть моноклональные антитела, включая фрагменты моноклональных антител. Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящей заявке, относится к антителу, полученному из или в популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, входящие в популяцию, идентичны, за исключением возможных вариантов, содержащих встречающиеся в природе мутации или возникающие при получении препарата моноклональных антител, при этом такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных эпитопов, каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено против одного эпитопа на антигене. Термин не следует толковать как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональное антитело может быть получено различными методами, включая, но не ограничиваясь этим, получение из гибридомы, методами рекомбинантной ДНК, методом фагового дисплея и другими методами дисплея антител.

[0340] В некоторых вариантах осуществления CAR включает BCMA-связывающую часть или части молекулы антитела, такую как вариабельная область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельная область легкой цепи (V_L) антитела, *например*, scFv фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие CAR, описанные в настоящей заявке, например, для применения в представленных способах, содержат антитело, такое как анти-BCMA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который придает BCMA-связывающие свойства CAR. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий домен может представлять собой любое анти-BCMA антитело, описанное или полученное из любого описанного анти-BCMA. См., например, Carpenter *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016090320, WO2016090327, WO2010104949 и WO2017173256. Любые такие анти-BCMA антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в CAR. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA CAR содержит антигенсвязывающий домен, который представляет собой scFv, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L), полученную из антитела, описанного в WO 2016090320 или WO2016090327.

[0341] В некоторых вариантах осуществления антитело, *например* анти-BCMA антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи (V_H или V_L), которая описана, или ее достаточную антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность V_H области или ее достаточную антигенсвязывающую часть, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, которые описаны. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность V_L области или достаточную антигенсвязывающую часть, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-

L3, которые описаны. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательность V_H области, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, которые описаны, и содержит последовательность V_L области, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, которые описаны. Также среди антител имеются такие, которые имеют последовательности, которые по меньшей мере на или на около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичны такой последовательности.

[0342] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой однодоменные антитело (sdAb), включающее только последовательность V_H области или ее достаточную антигенсвязывающую часть, такую как любая из вышеописанных последовательностей V_H (*например*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 и/или CDR-H4).

[0343] В некоторых вариантах осуществления, антитело, представленное в настоящей заявке (*например*, анти-BCMA антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий V_H область, дополнительно включает легкую цепь или ее достаточную антигенсвязывающую часть. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H область и V_L область, или достаточную антигенсвязывающую часть V_H и V_L области. В таких вариантах осуществления последовательность V_H области может быть любой из вышеописанных последовательностей V_H. В некоторых таких вариантах осуществления антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab или scFv. В некоторых таких вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое также содержит константную область.

[0344] В некоторых вариантах осуществления антитело, *например* его антигенсвязывающий фрагмент, в CAR, содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), имеющую аминокислотную последовательность выбранную из любой из SEQ ID NO: 32, 52, 61, 85, 116, 125, 131, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью V_H области, выбранной из любой из SEQ ID NO: 32, 52, 61, 85, 116, 125, 131, или содержит CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, присутствующие в такой V_H последовательности. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, в CAR, содержит V_H область из любых из антител или антителосвязывающих фрагментов, описанных в WO 2016/090327, WO 2016/090320, или WO 2017/173256.

[0345] В некоторых вариантах осуществления антитело, *например*, его антигенсвязывающий фрагмент, в CAR, содержит вариабельную область легкой цепи (V_L), имеющую аминокислотную последовательность выбранную из любой из SEQ ID NOs: 33, 53, 62, 88, 119, 127 и 132, или аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью V_L области, выбранной из

любой из SEQ ID NO: 33, 53, 62, 88, 119, 127 и 132, или содержит CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, присутствующие в такой последовательности V_L. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, в CAR, содержит V_L область из любых из антител или антителосвязывающих фрагментов, описанных в WO 2016/090327, WO 2016/090320 или WO 2017/173256.

[0346] В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела, *например*, его антигенсвязывающего фрагмента, в CAR, включают: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:32 и 33, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:52 и 53, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и 62, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:61 и 62, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:85 и 88, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:125 и 127, соответственно; аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:131 и 132, соответственно.

[0347] В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в CAR, включают: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:32 и 33, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:52 и 53, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и 62, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:61 и 62, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:85 и 88, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:125 и 127, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:131 и 132, соответственно.

[0348] В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в CAR, включают: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и 62. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно.

[0349] В некоторых вариантах осуществления, в CAR, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает V_H и V_L область, и V_H область включает определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в аминокислотной последовательности V_H области, выбранной из любой из SEQ ID NO: 32, 52, 61, 85, 116, 125, 131; и V_L область включает определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в аминокислотной последовательности V_L области, выбранной из любой из SEQ ID NO: 33, 53, 62, 88, 119, 127, 132.

[0350] В некоторых вариантах осуществления, в CAR, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает V_H и V_L область, и V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32,

и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:53; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:62; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:85, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:88; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:116, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:119; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:125, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:131, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.

[0351] В некоторых вариантах осуществления, в CAR, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает V_H и V_L область, и V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:52, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:53. В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:61, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:62. В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:85, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:88. В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:116, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:119. В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:125, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:127. В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:131, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:132.

[0352] В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в CAR, включают: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 и 33, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52 и 53, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61 и 62, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85 и 88, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125 и 127, соответственно. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включают аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131 и 132, соответственно.

[0353] В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящей заявке, включают аминокислотные последовательности, выбранные из: SEQ ID NO:116 и 119, или любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с любой из указанных выше V_H и V_L, например идентичность по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с вышеуказанной последовательностью, или любого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в V_H области, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в V_L области, из любых из описанных выше V_H и V_L. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящей заявке, включают аминокислотные последовательности, выбранные из: SEQ ID NO:116 и 119. В некоторых вариантах осуществления анти-идиотипическое антитело, описанное в PCT/US2020/063492, используют для детекции экспрессии антигенсвязывающего домена, который включает эти последовательности.

[0354] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела,

такой как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или диатело или однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой однодоменное антитело, включающее только V_H область. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, включающий вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L). В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный фрагмент антитела (*например,* scFv) включает один или более линкеров, соединяющих два домена или области антитела, такие как вариабельная область тяжелой цепи (V_H) и вариабельная область легкой цепи (V_L). Линкер типично представляет собой пептидный линкер, *например*, гибкий и/или растворимый пептидный линкер. Среди линкеров есть линкеры, обогащенные глицином и серином и/или, в некоторых случаях, треонином. В некоторых вариантах осуществления линкеры также включают заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамат, которые могут улучшать растворимость. В некоторых вариантах осуществления линкеры также включают один или более пролинов.

[0355] Соответственно, представленные анти-BCMA антитела включают одноцепочечные фрагменты антител, такие как scFv и диатела, в частности, человеческие одноцепочечные фрагменты антител, типично включающие линкер(линкеры), соединяющий два домена или две области антитела, такие как области V_H и V_L. Линкер типично представляет собой пептидный линкер, *например*, гибкий и/или растворимый пептидный линкер, такой как линкер, обогащенный глицином и серином.

[0356] В некоторых аспектах линкеры, обогащенные глицином и серином (и/или треонином), включают по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такой аминокислоты(аминокислот). В некоторых вариантах осуществления они включают по меньшей мере или примерно 50%, 55%, 60%, 70% или 75% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления линкер по существу полностью состоит из глицина, серина и/или треонина. Линкеры, как правило, имеют длину между около 5 и около 50 аминокислот, типично от или от около 10 до или до около 30, *например*, имеют длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, а в некоторых примерах от 10 до 25 аминокислот. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие различные количества повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO:7) или GGGS (3GS; SEQ ID NO:2), например, в пределах 2, 3, 4 и 5 повторов такой последовательности. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, представленной в SEQ ID NO:1 (GGGGSGGGGSGGGGS). Иллюстративные линкеры также включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, представленной в SEQ ID NO:176 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG). Иллюстративные линкеры также включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, представленной в SEQ ID NO:255 (SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA).

[0357] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления представленные

варианты осуществления включают одноцепочечные фрагменты антител, *например,* scFv, включающие один или более из указанных выше линкеров, таких как глицин/серин-обогащенные линкеры, включая линкеры, имеющие повторы GGGS (SEQ ID NO: 2) или GGGGS (SEQ ID NO: 7), например, линкер, представленный в SEQ ID NO:1.

[0358] В некоторых вариантах осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:1. Фрагмент, *например* scFv, может включать V_H область или ее часть, за которой следует линкер, за которым следует V_L область или ее часть. Фрагмент, *например,* scFv, может включать V_L область или ее часть, за которой следует линкер, за которым следует V_H область или ее часть.

[0354] Таблица 6 представляет SEQ ID NO иллюстративных антигенсвязывающих доменов, таких как антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые могут содержаться в BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторах, таких как анти-BCMA химерные антигенные рецепторы (CAR), которые можно использовать в представленных способах и применениях. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий V_H область, которая включает последовательность CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и V_L область, которая включает последовательность CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже (нумерация в соответствии с Kabat). В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий последовательность V_H области и последовательность V_L области, представленные в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже, или антитело, включающее аминокислотную последовательность V_H и V_L области, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью V_H области и последовательностью V_L области, представленными в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий последовательность V_H области и последовательность V_L области, представленные в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже, или антитело, включающее аминокислотную последовательность scFv, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью scFv, представленной в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий последовательность scFv, представленную в SEQ ID

NO:114, или антитело, включающее аминокислотную последовательность scFv, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с вышеуказанной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO, перечисленных в каждом ряду Таблицы 6 ниже. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор содержит BCMA-связывающее антитело или его фрагмент, включающий последовательность scFv, представленную в SEQ ID NO: 114.

Таблица 6

Идентификатор последовательности (SEQ ID NO) для иллюстративных антигенсвязывающих доменов

Антигенсвязывающий домен	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V_H	V_L	scFv
BCMA-23	34	35	36	22	23	24	32	33	29
BCMA-25	37	38	39	40	41	42	52	53	49
BCMA-26	34	35	54	55	56	57	61	62	58
BCMA-52	66	70	72	74	76	77	85	88	83
BCMA-55	97	101	103	105	107	108	116	119	114
BCMA-C1, V_H-V_L							125	127	126
BCMA-C1, V_L-V_H							125	127	128
BCMA-C2, V_H-V_L							131	132	129
BCMA-C2, V_L-V_H							131	132	130

[0360] Антитела, *например,* антигенсвязывающие фрагменты, в CAR, могут представлять собой человеческие антитела. В некоторых вариантах осуществления представленного человеческого анти-BCMA антитела, *например* антигенсвязывающих фрагментов, человеческое антитело содержит V_H область, которая включает часть, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью, кодируемой V сегментом нуклеотидной последовательности зародышевого типа тяжелой цепи человека, часть, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа D сегмента тяжелой цепи человека, и/или часть, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа J сегмента тяжелой цепи человека; и/или содержит V_L область, которая включает часть, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента каппа или лямбда цепи человека, и/или часть, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеотидной последовательности зародышевого типа J сегмента каппа или лямбда цепи человека. В некоторых вариантах осуществления часть V_H области соответствует CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3. В некоторых вариантах осуществления часть V_H области соответствует каркасной области 1 (FR1), FR2, FR2 и/или FR4. В некоторых вариантах осуществления часть V_L области соответствует CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления часть V_L области соответствует FR1, FR2, FR2 и/или FR4.

[0361] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например*, антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-H1, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью соответствующей CDR-H1 области в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента тяжелой цепи человека. Например, человеческое антитело в некоторых вариантах осуществления содержит CDR-H1, имеющую последовательность, которая является идентичной на 100% или имеет не более одного, двух или трех аминокислотных отличий по сравнению с соответствующей CDR-H1 областью в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента тяжелой цепи человека.

[0362] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-H2, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью соответствующей CDR-H2 области в

последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента тяжелой цепи человека. Например, человеческое антитело в некоторых вариантах осуществления содержит CDR-H2, имеющую последовательность, которая является идентичной на 100% или имеет не более одного, двух или трех аминокислотных отличий по сравнению с соответствующей CDR-H2 областью в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента тяжелой цепи человека.

[0363] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-H3, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью соответствующей CDR-H3 области в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента, D сегмента и J сегмента тяжелой цепи человека. Например, человеческое антитело в некоторых вариантах осуществления содержит CDR-H3, имеющую последовательность, которая является идентичной на 100% или имеет не более одного, двух или трех аминокислотных отличий по сравнению с соответствующей CDR-H3 областью в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента, D сегмента и J сегмента тяжелой цепи человека.

[0364] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-L1, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью соответствующей CDR-L1 области в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента легкой цепи человека. Например, человеческое антитело в некоторых вариантах осуществления содержит CDR-L1, имеющую последовательность, которая является идентичной на 100% или имеет не более одного, двух или трех аминокислотных отличий по сравнению с соответствующей CDR-L1 областью в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента легкой цепи человека.

[0365] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-L2, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью соответствующей CDR-L2 области в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента легкой цепи человека. Например, человеческое антитело в некоторых вариантах осуществления содержит CDR-L2, имеющую последовательность, которая является идентичной на 100% или имеет не более одного, двух или трех аминокислотных отличий по сравнению с соответствующей CDR-L2 областью в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента легкой цепи человека.

[0366] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например* антигенсвязывающий фрагмент, содержит CDR-L3, имеющую идентичность

последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с аминокислотной последовательностью соответствующей CDR-L3 области в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента и J сегмента легкой цепи человека. Например, человеческое антитело в некоторых вариантах осуществления содержит CDR-L3, имеющую последовательность, которая является идентичной на 100% или имеет не более одного, двух или трех аминокислотных отличий по сравнению с соответствующей CDR-L3 областью в последовательности, кодируемой нуклеотидной последовательностью зародышевого типа V сегмента и J сегмента легкой цепи человека.

[0367] В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело, *например* антигенсвязывающий фрагмент, содержит каркасную область, которая содержит последовательности генных сегментов генов зародышевогой линии человека. Например, в некоторых вариантах осуществления человеческое антитело содержит V_H область, в которой каркасная область, *например,* FR1, FR2, FR3 и FR4, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с каркасной областью, кодируемой сегментом зародышевого типа антитела человека, таким как V сегмент и/или J сегмент. В некоторых вариантах осуществления человеческое антитело содержит V_L область, в которой каркасная область, *например,* FR1, FR2, FR3 и FR4, имеет идентичность последовательности по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% с каркасной областью, кодируемой сегментом зародышевого типа антитела человека, таким как V сегмент и/или J сегмент. Например, в некоторых таких вариантах осуществления последовательность каркасной области, которая содержится в V_H области и/или V_L области, отличается не более чем 10 аминокислотами, например, не более чем 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотой, по сравнению с последовательностью каркасной области, кодируемой сегментом зародышевого типа антитела человека.

[0368] В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело может представлять собой мышиный анти-BCMA scFv, описанный в публикации международной патентной заявки № WO 2010/104949.

[0369] Антитело, *например,* антигенсвязывающий фрагмент, может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, такую как один или более доменов константной области. В некоторых вариантах осуществления константные области включают константную область легкой цепи и/или константную область 1 тяжелой цепи (C_H1). В некоторых вариантах осуществления антитело включает C_H2 и/или C_H3 домен, такой как Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область человеческого IgG, такого как IgG1 или IgG4.

B. Спейсер

[0370] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как CAR, включающий антитело (*например*, антигенсвязывающий фрагмент), представленный в настоящей заявке, такой как экспрессируемый сконструированными клетками, используемыми в способах и применениях, представленных в настоящей заявке,

дополнительно включает спейсер или спейсерную область. Спейсер типично представляет собой полипептидный спейсер и, как правило, расположен в CAR между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR. В некоторых аспектах спейсер может представлять собой или включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, или ее вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область иммуноглобулина, такая как шарнирная область IgG, *например,* IgG4, или IgG4-происходящая шарнирная область, и/или C_H1/C_L и/или Fc-область. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит шарнирную область, которая включает или представляет собой CD8альфа. В некоторых вариантах осуществления CD8альфа представляет собой CD8альфа человека. В некоторых вариантах осуществления константная область или одна или несколько ее частей происходят из человеческого IgG, такого как человеческий IgG4, или IgG1 или IgG2. Как правило, спейсер, такой как часть константной области, служит спейсерной областью между компонентом распознавания антигена (например, scFv) и трансмембранным доменом. В некоторых вариантах осуществления длина и/или композиция спейсера предназначены для оптимизации или стимулирования определенных особенностей взаимодействия между CAR и его мишенью; в некоторых аспектах он предназначен для оптимизации биофизического синаптического расстояния между CAR-экспрессирующей клеткой и клеткой, экспрессирующей мишень CAR, в процессе, или при, или после связывания CAR с его мишенью на экспрессирующей мишень клетке; в некоторых аспектах экспрессирующей мишень клеткой является опухолевая клетка, экспрессирующая BCMA. В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется Т-клеткой, и длина спейсера соответствует длине, подходящей для активации Т-клетки или для оптимизации действия CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой спейсерную область, расположенную между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом рекомбинантного рецептора, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область представляет собой область, расположенную между лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом рекомбинантного рецептора, например, CAR.

[0371] В некоторых вариантах осуществления спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную респонсивность клетки после связывания с антигеном по сравнению с респонсивностью в отсутствие спейсера и/или в присутствии другого спейсера, например отличающегося только длиной. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет длину по меньшей мере 100 аминокислот, например, длину по меньшей мере 110, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 аминокислот. В некоторых примерах спейсер имеет длину, равную или около 12 аминокислот, или имеет длину не более чем 12 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают такие, которые имеют по меньшей мере около 10-300 аминокислот, около 10-200 аминокислот, около 50-175 аминокислот, около 50-150 аминокислот, около 10-125 аминокислот, около 50-100 аминокислот, около 100-300 аминокислот, около 100-250 аминокислот, около 125-250 аминокислот или около 200-250 аминокислот, и включая

любое промежуточное значение между конечными точками любых из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления спейсер или спейсерная область имеет длину по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 119 аминокислот или меньше, по меньшей мере около 125 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот или по меньшей мере около 220 аминокислот, или по меньшей мере около 225 аминокислот.

[0372] В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет длину 125-300 аминокислот, имеет длину 125-250 аминокислот, имеет длину 125-230 аминокислот, имеет длину 125-200 аминокислот, имеет длину 125-180 аминокислот, имеет длину 125-150 аминокислот, имеет длину 150-300 аминокислот, имеет длину 150-250 аминокислот, имеет длину 150-230 аминокислот, имеет длину 150-200 аминокислот, имеет длину 150-180 аминокислот, имеет длину 180-300 аминокислот, имеет длину 180-250 аминокислот, имеет длину 180-230 аминокислот, имеет длину 180-200 аминокислот, имеет длину 200-300 аминокислот, имеет длину 200-250 аминокислот, имеет длину 200-230 аминокислот, имеет длину 230-300 аминокислот, имеет длину 230-250 аминокислот или имеет длину 250-300 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет по меньшей мере или примерно по меньшей мере, или составляет или примерно составляет 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 или 229 аминокислот в длину, или имеет длину между любыми из перечисленных выше значений.

[0373] Иллюстративные спейсеры включают спейсеры, содержащие часть(части) константной области иммуноглобулина, например, содержащие шарнир Ig, такой как шарнирный домен IgG. В некоторых аспектах спейсер включает только шарнир IgG, шарнир IgG, связанный с одним или более из C_H2 и C_H3 домена, или шарнир IgG, связанный с C_H3 доменом. В некоторых вариантах осуществления IgG шарнир, C_H2 и/или C_H3 могут происходить полностью или частью из IgG4 или IgG2. В некоторых вариантах осуществления спейсер может представлять собой химерный полипептид, содержащий одну или более из последовательностей шарнира, C_H2 и/или C_H3, происходящих из IgG4, IgG2, и/или IgG2 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область включает полностью или часть шарнирной области IgG4 и/или шарнирной области IgG2, где шарнирная область IgG4 необязательно представляет собой шарнирную область человеческого IgG4, и шарнирная область IgG2 необязательно представляет собой шарнирную область человеческого IgG2; область C_H2 включает полностью или часть C_H2 области IgG4 и/или области C_H2 IgG2, где область C_H2 IgG4 необязательно представляет собой C_H2 область человеческого IgG4, и C_H2 область IgG2 необязательно представляет собой C_H2 область человеческого IgG2; и/или C_H3 область включает полностью или часть C_H3 области IgG4 и/или области C_H3 IgG2, где C_H3 область IgG4 необязательно представляет собой C_H3 область человеческого IgG4, и C_H3 область IgG2 необязательно представляет собой C_H3 область человеческого IgG2. В некоторых вариантах осуществления шарнир, C_H2 и C_H3 включают полностью или часть каждой из шарнирной области, C_H2 и C_H3 из IgG4. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область

является химерной и включает шарнирную область из человеческого IgG4 и человеческого IgG2; C_H2 область является химерной и включает C_H2 область из человеческого IgG4 и человеческого IgG2; и/или C_H3 область является химерной и включает C_H3 область из человеческого IgG4 и человеческого IgG2. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает IgG4/2 химерный шарнир или модифицированный IgG4 шарнир, включающий по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с шарнирной областью человеческого IgG4; химерной C_H2 областью человеческого IgG2/4; и C_H3 областью человеческого IgG4.

[0374] В некоторых вариантах осуществления спейсер может происходить полностью или частью из IgG4 и/или IgG2 и может содержать мутации, такие как одна или более одиночных аминокислотных мутаций в одном или более доменах. В некоторых примерах аминокислотная модификация представляет собой замену пролина (P) на серин (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация представляет собой замену глутамина (Q) на аспарагин (N) для уменьшения гетерогенности гликозилирования, такую как N177Q мутация в положении 177, в C_H2 области, последовательности полноразмерного Fc IgG4, представленной в SEQ ID NO: 173, или N176Q в положении 176, в C_H2 области, последовательности полноразмерного Fc, представленной в SEQ ID NO: 172. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, и необязательно имеет длину около 228 аминокислот; или спейсер, представленный в SEQ ID NO: 174. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает аминокислотную последовательность

ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO: 174).

[0375] В некоторых вариантах осуществления спейсер кодируется полинуклеотидом, который был оптимизирован для кодон-экспрессии и/или для устранения сайтов сплайсинга, таких как криптические сайты сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность для спейсера включает нуклеиновокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 200. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность для спейсера включает нуклеиновокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 236 или 8.

[0376] Дополнительные иллюстративные спейсеры включают, но не ограничиваются этим, спейсеры, описанные в Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol. Res.*, 3(2):125-135, или в публикации международной патентной заявки № WO2014031687. В некоторых вариантах

осуществления нуклеотидная последовательность спейсера оптимизирована для уменьшения гетерогенности РНК после экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность спейсера оптимизирована для уменьшения криптических сайтов сплайсинга или уменьшения вероятности сплайсингового события на сайте сплайсинга.

[0377] В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:237, и кодируется полинуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:238. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:157. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:156. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 134, и кодируется полинуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 175, 200, 236 или 8, или полинуклеотидом, который демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 175, 200, 236 или 8. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет аминокислотную последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 174, которая кодируется полинуклеотидом, который необязательно был оптимизирован для использования кодонов и/или для уменьшения гетерогенности РНК.

[0378] В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:200.

C. Трансмембранный домен и компоненты внутриклеточной передачи сигналов

[0379] Компонент, распознающий антиген (например, антигенсвязывающий домен), как правило, связан с одной или несколькими внутриклеточными сигнальными областями, содержащими сигнальные компоненты, такие как сигнальные компоненты, которые имитируют стимуляцию и/или активацию через комплекс антиген-рецептор, такой как TCR комплекс, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий домен (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) связан с одним или несколькими трансмембранными доменами, такими как описанные в настоящей заявке, и внутриклеточными сигнальными областями или доменами, содержащими один или несколько внутриклеточных компонентов, таких как описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен слит с внеклеточным

доменом. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов рецептора, 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 поверхностной мембраны, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

[0380] Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получен либо из природного, либо из синтетического источника. Когда источник является природным, домен в некоторых аспектах получают из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные домены включают домены, полученные из (*т.е.* включают по меньшей мере трансмембранный домен(домены) альфа, бета или зета цепи Т-клеточного рецептора, CD3 эпсилон, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и/или CD154. Например, трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD28, который включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 138, кодируемую нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO:140. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен, полученный из CD8альфа. В некоторых вариантах осуществления CD8альфа представляет собой человеческий CD8альфа. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен включает преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет присутствовать на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связывание осуществляют посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(доменов).

[0381] Среди внутриклеточных сигнальных областей или доменов есть такие, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер от 2 до 10 аминокислот в длину, такой как линкер, содержащий глицины и серины, *например,* дублет глицин-серин, присутствует и образует связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом CAR.

[0382] Рецептор, *например,* CAR, как правило, включает внутриклеточную сигнальную область, включающую по меньшей мере один компонент внутриклеточной передачи сигналов, или компоненты. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент или сигнальный домен TCR комплекса, такой как CD3 цепь TCR, которая опосредует Т-клеточную активацию и цитотоксичность, *например*, зета цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах BCMA-связывающее антитело

связано с одним или более модулями клеточный передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления модули клеточный передачи сигналов 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 более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор γ, CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR включает химерную молекулу между CD3-зета (CD3-ζ) или Fc-рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

[0383] В некоторых вариантах осуществления в процессе или после лигирования CAR цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен CAR стимулирует и/или активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых случаях CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, например, секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления усеченную часть внутриклеточного сигнального домена компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или домены включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), а в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в естественном контексте действуют совместно с таким рецептором для запуска сигнальной трансдукции после связывания с антигенным рецептором, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, обладающую такой же функциональной способностью.

[0384] В контексте природного TCR, полная активация обычно требует не только передачи сигналов через TCR, но и костимулирующего сигнала. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для промотирования 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.

[0385] Активация Т-клеток в некоторых аспектах описывается как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах CAR включает один или оба таких класса цитоплазматических сигнальных последовательностей.

[0386] В некоторых аспектах CAR включает первичную цитоплазматическую

сигнальную последовательность, которая регулирует первичную стимуляцию и/или активацию TCR комплекса. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают те, которые происходят из TCR или CD3 зета, FcR гамма, CD3 гамма, CD3 дельта и CD3 эпсилон. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область или домен в CAR содержит цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления CD3 зета включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 143, кодируемую нуклеиновокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 144 или SEQ ID NO: 145.

[0387] В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальный домен (*например*, внутриклеточный или цитоплазматический сигнальный домен) и/или трансмембранную часть костимулирующей молекулы, такой как костимулирующая молекула Т-клеток. Иллюстративные костимулирующие молекулы включают CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 и ICOS. Например, костимулирующая молекула может происходить из 4-1BB и может включать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, кодируемую нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. В некоторых аспектах такой CAR включает как стимулирующие или активирующие компоненты (*например*, цитоплазматическую сигнальную последовательность), так и костимулирующие компоненты.

[0388] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие или активирующие компоненты включены в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR включают активирующие или стимулирующие CAR и костимулирующие CAR, экспрессируемые на одной и той же клетке (см. WO 2014/055668). В некоторых аспектах CAR, нацеленный на BCMA, является стимулирующим или активирующим CAR; в других аспектах это костимулирующий CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно включают ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от BCMA, посредством чего стимулирующий или активирующий сигнал, доставляемый через BCMA-нацеленный CAR, ослабляется или ингибируется за счет связывания ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

[0389] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает трансмембранный и сигнальный домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (*например*, CD3-зета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает химерный костимулирующий домен CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанный с внутриклеточным доменом CD3 зета.

[0390] В некоторых вариантах осуществления CAR включает один или более, *например* два или более, костимулирующих доменов и стимулирующий или активирующий домен, *например*, первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR включают внутриклеточные компоненты CD3-зета, CD28 и 4-1BB.

[0391] В некоторых вариантах осуществления представленный химерный антигенный рецептор включает: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически распознает B-клеточный антиген созревания (BCMA), такой как любой антигенсвязывающий домен, описанный в настоящей заявке; (b) спейсер, имеющий длину по меньшей мере 125 аминокислот; (c) трансмембранный домен; и (d) внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включающий V_H область и V_L область, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включающий V_H область, которая представляет собой или включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности V_H области SEQ ID NO: 116, и V_L область, которая представляет собой или включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности V_L области SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включающий V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включающий V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включающий V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие SEQ ID NO: 95, 99 и 103, соответственно, и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включающий V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие SEQ ID NO: 94, 98 и 102, соответственно, и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие SEQ ID NO: 104, 106 и 108, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора включает V_H область, которая представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, и V_L область, которая представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора, включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

[0392] В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область

включает стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен способен индуцировать первичный активирующий сигнал в Т-клетке, представляет собой компонент Т-клеточного рецептора (TCR) и/или включает иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых вариантах осуществления стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи или его функциональный вариант или сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий цитоплазматический домен является человеческим или получен из человеческого белка. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий цитоплазматический домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая стимулирующий цитоплазматический домен, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:144, или представляет собой ее кодон-оптимизированную последовательность и/или вырожденную последовательность. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая стимулирующий цитоплазматический сигнальный домен, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:145. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область дополнительно включает костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область является человеческой или получена из человеческого белка. В других вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая костимулирующую область, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, или представляет собой кодон-оптимизированную последовательность и/или вырожденную последовательность вышеуказанной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая костимулирующую сигнальную область, включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. В некоторых

вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен, происходящий из CD4, CD28 или CD8. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен, происходящий из CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является человеческим или получен из человеческого белка. В других вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138.

[0393] Представлены химерные антигенные рецепторы, включающие: (1) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим В-клеточным антигеном созревания (BCMA), где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает: (i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью V_H области SEQ ID NO: 116; и (ii) вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с последовательностью V_L области любой из SEQ ID NO: 119; (2) спейсер, представленный в SEQ ID NO: 174, или где нуклеиновая кислота, кодирующая спейсер, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:200; (3) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен из человеческого CD28; и (4) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток. Также представлены полинуклеотиды, кодирующие такой химерный антигенный рецептор.

[0394] В некоторых вариантах осуществления V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в последовательности V_H области SEQ ID NO: 116; и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в последовательности V_L области SEQ ID NO: 119; или V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L область включает CDR-

L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно.

[0395] Представлены химерные антигенные рецепторы, включающие: (1) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с человеческим В-клеточным антигеном созревания (BCMA), где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает: вариабельную область тяжелой цепи(V_H), включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в последовательности V_H области SEQ ID NO: 116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в последовательности V_L области SEQ ID NO: 119; или V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в последовательности V_H области SEQ ID NO: 116; и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в последовательности V_L области SEQ ID NO: 119; или V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или V_H область включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие последовательность SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L область включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие последовательность SEQ ID NO:104, 106 и 108, соответственно; (2) спейсер, представленный в SEQ ID NO: 174, или где нуклеиновая кислота, кодирующая спейсер, представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:200; (3) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен из человеческого CD28; и (4) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен человеческой CD3-зета (CD3ζ) цепи и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток, необязательно из человеческого 4-1BB или человеческого CD28. Также представлены полинуклеотиды, кодирующие такой химерный антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен включает последовательность V_H области SEQ ID NO:116 и последовательность V_L области SEQ ID NO:119. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен такого рецептора включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления другие домены, области или компоненты химерного антигенного рецептора включают любые домены, области или компоненты, описанные в настоящей заявке.

D. Суррогатный маркер

[0396] В некоторых вариантах осуществления CAR или полинуклеотид, который

кодирует CAR, дополнительно включает суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности (например, усеченный маркер клеточной поверхности), который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессиии рецептора. Например, в некоторых аспектах внешние маркерные гены используются в связи с терапиями сконструированными клетками для обеспечения возможности детекции или отбора клеток и, в некоторых случаях, также для стимуляции самоубийства клеток посредством ADCC. Типичные маркерные гены включают усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt), который может совместно экспрессироваться с представляющим интерес трансгеном (например, CAR или TCR) в трансдуцированных клетках (см., например, патент США № 8802374). EGFRt содержит эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Эрбитукс®). По этой причине Эрбитукс® можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые были сконструированы с конструкцией EGFRt, в том числе клеток, сконструированных совместно с другим рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR). Кроме того, EGFRt обычно используется в качестве механизма самоубийства в связи с клеточной терапией. В некоторых аспектах, когда EGFRt коэкспрессируется в клетках с представляющим интерес трансгеном (например, CAR или TCR), моноклональное антитело цетуксимаб может нацеливать его на снижение или истощение модифицированных переносимым геном клеток посредством ADCC (см. патент США № 8802374 и Liu et al., Nature Biotech, 2016, апрель, 34(4): 430-434). Важно отметить, что основанный на киллинге подход с использованием tEGFR требует наличия эпитопа антитела. Другим примером такого маркерного гена является простата-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. PSMA или его модифицированные формы могут включать последовательность аминокислот, связываемую или распознаваемую PSMA-нацеленной молекулой, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. PSMA-нацеленные молекулы можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые были сконструированы с PSMA или модифицированной конструкцией, в том числе в клетках, также сконструированных совместно с другим рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR), представленный в настоящей заявке. В некоторых аспектах маркер включает весь или часть (например, усеченную форму) CD34, рецептор фактора роста нервов (NGFR), рецептор эпидермального фактора роста (например, EGFR) или PSMA.

[0397] Примеры суррогатных маркеров могут включать усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые являются нефункциональными и не трансдуцируют или не способны трансдуцировать какой-либо сигнал или сигнал, обычно трансдуцируемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/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, типичная

последовательность tEGFR, представленная в SEQ ID NO:246) или простата-специфический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Эрбитукс®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или отбора клеток, сконструированных с конструкцией tEGFR и кодируемым экзогенным белком, и/или для элиминации или разделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. патент США № 8802374 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 нечеловеческий CD19, или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает 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 усиленные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или включает 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, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), β-глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

[0398] В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает полипептид, придающий резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген резистентности к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген резистентности к антибиотикам, придающий резистентность к антибиотикам клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает 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.

[0399] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например T2A. См. WO 2014031687. В некоторых вариантах осуществления введение конструкции, кодирующей CAR и суррогатный маркер, разделенной рибосомным переключателем T2A,

может экспрессировать два белка из одной и той же конструкции, так что суррогатный маркер можно использовать в качестве маркера для обнаружения клеток, экспрессирующих такую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления суррогатный маркер и необязательно линкерная последовательность могут быть любыми, как описано в международной публикации № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR) или PSMA, который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность 2A (например, расщепляемый линкер T2A, P2A, E2A или F2A, описанный в другом разделе настоящей заявки). Иллюстративный полипептид для усеченного суррогатного маркера EGFR включает последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:246, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO:246. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или включает богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры.

[0400] В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, в природе не встречающийся на Т-клетках или не обнаруживаемый в природе на поверхности Т-клеток, или его часть.

[0401] В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой чужеродную молекулу, например чужеродный белок, т.е. такой, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, которому клетки будут адоптивно перенесены.

[0402] 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 отбора 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 после адоптивного переноса и контакта с лигандом.

[0403] В некоторых случаях CAR указаны как 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 или в ответ на него; в некоторых аспектах CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, например CD28 или CD137 (т.е. 4-1BB); в некоторых аспектах CAR третьего поколения в некоторых аспектах представляет собой CAR, который включает несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

[0404] В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор

включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанные в настоящей заявке. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанные в настоящей заявке, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv или однодоменное антитело, включающее только V_H область, а внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен зета цепи CD3-зета (CD3ζ) цепи. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны непосредственно или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный связаны спейсером, таким как любой, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы (*например*, костимулирующей молекулы Т-клеток), например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах костимулирующая молекула Т-клеток представляет собой CD28 или 4-1BB.

[0405] В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рецептора (*например*, CAR) представляет собой трансмембранный домен человеческого CD28 или его вариант, *например*, 27-аминокислотный трансмембранный домен человеческого CD28 (Accession No.: P10747.1). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен человеческого CD28 или его функциональный вариант, такой как состоящий из 41 аминокислоты домен и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного CD28 белка. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или его функциональный вариант, такой как 42-аминокислотный цитоплазматический домен человеческого 4-1BB (Accession No. Q07011.1). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает стимулирующий сигнальный домен CD3 зета человека или его функциональный вариант, такой как 112 AA цитоплазматический домен изоформы 3 человеческого CD3ζ (Accession No.: P20963.2) или сигнальный домен CD3 зета, как описано в патенте США №: 7446190.

[0406] Например, в некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело к BCMA или фрагмент, например любое из человеческий антител к BCMA, включая sdAb и scFv, описанные в настоящей заявке, спейсер, такой как любой из Ig-шарнир-содержащих спейсеров, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело к BCMA или фрагмент, такой как любой из человеческих антител к BCMA, включая sdAb и scFv, описанные в настоящей заявке, спейсер такой как любой из Ig-

шарнир-содержащих спейсеров, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 зета. В некоторых вариантах осуществления такие конструкции CAR дополнительно включают T2A элемент с рибосомальным проскоком и/или последовательность tEGFR, *например*, ниже от CAR.

[0407] В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические рекомбинантные рецепторы, такие как мультиспецифические CAR, могут содержать любые мультиспецифические антитела, включая, *например,* биспецифические антитела, мультиспецифические одноцепочечные антитела, *например*, диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv и тандемные три-scFv, например любые, которые описаны выше в Разделе I.A.

[0408] Другие иллюстративные BCMA-специфические CAR, используемые в вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, включают Идекабтаген виклейсел (Ide-cel, bb2121; Raje et al. N Engl J Med. 2019. 380:1726-1737), JNJ-4528 (Madduri et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 577)/LCAR-B38M (Wang et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 579), P-BCMA-101 (Costello et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 3184), bb21217 (Berdeja et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 927), CT103A (Li et al. Blood. 2019;134(Supplement_1):929), CT053 (Ji et al., Blood. 2019;134(Supplement_1):4435), MTV273, CART-BCMA, C-CAR088 (Yao et al. Blood. 2019;134(Supplement_1):50) или любую BCMA-направленную CAR T терапию, описанную, например, в WO 2018/085690; WO 2016/094304; WO 2018/085690; WO 2016/014789; WO 2019/108900; WO/2018/014038; WO 2017/173256; WO 2016/090320, WO 2016/090327, WO 2019/090003; WO 2017/025038; US 2016/0046724; US 2017/0183418; Fu et al., Blood. 2019;134:3154; Cohen et al. J. Clin. Invest. 2019. 129(6): 2210-2221; Ali et al., Blood 2016;128(13):1688 1700; Borrello et al., J Clin Invest. 2019;129(6):2175-2177; Lin et al. Molecular Cancer (2019) 18:154; и Steiner et al., (2020) memo - Magazine of European Medical Oncology 13:43-49).

[0409] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA CAR включает V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:257, 258 и 259, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:260, 261 и 262, соответственно; и/или V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127; и/или аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:265, и/или последовательности, кодируемой SEQ ID NO:266. В некоторых аспектах анти-BCMA CAR включает последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO:265. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA CAR включает V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260, 261 и 262, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 257, 258 и 259, соответственно; и/или V_H область,

включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127; и/или аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:263, и/или последовательности, представленной в SEQ ID NO:264. В некоторых аспектах анти-BCMA CAR включает последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO:263. В некоторых аспектах анти-BCMA CAR включает последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO: 312. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR представляет собой или включает Идекабтаген виклейсел (Ide-cel, bb2121) (см., например, Raje et al. N Engl J Med. 2019. 380:1726-1737; WO 2018/085690; WO 2016/094304; WO 2018/085690 или WO 2016/014789). В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфические CAR включают такие, которые описаны в WO 2018/085690; WO 2016/094304; WO 2018/085690 или WO 2016/014789, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

[0410] В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA CAR представляет собой мультивалентный CAR, такой как связывающийся с двумя эпитопами CAR, например CAR, включающий два разных однодоменных антитела, например VHH, направленных на разные эпитопы на BCMA. В некоторых аспектах анти-BCMA CAR связывается с одним или несколькими эпитопами BCMA, выбранными из последовательностей, представленных в SEQ ID NO:303-309. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR представляет собой или включает JNJ-4528 (также называемый LCAR-B38M) (см., например, Madduri et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 577; Wang et al. Blood. 2019. 134 (Supplement_1): 579; Xu et al. PNAS 2019. 116(19) 9543-9551; Zhao et al., Journal of Hematology & Oncology 11:141 (2018); WO 2018/028647; WO 2017/025038). В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA CAR включает аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302, и/или последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302, и/или CAR, кодируемый последовательностью нуклеотидов, которая кодирует CAR, представленный в любой из SEQ ID NO: 265-302; и/или любой описанный в WO 2018/028647 или WO 2017/025038, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления анти-BCMA CAR включает аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302.

[0411] В некоторых аспектах BCMA-специфический CAR включает Центирин в качестве внеклеточного связывающего домена, вместо одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv). В некоторых аспектах центирины представляют собой модифицированные белки домена фибронектина типа III (FN3) с высокой специфичностью и широким диапазоном аффинностей связывания, но они меньше, чем scFv (см., например, Goldberg et al., Protein Eng Des Sel. 2016 Dec;29(12):563-572). В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR P-BCMA-101 (Costello et al. Blood. 2019. 134

(Supplement_1): 3184; Fu et al., Blood. 2019;134:3154; WO 2018/014038 и WO 2019/173636). В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR включает аминокислотные остатки 22-334 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 310, и/или последовательность зрелого полипептида последовательности, представленной в SEQ ID NO:310, и/или CAR кодируемый последовательностью нуклеотидов, которая кодирует CAR, представленный в любой из SEQ ID NO:310 и/или любой описанный в WO 2018/014038 или WO 2019/173636, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления BCMA-специфический CAR включает аминокислотные остатки 22-334 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 310.

E. Иллюстративные характерные признаки BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов

[0412] В некоторых аспектах антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных рецепторах, экспрессируемых сконструированными клетками, имеют одну или более определенных функциональных характеристик, таких как связывающие свойства, включая распознавание или связывание с конкретными эпитопами, например с эпитопами, которые подобны или перекрываются с теми, которые специфически связываются другими антителами, такими как эталонные антитела, или эпитопами, которые являются отличными от тех, которые специфически связываются другими антителами, такими как эталонные антитела, способность конкурировать за связывание с другими антителами, такими как эталонные антитела, и/или специфическая аффинность связывания. В других вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных рецепторах, распознают, например, специфически распознают, или связываются, например, специфически связываются, с эпитопами, которые отличаются от эпитопов, или не перекрываются с ними, которые специфически связываются другими антителами, такими как эталонные антитела. Например, эпитопы, специфически связываемые антителами, в рекомбинантных рецепторах, являются отличными от тех, которые специфически связываются другими антителами, такими как эталонные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела и их антигенсвязывающие фрагменты не конкурируют непосредственно за связывание, или конкурируют в меньшей степени, с другими антителами, такими как эталонные антитела.

[0413] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают или специфически связываются с белком BCMA. В любом из вариантов осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в рекомбинантных рецепторах, которые специфически распознают BCMA, специфически связывает BCMA. В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, белок BCMA относится к человеческому BCMA, мышиному белку BCMA или белку BCMA отличного от человека примата (*например*, обезьяны cynomolgus). В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке, белок BCMA относится к человеческому белку BCMA. То, что антитело

или рекомбинантные рецепторы связываются с белком BCMA или специфически связываются с белком BCMA, не обязательно означает, что они связываются с белком BCMA кажого вида. Например, в некоторых вариантах осуществления характеристики связывания с белком BCMA, такие как способность специфически связываться с ним, и/или конкурировать за связывание с ним с эталонным антителом, и/или связываться с определенной аффинностью или конкурировать в определенной степени, в некоторых вариантах осуществления относится к способности в отношении человеческого белка BCMA, и антитело может не обладать такой отличительной способностью в отношении белка BCMA другого вида, например мыши.

[0414] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком BCMA млекопитающего, включая природные варианты BCMA, такие как некоторые сплайсинговые варианты или аллельные варианты.

[0415] В некоторых вариантах осуществления антитела специфически связываются с человеческим белком BCMA, например с эпитопом или областью человеческого белка BCMA, такого как человеческий белок BCMA, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:164 (GenBank No. BAB60895.1), или SEQ ID NO:165 (NCBI No. NP_001183.2), или его аллельный вариант или сплайсинговый вариант. В одном варианте осуществления человеческий белок BCMA кодируется вариантом транскрипта или представляет собой изоформу, которая имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:163. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с белком BCMA обезьяны cynomolgus, таким как белок BCMA обезьяны cynomolgus, представленный в SEQ ID NO:147 (GenBank No. EHH60172.1). В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с человеческим BCMA, но не связываются, или связываются при более низком уровне или степени или аффинности связывания, с белком BCMA обезьяны cynomolgus, таким как белок BCMA обезьяны cynomolgus, представленный в SEQ ID NO:147 (GenBank No. EHH60172.1). В некоторых вариантах осуществления антитела не связываются, или связываются при более низком уровне или степени или аффинности связывания, с мышиным белком BCMA, таким как мышиный белок BCMA, представленный в SEQ ID NO:179 (NCBI No. NP_035738.1). В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с мышиным белком BCMA, таким как мышиный белок BCMA, представленный в SEQ ID NO:179 (NCBI No. NP_035738.1). В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с мышиным белком BCMA, с более низкой аффинностью по сравнению со связыванием с человеческим белком BCMA и/или белком BCMA обезьяны cynomolgus. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с мышиным белком BCMA и/или белком BCMA обезьяны cynomolgus с более низкой аффинностью по сравнению со связыванием с человеческим белком BCMA. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с мышиным белком BCMA и/или белком BCMA обезьяны cynomolgus с такой же аффинностью связывания, как их аффинность связывания с человеческим белком BCMA.

[0416] В некоторых вариантах осуществления представленный

антигенсвязывающий домен или CAR демонстрирует преимущественное связывание с мембраносвязанным BCMA по сравнению с растворимым BCMA. В некоторых вариантах осуществления представленный антигенсвязывающий домен или CAR демонстрирует более высокую аффинность связывания в отношении мембраносвязанного BCMA по сравнению с растворимым BCMA.

[0417] В одном варианте осуществления степень связывания анти-BCMA антитела или антигенсвязывающего домена или CAR с неродственным, не-BCMA белком, таким как нечеловеческий белок BCMA или другой не-BCMA белок, меньше чем или примерно 10% от связывания антитела или антигенсвязывающего домена или CAR с человеческим белком BCMA или человеческим мембраносвязанным BCMA, как измерено, *например*, радиоиммуноанализом (RIA). В некоторых вариантах осуществления среди антител или антигенсвязывающих доменов, в рекомбинантных рецепторах, есть антитела или антигенсвязывающие домены или рекомбинантные рецепторы, связывание которых с мышиным белком BCMA составляет менее чем или равно или около 10% от связывания антитела с человеческим белком BCMA. В некоторых вариантах осуществления среди антител или антигенсвязывающих доменов, в рекомбинантных рецепторах, есть антитела, связывание которых с белком BCMA обезьяны cynomolgus составляет менее чем или равно или около 10% от связывания антитела с человеческим белком BCMA. В некоторых вариантах осуществления среди антител или антигенсвязывающих доменов, в рекомбинантных рецепторах, есть антитела, связывание которых с белком BCMA обезьяны cynomolgus и/или мышиным белком BCMA является таким же, или примерно таким же, как связывание антитела с человеческим белком BCMA. В некоторых вариантах осуществления среди антител или антигенсвязывающих доменов, в рекомбинантных рецепторах, есть антитела или антигенсвязывающие домены или рекомбинантные рецепторы, связывание которых с растворимым белком BCMA составляет менее чем или равно или около 10% от связывания антитела с мембраносвязанным белком BCMA.

[0418] В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается, и/или конкурирует за связывание, с эталонным антителом, и/или связывается с определенной аффинностью, или конкурирует в определенной степени, с белком BCMA, *например*, человеческим BCMA, мышиным белком BCMA или белком BCMA отличного от человека примата (*например*, обезьяны cynomolgus).

[0419] В некоторых вариантах осуществления антитела, в рекомбинантных рецепторах, способны связывать белок BCMA, такой как человеческий белок BCMA, с по меньшей мере определенной аффинностью, измеренной любым из ряда известных способов. В некоторых вариантах осуществления аффинность представлена равновесной константой диссоциации (K_D); в некоторых вариантах осуществления аффинность представлена значением EC_{50}.

[0420] Известны различные анализы для оценки аффинности связывания и/или определения, связывается ли антитело или его фрагмент или рекомбинантный рецептор специфически с определенным лигандом (*например*, антигеном, таким как белок BCMA).

Квалифицированный специалист может определить аффинность связывания антитела или рекомбинантного рецептора в отношении антигена, *например,* BCMA, такого как человеческий BCMA или cynomolgus BCMA или мышиный BCMA, например, с использованием любого из различных анализов связывания, которые хорошо известны в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать устройство BIAcore® для определения кинетики и констант связывания комплекса между двумя белками (*например*, антитела или его фрагмента и антигена, такого как белок BCMA) с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (см., *например*, Scatchard *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci. 51*:660, 1949; Wilson, *Science 295*:2103, 2002; Wolff *et al.*, *Cancer Res. 53*:2560, 1993; и патенты США №№ 5283173, 5468614, или эквивалент).

[0421] SPR измеряет изменения концентрации молекул на поверхности сенсора по мере того, как молекулы связываются с поверхностью или диссоциируют от нее. Изменение сигнала SPR прямо пропорционально изменению массовой концентрации вблизи поверхности, что позволяет измерять кинетику связывания между двумя молекулами. Константу диссоциации комплекса можно определить, наблюдая за изменениями показателя преломления в зависимости от времени, когда над чипом пропускают буфер. Другие подходящие анализы для измерения связывания одного белка с другим включают, например, иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (RIA), или определение связывания путем наблюдения за изменением спектроскопических или оптических свойств белков посредством флуоресценции, УФ-поглощения, кругового дихроизма или ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Другие иллюстративные анализы включают, но не ограничиваются этим, Вестерн-блоттинг, ELISA, аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопию, проточную цитометрию, секвенирование и другие способы обнаружения экспрессированных полинуклеотидов или связывания белков.

[0422] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент или антигенсвязывающий домен CAR связывается, например специфически связывается, с антигеном, например с белком BCMA или эпитопом в этом белке, с аффинностью или K_A (*т.е.* равновесной константной ассоциации конкретного связывающего взаимодействия с единицами 1/M; равной отношению скорости ассоциации [k_{on} или k_a] к скорости диссоциации [k_{off} или k_d] для этой реакции связывания, предполагая бимолекулярное взаимодействие), равной или больше чем 10^5 M^{-1}. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент или антигенсвязывающий домен CAR демонстрирует аффинность связывания в отношении пептидного эпитопа с K_D (*т.е.* равновесной константой диссоциации определенного связывающего взаимодействия, с единицами M; равной отношению скорости диссоциации [k_{off} или k_d] к скорости ассоциации [k_{on} или k_a] для этой реакции связывания, предполагая бимолекулярное взаимодействие), равной или менее чем 10^{-5} M. Например, равновесная константа диссоциации K_D находится в пределах от 10^{-5} M до 10^{-13} M, например, от 10^{-7} M до 10^{-11} M, от 10^{-8} M до 10^{-10} M, или от 10^{-9} M до

10^{-10} М. Скорость ассоциации (константу скорости ассоциации; k_{on} или k_a; единицы 1/Мс) и скорость диссоциации (константу скорости диссоциации; k_{off} или k_d; единицы 1/с) можно определить с использованием любого из методов анализа, известных в данной области техники, например, поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0423] В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или константа диссоциации антитела (*например* антигенсвязывающего фрагмента) или антигенсвязывающего домена CAR с белком BCMA, таким как человеческий белок BCMA, составляет от или от около 0,01 нМ до около 500 нМ, от или от около 0,01 нМ до около 400 нМ, от или от около 0,01 нМ до около 100 нМ, от или от около 0,01 нМ до около 50 нМ, от или от около 0,01 нМ до около 10 нМ, от или от около 0,01 нМ до около 1 нМ, от или от около 0,01 нМ до около 0,1 нМ, составляет от или от около 0,1 нМ до около 500 нМ, от или от около 0,1 нМ до около 400 нМ, от или от около 0,1 нМ до около 100 нМ, от или от около 0,1 нМ до около 50 нМ, от или от около 0,1 нМ до около 10 нМ, от или от около 0,1 нМ до около 1 нМ, от или от около 0,5 нМ до около 200 нМ, от или от около 1 нМ до около 500 нМ, от или от около 1 нМ до около 100 нМ, от или от около 1 нМ до около 50 нМ, от или от около 1 нМ до около 10 нМ, от или от около 2 нМ до около 50 нМ, от или от около 10 нМ до около 500 нМ, от или от около 10 нМ до около 100 нМ, от или от около 10 нМ до около 50 нМ, от или от около 50 нМ до около 500 нМ, от или от около 50 нМ до около 100 нМ или от или от около 100 нМ до около 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или равновесная константа диссоциации, K_D, антитела с белком BCMA, таким как человеческий белок BCMA, находится на уровне или меньше чем или около 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с белком BCMA, таким как человеческий белок BCMA, с аффинностью связывания на субнаномолекулярном уровне, например, с аффинностью связывания меньше чем около 1 нМ, такой как меньше чем около 0,9 нМ, около 0,8 нМ, около 0,7 нМ, около 0,6 нМ, около 0,5 нМ, около 0,4 нМ, около 0,3 нМ, около 0,2 нМ или около 0,1 нМ или меньше.

[0424] В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания может быть классифицирована как высокая аффинность или как низкая аффинность. В некоторых случаях антитело или его фрагмент, или рекомбинантный рецептор, или антигенсвязывающий домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, который демонстрирует от низкой до умеренной аффинности связывания, демонстрирует K_A до 10^7 M^{-1}, до 10^6 M^{-1}, до 10^5 M^{-1}. В некоторых случаях антитело или его фрагмент или рекомбинантный рецептор, который демонстрирует высокую аффинность связывания с конкретным эпитопом, взаимодействует с таким эпитопом с K_A по меньшей мере 10^7 M^{-1}, по меньшей мере 10^8 M^{-1}, по меньшей мере 10^9 M^{-1}, по меньшей мере 10^{10} M^{-1}, по меньшей мере 10^{11} M^{-1}, по меньшей мере 10^{12} M^{-1}, или по меньшей мере 10^{13} M^{-1}. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или равновесная константа

диссоциации, K_D, анти-BCMA антитела или его фрагмента или антигенсвязывающего домена рекомбинантного рецептора, например CAR, с белком BCMA, составляет от или от около 0,01 нМ до около 1 мкМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 50 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 500 нМ, от 10 нМ до 100 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или константа диссоциации равновесной константы диссоциации, K_D, анти-BCMA антитела или его фрагмента или антигенсвязывающего домена рекомбинантного рецептора, например CAR, с белком BCMA, находится на уровне или около или менее чем 1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или меньше. Степень аффинности конкретного антитела можно сравнить с аффинностью известного антитела, такого как эталонное антитело.

[0425] В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания анти-BCMA антитела или антигенсвязывающего домена рекомбинантного рецептора, например CAR, в отношении других антигенов, например белков BCMA от других видов, можно сравнить для определения межвидовой перекрестной реактивности. Например, межвидовая перекрестная реактивность может быть классифицирована как высокая перекрестная реактивность или низкая перекрестная реактивность. В некоторых вариантах осуществления равновесную константу диссоциации, K_D, для различных антигенов, например, белков BCMA разных видов, таких как человек, обезьяна cynomolgus или мышь, можно сравнить для определения межвидовой перекрестной реактивности. В некоторых вариантах осуществления межвидовая перекрестная реактивность анти-BCMA антитела или антигенсвязывающего домена CAR может быть высокой, *например*, анти-BCMA антитело связывается с человеческим BCMA и видовым вариантом BCMA в равной степени, *например*, соотношение K_D для человеческого BCMA и K_D для видового варианта BCMA равно или около 1. В некоторых вариантах осуществления межвидовая перекрестная реактивность анти-BCMA антитела или антигенсвязывающего домена CAR может быть низкой, *например*, анти-BCMA антитело имеет высокую аффинность в отношении человеческого BCMA, но низкую аффинность в отношении видового варианта BCMA, или наоборот. Например, соотношение K_D для видового варианта BCMA и K_D для человеческого BCMA составляет более чем 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 2000 или более, и анти-BCMA антитело имеет низкую межвидовую перекрестную реактивность. Степень межвидовой перекрестной реактивности можно сравнить с межвидовой перекрестной реактивностью известного антитела, такого как эталонное антитело.

[0426] В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания анти-BCMA антитела или антигенсвязывающего домена CAR в отношении других форм или топологического типа антигенов, *например* растворимого белка BCMA, сравнивали с аффинностью связывания с мембраносвязанным BCMA для определения

предпочтительного связывания или относительной аффинности в отношении конкретной формы или топологического типа. Например, в некоторых аспектах представленные анти-BCMA антитела или антигенсвязывающие домены могут демонстрировать преимущественное связывание с мембраносвязанным BCMA по сравнению с растворимым BCMA и/или демонстрировать более высокую аффинность связывания в отношении мембраносвязанного BCMA по сравнению с растворимым BCMA. В некоторых вариантах осуществления равновесную константу диссоциации, K_D, для разных форм или топологического типа белков BCMA можно сравнить для определения предпочтительного связывания или относительной аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание или относительная аффинность к мембраносвязанному BCMA по сравнению с растворимым BCMA могут быть высокими. Например, в некоторых случаях отношение K_D для растворимого BCMA и K_D для мембраносвязанного BCMA составляет более чем 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 2000 или более, и антитело или антигенсвязывающий домен преимущественно связывается или имеет высокую аффинность связывания в отношении мембраносвязанного BCMA. В некоторых случаях отношение K_A для мембраносвязанного BCMA и K_A для растворимого BCMA составляет более чем 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 2000 или более, и антитело или антигенсвязывающий домен преимущественно связывается или имеет высокую аффинность связывания в отношении мембраносвязанного BCMA. В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий домен CAR связывает растворимый BCMA и мембраносвязанный BCMA в равной степени, *например*, отношение K_D для растворимого BCMA и K_D для мембраносвязанного BCMA равно или около 1. В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий домен CAR связывает растворимвй BCMA и мембраносвязанный BCMA в равной степени, *например*, отношение K_A для растворимого BCMA и K_A для мембраносвязанного BCMA равно или около 1. Степень предпочтительного связывания или относительной аффинности в отношении мембраносвязанного BCMA или растворимого BCMA можно сравнить с характеристиками известного антитела, такого как эталонное антитело.

[0427] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных рецепторах, например CAR, связываются в одинаковой степени с человеческим белком BCMA и не-человеческим белком BCMA или другими не-BCMA белками. Например, в некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты или антигенсвязывающий домен CAR связываются с человеческим белком BCMA, таким как человеческий белок BCMA, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:164 (GenBank No. BAB60895.1) или SEQ ID NO:165 (NCBI No. NP_001183.2), или его аллельный вариант или сплайсинговый вариант, с равновесной константой диссоциации (K_D), и с не-человеческим BCMA, таким как BCMA обезьяны cynomolgus, такой как белок BCMA обезьяны cynomolgus, представленный в SEQ ID NO:147 (GenBank No. EHH60172.1), с K_D такой же или примерно такой же, или отличающейся менее чем в 2 раза или менее чем в 5 раз.

[0428] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных рецепторах, например CAR, связываются в одинаковой степени с растворимым белком BCMA и мембраносвязанным белком BCMA с равновесной константой диссоциации (K_D), которая является такой же или примерно такой же, или отличающейся менее чем в 2 раза или менее чем в 5 раз.

[0429] Например, в некоторых вариантах осуществления антитела, в рекомбинантных рецепторах, например CAR, или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с человеческим BCMA с K_D примерно или меньше чем или около 1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или меньше, и связываются с BCMA обезьяны cynomolgus с K_D примерно или меньше чем или около 1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с мышиным белком BCMA с K_D примерно или меньше чем или около 1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ или 1 нМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в рекомбинантных рецепторах, например, CAR, связываются с человеческим BCMA, BCMA обезьяны cynomolgus и мышиным BCMA с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с человеческим BCMA и BCMA обезьяны cynomolgus с высокой аффинностью, а с мышиным BCMA с низкой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с человеческим BCMA и BCMA из других видов, или другими вариантами белка BCMA, с высокой аффинностью.

[0430] В некоторых вариантах осуществления общая связывающая способность (R_{max}), измеренная с использованием конкретных условий поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используется для определения способности или активности связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, например белком BCMA, таким как белок BCMA человека. Для SPR-анализа «лигандом» является иммобилизованная молекула-мишень на поверхности сенсора, например, белок BCMA, а «аналитом» является тестируемая молекула, например, антитело для связывания с «лигандом». Например, «аналит» может представлять собой любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с белком BCMA. Для конкретной пары лиганда и аналита в SPR можно определить R_{max}, исходя из модели стехиометрии связывания 1:1 для конкретных условий. Связывающую способность (R_{max}) определяли по следующей формуле: R_{max} (RU)=(молекулярная масса аналита)/(молекулярная масса лиганда) × уровень иммобилизованного лиганда (RU). Например, в конкретных условиях SPR R_{max} связывания между любым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом

и белком BCMA, таким как человеческий BCMA или BCMA обезьяны cynomolgus, составляет по меньшей мере или по меньшей мере около 50 резонансных единиц (RU), например, около 25 RU, 20 RU, 15 RU, 10 RU, 5 RU или 1 RU.

[0431] В некоторых вариантах осуществления антитела, такие как человеческие антитела, в CAR, специфически связываются с определенным эпитопом или областью белка BCMA, например, как правило, с внеклеточным эпитопом или областью. Белок BCMA представляет собой мембранный белок типа III, состоящий из 184 аминокислот, который содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. В соответствии с аминокислотной последовательностью человеческого BCMA, представленной в SEQ ID NO:164, внеклеточный домен соответствует аминокислотам 1-54, аминокислоты 55-77 соответствуют трансмембранному домену, а аминокислоты 78-184 соответствуют цитоплазматическому домену.

[0432] Среди рекомбинантных рецепторов, например, CAR, существуют рекомбинантные рецепторы, например, CAR, которые демонстрируют антиген-зависимую активность или передачу сигналов, т.е. сигнальную активность, которая заметно отсутствует или находится на фоновом уровне в отсутствие антигена, например, BCMA. Таким образом, в некоторых аспектах рекомбинантные рецепторы, например, CAR, не демонстрируют или демонстрируют не более чем фоновый или допустимый или низкий уровень тонической передачи сигналов или антиген-независимой активности или передачи сигналов в отсутствие антигена, например, BCMA. В некоторых вариантах осуществления представленные клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, демонстрируют биологическую активность или функцию, включая цитотоксическую активность, продукцию цитокинов и способность к пролиферации.

[0433] В некоторых вариантах осуществления биологическую активность или функциональную активность химерного рецептора, такую как цитотоксическая активность, можно измерить с использованием любого из ряда известных способов. Активность можно оценить или определить in vitro или in vivo. В некоторых вариантах осуществления активностm можно оценить после введения клеток субъекту (например, человеку). Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном, например, in vivo, например, методом визуализации, или ex vivo, например, методом ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерить с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), and Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток также можно измерить при помощи анализа экспрессии и/или секреции некоторых цитокинов, таких как интерлейкин-2 (IL-2), интерферон-гамма (IFNγ), интерлейкин-4 (IL-4), TNF-альфа (TNFα), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-12 (IL-12), гранулоцитарно-макрофагальный

колониестимулирующий фактор (GM-CSF), CD107a и/или TGF-бета (TGFβ). Анализы для измерения цитокинов хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, ELISA, внутриклеточное окрашивание цитокинов, цитометрический анализ на гранулах, RT-PCR, ELISPOT, проточную цитометриию и биоанализы, в которых клетки, реагирующие на соответствующий цитокин, оценивают на респонсивность (*например,* пролиферацию) в присутстви образца для анализа. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение опухолевого бремени или нагрузки.

[0434] В некоторых аспектах репортерную клеточную линию можно использовать для мониторинга антиген-независимой активности и/или тонической передачи сигналов через анти-BCMA CAR-экспрессирующие клетки. В некоторых вариантах осуществления линия Т-клеток, такая как линия клеток Jurkat, содержит репортерную молекулу, такую как флуоресцентный белок, или другую детектируемую молекулу, такую как красный флуоресцентный белок, экспрессируемую под контролем эндогенных транскрипционных регуляторных элементов Nur77. В некоторых вариантах осуществления экспрессия репортера Nur77 является присущим клетке свойством и зависит от передачи сигнала через рекомбинантный репортер, содержащий первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, содержащий мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM), такой как цепь CD3ζ. На экспрессию Nur77, как правило, не влияют другие пути передачи сигналов, такие как передача сигналов цитокинов или передача сигналов toll-подобных рецепторов (TLR), которые могут действовать внешним для клетки образом и могут не зависеть от передачи сигналов через рекомбинантный рецептор. Таким образом, только клетки, которые экспрессируют экзогенный рекомбинантный рецептор, т.е. анти-BCMA CAR, содержащий соответствующие сигнальные области, способны экспрессировать Nur77 при стимуляции (например, при связывании специфического антигена). В некоторых случаях экспрессия Nur77 также может демонстрировать дозозависимый ответ на количество стимуляции (например, антигена).

[0435] В некоторых вариантах осуществления представленные анти-BCMA CAR демонстрируют улучшенную экспрессию на поверхности клеток, например, по сравнению с альтернативным CAR, который имеет идентичную аминокислотную последовательность, но кодируется нуклеотидной последовательностью без удаления сайта сплайсинга и/или кодон-оптимизированной. В некоторых вариантах осуществления можно оценить экспрессию рекомбинантного рецептора на поверхности клетки. Подходы к определению экспрессии рекомбинантного рецептора на поверхности клетки могут включать использование химерный антигенный рецептор (CAR)-специфических антител (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 и моноклональных антител, которые специфически связываются с полипептидом CAR (см. публикацию международной патентной заявки № WO 2014190273). В некоторых вариантах осуществления экспрессию рекомбинантного

рецептора на поверхности клетки, например, первичной Т-клетки, можно оценить, например, методом проточной цитометрии с использованием связывающих молекул, которые могут связываться с рекомбинантным рецептором или его частью, которая может быть обнаруженной. В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы используются для детекции экспрессии антиидиотипического антитела к рекомбинантному рецептору, например, антиидиотипического антитела-агониста, специфического в отношении связывающего домена, например, scFv, или его части. Типичные антиидиотипические антитела описаны в PCT/US2020/063492, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой или включает выделенный или очищенный антиген, например рекомбинантно экспрессированный антиген.

F. Мультиспецифические антитела

[0436] В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор является мультиспецифическим. Мультиспецифические рекомбинантные рецепторы включают биспецифические рецепторы. Мультиспецифические партнеры по связыванию, *например,* антитела, обладают специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных сайтов, которые могут быть в одном и том же или разных антигенах. В некоторых вариантах осуществления, одной из специфичностей связывания является специфичность в отношении BCMA, а другой - специфичность в отношении другого антигена. В некоторых вариантах осуществления дополнительные связывающие домены связываются с третьим или более антигенами и/или распознают их. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами BCMA. Биспецифическое антитела также можно использовать для обеспечения локализации цитотоксических средств в клетах, которые экспрессируют BCMA. Биспецифическое антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител. Мультиспецифические антитела включают мультиспецифические одноцепочечные антитела, *например*, диатела, триатела и тетратела, тандемные ди-scFv и тандемные три-scFv. Также представлены мультиспецифическ химерные рецепторы, такие как мультиспецифические CAR, содержащие антитела (*например*, антигенсвязывающие фрагменты). Также представлены мультиспецифические клетки, содержащие антитела или включающие их полипептиды, такие как клетки, содержащие белок клеточной поверхности, включающий анти-BCMA антитело, и дополнительный белок клеточной поверхности, такой как дополнительный химерный рецептор, который связывается с другим антигеном или другим эпитопом на BCMA.

[0437] Иллюстративные антигены включают В-клеточные специфические антигены, другие опухоль-специфические антигены, такие как антигены, которые специфически экспрессируются или ассоциированы с лейкозом (*например*, В-клеточным лейкозом), лимфомой (*например*, лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой и т.д.), или миеломой, *например*, множественной миеломой (ММ), злокачественным

новообразованием из плазматических клеток (*например*, плазмоцитомой). Например, антигены включают те, которые экспрессируются специфически или ассоциированы с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (CLL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (DLBCL), острым миелоидным лейкозом (AML), острым лимфоцитарным лейкозом (ALL), лимфомой Беркитта (например, эндемической лимфомой Беркитта или спорадической лимфомой Беркитта), мантийно-клеточной лимфомой (MCL), немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), хроническим миелоидным (или миелогенным) лейкозом (CML), волосистоклеточным лейкозом (HCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (SLL), лимфомой маргинальной зоны, лимфомой Ходжкина (HL), неходжкинской лимфомой (NHL), анапластической крупноклеточной лимфомой (ALCL), рефрактерной фолликулярной лимфомой, макроглобулинемией Вальденстрема, фолликулярной лимфомой, мелкоклеточной лимфомой с нерасщепленным ядром, мукоза-ассоциированной лимфомой лимфатической ткани (MALT), лимфомой маргинальной зоны, нодальной моноцитоидной В-клеточной лимфомой, иммунобластной лимфомой, крупноклеточной лимфомой, диффузной смешанноклеточной лимфомой, легочной В-клеточной ангиоцентрической лимфомой, малой лимфоцитарной лимфомой, первичной медиастинальной В-клеточной лимфомой, лимфоплазмоцитарной лимфомой (LPL), нейробластомой, почечно-клеточным раком, раком толстой кишки, колоректальным раком, раком молочной железы, эпителиальным плоскоклеточным раком, меланомой, миеломой, такой как множественная миелома (например, несекреторная множественная миелома, вялотекущая множественная миелома), раком желудка, раком пищевода, раком головного мозга, раком легкого (например, мелкоклеточным раком легкого), раком поджелудочной железы, раком шейки матки, раком яичников, раком печени (например, карциномой печени, гепатомой и т.д.), раком мочевого пузыря, раком предстательной железы, тестимулярным раком, раком щитовидной железы, раком матки, раком селезенки (например, лимфомой селезенки), раком надпочечников и/или раком головы и шеи, и антигены, экспрессируемые на Т-клетках.

[0438] В некоторых вариантах осуществления второй или дополнительные антигены для стратегий множественного нацеливания включают те, в которых по меньшей мере один из антигенов является универсальным опухолевым антигеном или членом его семейства. В некоторых вариантах осуществления второй или дополнительный антиген представляет собой антиген, экспрессируемый на опухоли. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающие домены, например, рекомбинантного рецептора, нацелены на антиген того же типа опухоли, что и второй или дополнительный антиген. В некоторых вариантах осуществления второй или дополнительный антиген также может быть универсальным опухолевым антигеном или может быть опухолевым антигеном, специфическим для типа опухоли.

[0439] Иллюстративные вторые или дополнительные антигены включают CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, CD138, B7, MUC-1, Ia, HM1,24, HLA-DR,

тенасцин, фактор ангиогенеза, VEGF, PIGF, ED-B фибронектин, онкоген, онкогенный продукт, CD66a-d, антигены некроза, Ii, IL-2, T101, TAC, IL-6, ROR1, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), Her2, L1-CAM, мезотелин, CEA, поверхностный антиген гепатита B, антифолатный рецептор, CD24, CD30, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, ErbB3, ErbB4, erbB димеры, EGFR vIII, FBP, FCRL5, FCRH5, фетальный ацетилхолиновый рецептор, GD2, GD3, член D группы 5 класса C связанных с G-белками рецепторов (GPRC5D), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкую цепь каппа, Lewis Y, L1-молекулу клеточной адгезии (L1-CAM), Меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), сурвивин, EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, IL-13 рецептор a2 (IL-13Ra2), CA9, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE Al, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, фолатный рецептор-a, CD44v6, CD44v7/8, avb6 интегрин, 8H9, NCAM, рецепторы VEGF, 5T4, фетальный AchR, лиганды NKG2D, двойной антиген, антиген, связанный с универсальной меткой, антиген рака яичка, MUC1, MUC16, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), простата-специфический антиген, PSMA, Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, эфринB2, CD123, c-Met, GD-2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), CE7, Опухоль Вильмса 1 (WT-1), а циклин, циклин A2, CCL-1, hTERT, MDM2, CYP1B, WT1, ливин, AFP, p53, циклин (D1), CS-1, BAFF-R, TACI, CD56, TIM-3, CD123, L1-молекулу клеточной адгезии, MAGE-A1, MAGE A3, циклин, такой как циклин A1 (CCNA1) и/или патоген-специфический антиген, биотинилированные молекулы, молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV и/или другими патогенами, и/или в некоторых аспектах их неоэпитопы или неоантигены. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с универсальной меткой или представляет собой универсальную метку.

[0440] В некоторых аспектах антиген, например, второй или дополнительный антиген, такой как специфический для заболевания антиген и/или связанный с ним антиген, экспрессируется при множественной миеломе, такой как член D группы 5 класса C связанных с G-белками рецепторов (GPRC5D), CD38 (циклическая АДФ-рибозогидролаза), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подгруппа 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие типичные антигены множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 и рецептор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46. В некоторых вариантах осуществления антигены включают антигены, присутствующие в лимфоидных опухолях, миеломе, СПИД-ассоциированной лимфоме и/или посттрансплантационных лимфопролиферациях, такие как CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, описанные в патентах США №№ 8153765; 8603477, 8008450; публикациях США №№ US20120189622 или US20100260748; и/или

международных публикациях PCT №№ WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612 или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в мультиспецифических антителах, мультиспецифических химерных рецепторах, таких как мультиспецифические CAR, и/или мультиспецифических клетках.

G. Оптимизированные анти-BCMA CAR полинуклеотиды

[0441] В некоторых вариантах осуществления исходную или эталонную последовательность, кодирующую трансген, такой как BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, например анти-BCMA CAR, оценивают на кодон-оптимизацию и/или удаления сайта сплайсинга.

[0442] В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют на анти-BCMA CAR, таком как CAR, содержащий антигенсвязывающий домен scFv, специфический в отношении BCMA, спейсер, такой как спейсер, представленный в SEQ ID NO:174, костимулирующую сигнальную область, такую как костимулирующий сигнальный домен из 4-1BB и сигнальная область CD3 зета. Примеры идентифицированных донорных сайтов сплайсинга и акцепторных сайтов сплайсинга, а также их соответствующие оценки представлены в Таблицах 7 и 8 ниже для иллюстративных анти-BCMA CAR.

Таблица 7

Предсказанные донорные сайты сплайсинга

	ИСХОДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ			**O/SSE ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**		
Область конструкции	донорный сайт сплайсинга	SEQ ID NO	Оценка сплайсинга	оптимизированный донорный сайт сплайсинга	SEQ ID NO	Оценка сплайсинга
промотор						
	cgtctag**gt**aagtt	206	1	без изменений		<0,7
Кодирующая scFv						
BCMA-23	gaccaag**gt**gaccgt	207	N/A	caccaag**gt**gaccgt	215	0,54
BCMA-26	tgcactg**gt**accagc	208	0,55	без изменений		
BCMA-52	taaactg**gt**accagc	209	0,76	tgaactg**gt**atcagc	216	<0,7
BCMA-52	atctcct**gt**aaggt	210	0,79	atctctt**ga**aatggt	217	<0,7
BCMA-52	ggtcaag**gt**actctg	211	0,85	ggccagg**gc**acactg	218	<0,7
BCMA-55	gaggaca**gt**aagcgg	212	0,66	gaggaca**gc**aagagg	219	<0,5
BCMA-55	ggtcaag**gt**actctg	213	0,85	ggccagg**ga**accctg	220	<0,5
BCMA-55	tgcctcc**gt**gtctgc	214	<0,50	tgccagc**gt**tagtgc	221	0,60
Кодирующая спейсер						
	aatctaa**gt**acggac	222	0,65	agtctaa**at**acggac	189	<0,7
	tcaactg**gt**acgtgg	223	0,96	tcaactg**gt**atgtgg	190	<0,7
	tcaattg**gt**acgtgg	254	0,97	tcaactg**gt**atgtgg	190	<0,7
	acaatta**gt**aaggca	224	0,43	accatct**cc**aaggcc	191	<0,7
	accacag**gt**gtatac	225	0,42	gccccag**gt**ttacac	192	<0,7
Кодирующая сигнальную область CD3зета						
	tttccag**gt**ccgccg	226	0,74	tcagcag**at**ccgccg	193	<0,7
Кодирующая усеченный рецепторный суррогатный маркер						
	ctgctct**gt**gagtta	227	0,56	ctcctgt**gt**gaactc	194	<0,7

	acgcaaa**gt**gtgtaa	228	0,5	tcggaaa**gt**gtgcaa	195	<0,7
	caacatg**gt**cagtt	229	0,71	cagcacg**gc**cagttt	196	<0,7
	aacagag**gt**gaaaac	230	0,42	aaccggg**gc**gagaac	197	<0,7
	ctggagg**gt**gagcca	231	0,82	ctggaag**gc**gagccc	198	<0,7
	tcttcat**gt**gagcgg	252	0,84	tgttcat**gt**gagcgg	199	<0,7

Таблица 8

Предсказанные акцепторные сайты сплайсинга

	ИСХОДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ			**O/SSE ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ**		
Область конструкции	акцепторный сайт сплайсинга	SEQ ID NO	оценка сплайсинга	оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга	SEQ ID NO	Оценка сплайсинга
Промотор						
	tggctccgccttttcccg**ag**ggtgggggagaaccgtatat	232	0,50	без изменений		
	tgaactgcgtccgccgtct**ag**gtaagtttaaagctcaggtc	233	0,71	без изменений		
	ttctgttctgcgccgttac**ag**atccaagctgtgaccggcgc	234	0,89	без изменений		
Кодирующая scFv						
BCMA-23	ctactacatgagctggatc**cg**ccaggctccagggaaggggc	26	N/A	ctactatatgtcctggatc**ag**acaggcacctggcaagggcc	27	0,46
BCMA-23	ggctgattattattgtagc**tc**atatggaggtagtaggtctt	25	N/A	ggcagattactattgttct**ag**ctacggcggcagcagatcct	28	0,55
BCMA-25	ctatgccatgtcctggttc**ag**gcaggcaccaggcaaggcc	43	0,95	ctatgccatgtcctggttc**aa**gcaggcaccaggcaagggcc	48	<0,7
BCMA-25	gtccgcctctgtgggcgat**ag**ggtgaccgtgacatgtcgcg	44	0,50	без изменений		

BCMA-25	gtgggctttatcc gctcta**ag**gccta cggcggcaccac aga	45	0,55	без изменений		
BCMA-25	gtgacatgtcgcg cctccc**ag**ggca tctctaactacctg gc	46	0,67	без изменений		
BCMA-25	tacagcgcctcca ccctgc**ag**agcg gagtgccctccc ggtt	47	0,66	без изменений		
BCMA-52	ctggccatcagtg gcctcc**ag**tctga ggatgaggctga tta	78	<0,50	ctggctatttctggactgc**ag**agcgaggacgaggccgac ta	80	0,62
BCMA-52	agatacagcccg tccttcc**aa**ggcc acgtcaccatctc agc	79	<0,50	agatacagccctagctttc**a g**ggccacgtgaccatcagc gc	81	0,67
BCMA-55	cgaggctgattat tactgc**ag**ctcaa atacaagaagca gca	110	0,79	cgaggccgattactactgc**a g**cagcaacacccggtccag ca	111	<0,40
BCMA-55	gccctcaggggtt tctaat**cg**cttctct ggctccaagtctg	109	<0,50	gcccagcggcgtgtccaat **ag**attcagcggcagcaaga gcg	112	0,40
Кодирующая спейсер						
	cgccttgtcctcct tgtcc**ag**ctcctc ctgttgccggacc t	203	0,84	cgccttgtcctccttgtcc**cg** ctcctcctgttgccggacct	188	<0,7
	aagtttctttctgta ttcc**ag**gctgacc gtggataaatctc	239	0,97	cagtttcttcctgtatagt**ag**a ctcaccgtggataaatcaa	180	<0,7
	aagtttctttctgta ttcc**ag**gctgacc gtggataaatctc	239	0,97	aagtttctttctgtattcc**ag**a ctgaccgtggataaatctc	187	
	gggcaacgtgttc tcttgc**ag**tgtcat gcacgaagccct gc	240	0,55	gggcaacgtgttcagctgc**a g**cgtgatgcacgaggccct gc	181	<0,7
	cagtttcttcctgt atagt**ag**actcac cgtggataaatca a	204	0,74	Без изменений		
Кодирующая CD28 TM						

	aggggtgctggc ctgttac**ag**cctg ctggtgacagtcg ctt	141	0,4	cggagtgctggcctgttac**a** **g**cctgctggttaccgtggcc t	182	0,75
Кодирующая сигнальную область 4-1BB/CD3зета						
	gctgagagtcaa gttttcc**ag**gtcc gccgacgctcca gcct	3	0,55	gctgagagtgaagttcagc**a** **g**atccgccgacgctccagc ct	183	<0,7
Кодирующая усеченный рецепторный суррогатный маркер						
	actcctcctctggat ccac**ag**gaactgg atattctgaaaac	249	0,74	acacctccactggatcccc**a** **a**gagctggatatcctgaaaa c	184	<0,7
	acagggtttttgctg attc**ag**gcttggcc tgaaaacaggac	250	0,73	accggattcctcctgatcc**a** **a**gcctggccagagaacaga ac	185	<0,7
	accggattcctcct gattc**ag**gcctgg ccagagaacagaa c	205	0,82	accggattcctcctgatcc**a** **a**gcctggccagagaacaga ac	185	<0,7
	atggtcagttttctct tgc**ag**tcgtcagcc tgaacataaca	251	0,89	acggccagtttagcctggc**t** **g**tggtgtctctgaacatcacc	186	<0,7

[0443] В некоторых вариантах осуществления полученную модифицированную последовательность(последовательности) нуклеиновой кислоты затем синтезируют и используют для трансдукции клеток для тестирования сплайсинга, на что указывает гетерогенность РНК. Иллюстративные способы являются следующими и описаны в примерах. Вкратце, РНК собирают из экспрессирующих клеток, амплифицируют при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) и разделяют методом электрофореза в агарозном геле для определения гетерогенности РНК по сравнению с исходной последовательностью. В некоторых случаях улучшенные последовательности могут быть снова предоставляться компании, осуществляющей генный синтез, для дальнейшей кодон-оптимизации и удаления сайта сплайсинга с последующей дальнейшей оценкой, модификацией, синтезом и тестированием криптического сайта сплайсинга до тех пор, пока РНК на агарозном геле не проявит минимальную гетерогенность РНК.

[0444] В некоторых вариантах осуществления представленные способы оптимизации кодирующей нуклеиновокислотной последовательности, кодирующей трансген, такой как анти-BCMA CAR, представленный в настоящей заявке, или конструкции, представленной в настоящей заявке, предназначены как для уменьшения, так и устранения криптических сайтов сплайсинга (иллюстративная спейсерная последовательность, кодон-оптимизированная и с удаленным сайтом сплайсинга,

например, представлена SEQ ID NO: 200) и оптимизации использования человеческих кодонов (иллюстративная кодон-оптимизированная спейсерная последовательность, например, представлена SEQ ID NO: 236). Иллюстративная стратегия оптимизации описана в примерах.

[0445] В некоторых вариантах осуществления представлены полинуклеотиды, кодирующие химерный антигенный рецептор, включающие нуклеиновую кислоту, кодирующую: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически распознает BCMA, включая любой из антигенсвязывающих доменов, описанных ниже; (b) спейсер, имеющий по меньшей мере 125 аминокислот длину; (c) трансмембранный домен; и (d) внутриклеточную сигнальную область, где после экспрессии полинуклеотида в клетке, транскрибированная РНК, необязательно матричная РНК (мРНК), из полинуклеотида, демонстрирует по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% гомогенности РНК. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает VH область и VL область включающие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает VH область, которая представляет собой или включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VH области, выбранной из SEQ ID NO: 116, и VL область, которая представляет собой или включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VL области, выбранной из SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, 99 и 103, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, 98 и 102, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, 106 и 108, соответственно; или VH область, которая представляет собой или включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 116, и VL область, которая представляет собой или включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления иллюстративный антигенсвязывающий домен в химерном

антигенном рецепторе, кодируемом полинуклеотидом, включает те, которые описаны в каждом ряду Таблицы 6 в настоящей заявке. В любом из таких вариантов осуществления трансмембранный домен CAR представляет собой или включает трансмембранный домен, полученный из a CD28; внутриклеточная сигнальная область включает цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, или его функциональный вариант или сигнальную часть, и костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

[0446] В некоторых вариантах осуществления представлены полинуклеотиды, кодирующие химерный антигенный рецептор, включающие нуклеиновую кислоту, кодирующую: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, который специфически распознает BCMA, включая любой из антигенсвязывающих доменов, описанных ниже; (b) (b) спейсер, где кодирующая нуклеиновая кислота представляет собой, или включает, или состоит, или состоит по существу из последовательности, представленной в SEQ ID NO:200, или кодирует последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO:174; (c) трансмембранный домен; и (d) внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает VH область и VL область, включающие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:116 и 119, соответственно, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:116 и 119, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает VH область, которая представляет собой или включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VH области, выбранной из SEQ ID NO: 116, и VL область, которая представляет собой или включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в аминокислотной последовательности VL области, выбранной из SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, 99 и 103, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно; или VH область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, 98 и 102, соответственно, и VL область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, 106 и 108, соответственно; или VH область, которая представляет собой или включает аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 116, и VL область, которая представляет собой или включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления иллюстративный антигенсвязывающий домен в химерном антигенном рецепторе, кодируемом полинуклеотидом, включает те, которые описаны в каждом ряду Таблицы 9 в настоящей заявке. В любом из таких вариантов осуществления трансмембранный домен CAR представляет собой или включает трансмембранный домен, полученный из CD28; внутриклеточная сигнальная область включает цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, или его функциональный вариант или сигнальную часть, и костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

[0447] Также в настоящей заявке представлены иллюстративные модифицированные полинуклеотиды, включая полинуклеотиды, которые были модифицированы для кодон-оптимизации (O) и/или удаления сайтов сплайсинга (SSE). Примеры таких полинуклеотидов представлены в Таблице 6, где представлены иллюстративные нуклеотидные (nt) последовательности для компонентов иллюстративных CAR конструкций до удаления сайта сплайсинга и кодон-оптимизации (non-opt), нуклеотидные (nt) последовательности для компонентов иллюстративных CAR конструкций после удаления сайта сплайсинга и оптимизации (O/SSE) и соответствующие аминокислотные (aa) последовательности, кодируемые нуклеиновокислотными последовательностями. Компоненты включают сигнальную последовательность (ss) IgG-каппа, анти-BCMA scFv, спейсерную область, трансмембранный (tm) домен, ко-сигнальную последовательность (4-1BB co-sig или CD28 co-sig), CD3-ζ сигнальный домен (CD3-ζ), T2A элемент с рибосомальным проскоком (T2A) и последовательность усеченного рецептора EGF (EGFRt). Полинуклеотидные последовательности иллюстративных CAR конструкций представлены в SEQ ID NO: 9-14, кодирующих аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 15-20.

Таблица 9

Иллюстративные BCMA CAR компоненты (SEQ ID NO)

Конструкция	Последовательность	ss	scFv	спейсер	TM	4-1BB костим.	CD3-ζ
BCMA-23-L CAR	non-opt (nt)	167	30	175	139	5	144
BCMA-23-L CAR CO/SSE	O/SSE (nt)	171	31	200 или 8	140	6	145
обе	aa	166	29	174	138	4	143
BCMA-25-L CAR	non-opt (nt)	167	50	175	139	5	144
BCMA-25-L CAR CO/SSE	O/SSE (nt)	169	51	200 или 8	140	6	145
обе	Aa	166	49	174	138	4	143
BCMA-26-L CAR	non-opt (nt)	167	59	175	139	5	144
BCMA-26-L CAR CO/SSE	O/SSE (nt)	168	60	200 или 8	140	6	145
обе	aa	166	58	174	138	4	143
BCMA-52-L CAR	non-opt (nt)	167	82	175	139	5	144
BCMA-52-L CAR CO/SSE	O/SSE (nt)	169	84	200 или 8	140	6	145
обе	Aa	166	83	174	138	4	143
BCMA-55-L CAR	non-opt (nt)	167	113	175	139	5	144
BCMA-55-L CAR CO/SSE	O/SSE (nt)	170	115	200 или 8	140	6	145
обе	aa	166	114	174	138	4	143
Конструкция	Последовательность	ss	scFv	спейсер	TM	CD28 co-stim	CD3-ζ
BCMA-55-L-CD28 CAR	non-opt (nt)	167	113	175	139	137	144
BCMA-55-L-CD28 CAR CO/SSE	O/SSE (nt)	170	115	200 или 8	140	137	145
обе	aa	166	114	174	138	136	143

III. Сконструированные клетки и способы получения сконструированных клеток

[0448] Также представлены клетки, такие как сконструированные клетки, которые содержат рекомбинантный рецептор (*например*, химерный антигенный рецептор), такой как иллюстративные рекомбинантные рецепторы, которые содержат внеклеточный домен, который связывается BCMA, описанные в настоящей заявке. Также представлены популяции таких клеток, композиции, содержащие такие клетки и/или обогащенные такими клетками, например, такие, в которых клетки, экспрессирующие BCMA-

связывающий рекомбинантный рецептор, составляют по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более от общего количества клеток в композиции или клеток определенного типа, таких как Т-клетки или CD8+ или CD4+ клетки. Композиции включают фармацевтические композиции и составы для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. Также представлены терапевтические способы для введения клеток и композиций субъектам, *например,* пациентам, и клетки и фармацевтические композиции для применения в таких способах.

[0449] Таким образом также представлены генетически сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы, содержащие антитела, *например,* клетки, содержащие CAR. Клетки обычно представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки, полученные из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, типично Т-клетки и/или NK-клетки. Другие иллюстративные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). Клетки обычно представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно у субъекта и/или выделенные у субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или несколько субпопуляций Т-клеток или других клеточных типов, например, целые Т-клеточные популяции, CD4+ клетки, CD8+ клетки и их субпопуляции, например определяемые по функции, состоянию активации, зрелости, потенциалу для дифференцировке, способности к экспансии, рециркуляции, локализации и/или персистенции, антигенной специфичности, типу антигенного рецептора, присутствию в конкретном органе или компартменте, профилю секреции маркеров или цитокинов и/или степени дифференцировки. Применительно к субъекту, подлежащему лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Способы включают стандартные способы. В некоторых аспектах, таких как стандартные технологии, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например, стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). В некоторых вариантах осуществления способы включают выделение клеток субъекта, их подготовку, обработку, культивирование и/или конструирование, как описано в настоящей заявке, и повторное введение их тому же пациенту до или после криоконсервации.

[0450] Подтипы и субпопуляции Т-клеток и/или CD4+ и/или CD8+ Т-клеток включают наивные Т-клетки (T_N), эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), Т-клетки центральной 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, мукоза-ассоциированные 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, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

[0451] В некоторых аспектах было обнаружено, что композиции, содержащие сконструированные клетки, экспрессирующие представленный иллюстративный BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, обогащены подтипами иммунных клеток, например, подтипами CD4+ или CD8+ Т-клеток, которые были связаны с фенотипом Т-клеток центральной памяти (T_{CM}), который в некоторых аспектах связан с повышенной персистентностью и долговечностью сконструированных клеток.

[0452] В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой природные киллерные клетки (NK). В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

[0453] В некоторых вариантах осуществления клетки включают один или несколько полинуклеотидов, введенных методом генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полинуклеотид, полученный из другого организма или клетки, который, например, обычно не присутствует в сконструированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды не встречаются в природе, например, полинуклеотиды, не встречающиеся в природе, включая полинуклеотиды, содержащие химерные комбинации полинуклеотидов, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки (например, сконструированные клетки) включают вектор (например, вирусный вектор, вектор экспрессии и т.д.), как описано в настоящей заявке, такой как вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный рецептор, описанный в настоящей заявке.

[0454] В конкретных примерах иммунные клетки, такие как иммунные клетки человека, используют для экспрессии представленных полипептидов, кодирующих химерные антигенные рецепторы. В некоторых примерах иммунные клетки представляют собой Т-клетки, такие как CD4+ и/или CD8+ иммунные клетки, включая первичные клетки, такие как первичные CD4+ и CD8+ клетки.

[0455] В конкретных вариантах осуществления сконструированные клетки получают способом, который производит выходящую композицию обогащенных Т-клеток из одной или нескольких входящих композиций и/или из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления выходящая композиция содержит клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR, такой как анти-BCMA CAR. В конкретных вариантах осуществления клетки выходящих композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии, например, терапии аутологичными клетками. В

некоторых вариантах осуществления выходящая композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0456] В некоторых вариантах осуществления способ генерирования или продуцирования сконструированных клеток представляет собой способ, который включает некоторые или все из следующих стадий: сбор или получение биологического образца; выделение, отбор или обогащение входящих клеток из биологического образца; криоконсервация и хранение исходных клеток; оттаивание и/или инкубирование исходных клеток в стимулирующих условиях; конструирование стимулированных клеток для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например, полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивирование сконструированных клеток до порогового количества, плотности или размножения; формирование культивируемых клеток в выходящую композицию; и/или криоконсервирование и хранение сформированных в композицию выходящих клеток до выделения клеток для инфузии и/или до тех пор, пока они не будут пригодны для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ полностью осуществляется с одной композицией обогащенных Т-клеток, например, CD4+ и CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляется с использованием двух или более входящих композиций обогащенных Т-клеток, которые объединяют до и/или во время осуществления способа для создания или получения одной выходящей композиции обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления обогащенные Т-клетки представляют собой или включают сконструированные Т-клетки, например Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0457] В конкретных вариантах осуществления выходящую композицию сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например анти-BCMA CAR), получают из исходной и/или входящей композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления входящая композиция представляет собой композицию обогащенных Т-клеток, обогащенных CD4+ Т-клеток и/или обогащенных CD8+ Т-клеток (далее также указаны как композиции обогащенных Т-клеток, композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и композиции 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 или содержит около 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток включает или содержит менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клеток, и/или свободна или по существу свободна от CD8+ Т-клеток. 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 около 100%

CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных CD8+ Т-клеток включает или содержит менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или свободна или по существу свободна от CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток состоят по существу из CD8+ Т-клеток.

[0458] В конкретных вариантах осуществления выходящую композицию сконструированных клеток получают из исходной или входящей композиции клеток, которую создают и/или получают путем комбинирования, смешивания и/или объединения клеток, в том числе из композиции клеток, содержащей обогащенные Т-клетки, обогащенные CD4+ Т-клетки и/или обогащенные CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления входящая композиция клеток представляет собой композицию комбинированных, смешанных и/или объединенных CD4+ и CD8+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит количество CD8+ Т-клеток между 30% и 70%, между 35% и 65%, между 40% и 60%, между 45% и 55% или около 50% или 50% CD4+ Т-клеток и между 30% и 70%, между 35% и 65%, между 40% и 60%, между 45% и 55% или около 50% или 50%. В некоторых вариантах осуществления входящая композиция содержит количество CD8+ Т-клеток между 45% и 55%, около 50% или 50% CD4+ Т-клеток и между 45% и 55%, около 50% или 50%.

[0459] В некоторых вариантах осуществления способ получения сконструированных клеток может дополнительно включать одно или несколько из следующего: активацию и/или стимуляцию клеток, например, клеток входящей 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 представленные способы можно использовать в связи со сбором, сбором и/или формированием входящих композиций, полученных после инкубации, активации, стимуляции, конструирования, трансдукции, трансфекции и/или культивирования клеток.

[0460] В некоторых вариантах осуществления одну или более стадий способа осуществляют, по меньшей мере частично, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда представляет собой определенную или четко определенную клеточную культуральную среду. В некоторых вариантах осуществления, бессывороточная средя представляет собой констролируемую культуральную среду, которая была очищена, например, отфильтрована для удаления ингибиторов и/или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда содержит белки. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда может содержать сывороточный альбумин, гидролизаты, факторы роста, гормоны, белки-носители и/или факторы прикрепления. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает цитокины. В некоторых вариантах

осуществления бессывороточная среда включает цитокины или рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает рекомбинантный IL-2, IL-15 и/или IL-7. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает глутамин. В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает глутамин и рекомбинантный IL-2, IL-15 и IL-7.

[0461] В некоторых вариантах осуществления бессывороточная среда включает базальную среду, содержащую один или несколько белков или другие добавки. В некоторых вариантах осуществления инкубацию полностью или частично осуществляют в базальной среде. В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит смесь неорганических солей, сахаров, аминокислот и, необязательно, витаминов, органических кислот и/или буферов или других хорошо известных питательных веществ для клеточных культур. В дополнение к питательным веществам среда также помогает поддерживать pH и осмоляльность. В некоторых аспектах компоненты бессывороточной среды поддерживают рост, пролиферацию и/или размножение клеток.

[0462] Широкое разнообразие коммерчески доступных базальных сред хорошо известно специалистам в данной области и включает модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), среду Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Исков-модифицированную среду Дульбекко и среду Хэмса. В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой Исков-модифицированную среду Дульбекко, RPMI-1640 или α-MEM. В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой сбалансированный солевой раствор (например, PBS, DPBS, HBSS, EBSS). В некоторых вариантах осуществления базальная среда выбрана из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), минимальной основной среды Игла (MEM), базальной среды Игла (BME), F-10, F-12, RPMI 1640, минимальной основной среды Глазгова (GMEM), альфа-минимальной основной среды (альфа-MEM), Исков-модифицированной среды Дульбекко и M199. В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой комплексную среду (например, RPMI-1640, IMDM). В некоторых вариантах осуществления базальная среда представляет собой базальную среду для размножения Т-клеток OpTmizer™ CTS™ (ThermoFisher).

[0463] В некоторых вариантах осуществления базальная среда может дополнительно содержать белок или пептид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок имеет происхождение не от млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является человеческим или выделен у человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок является рекомбинантным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один белок включает альбумин, трансферрин, инсулин, фибронектин, апротинин или фетуин. В некоторых вариантах осуществления белок содержит один или несколько из альбумина, инсулина или трансферрина, необязательно один или несколько из человеческого или рекомбинантного альбумина, инсулина или трансферрина.

[0464] В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой альбумин

или заменитель альбумина. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой альбумин человеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой природный сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой рекомбинантный сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах осуществления альбумин представляет собой рекомбинантный альбумин нечеловеческого происхождения. Заменители альбумина могут представлять собой любой источник белка или полипептида. Примеры таких образцов белков или полипептидов включают, но не ограничиваются этим, экстракт из бычьего гипофиза, гидролизат растений (например, гидролизат риса), эмбриональный альбумин теленка (фетуин), яичный альбумин, сывороточный альбумин человека (HSA) или другие альбумины животного происхождения, экстракт куриного эмбриона, экстракт бычьего эмбриона, AlbuMAX® I и AlbuMAX® II. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид содержит трансферрин. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид содержит фибронектин. В некоторых вариантах осуществления белок или пептид содержит апротинин. В некоторых вариантах осуществления белок содержит фетуин.

[0465] В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных белков являются частью добавки для замены сыворотки, которую добавляют к базальной среде. Примеры добавок для замены сыворотки включают, например, Immune Cell Serum Replacement (ThermoFisher, #A2598101) или добавки, описанные Smith *et al. Clin Transl Immunology*. 2015 Jan; 4(1): e31.

[0466] В некоторых вариантах осуществления базальная среда дополнена дополнительными добавками. Добавки к средам для культивирования клеток могут включать, но не ограничиваются этим, питательные вещества, сахара, например, глюкозу, аминокислоты, витамины или добавки, такие как АТФ и NADH.

[0467] В некоторых вариантах осуществления базальная среда дополнительно содержит глутамин, такой как L-глутамин. В некоторых аспектах глутамин представляет собой свободную форму глутамина, такую как L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления концентрация глутамина, такого как L-глутамин, в базальной среде составляет менее 200 мМ, например, менее 150 мМ, 100 мМ или менее, например, от 20 мМ до 120 мМ или от 40 мМ до 100 мМ, например, концентрация равна или около 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-глютамина составляет от около 0,5 мМ до около 5 мМ (например, 2 мМ).

[0468] В некоторых вариантах осуществления базальная среда дополнительно содержит синтетическую аминокислоту, такую как дипептидная форма L-глютамина, например L-аланил-L-глутамин. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде составляет около 0,5-5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация дипептидной формы L-глутамина (например, L-аланил-L-глутамина) в базальной среде

составляет около 2 мМ.

[0469] В некоторых вариантах осуществления представленные способы осуществляют таким образом, что одну, несколько или все стадии подготовки клеток для клинического применения, например, при адоптивной клеточной терапии, осуществляю без воздействия на клетки нестерильных условий. В некоторых вариантах осуществления клетки отбирают, стимулируют, трансдуцируют, промывают и формируют в композицию в закрытой стерильной системе или устройстве. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько стадий осуществляют отдельно от закрытой системы или устройства. В некоторых таких вариантах осуществления клетки переносят отдельно от закрытой системы или устройства в стерильных условиях, например, путем стерильного переноса в отдельную закрытую систему.

А. Подготовка клеток для конструирования

[0470] В некоторых вариантах осуществления подготовка сконструированных клеток включает одну или несколько стадий культивирования и/или подготовки. Клетки для введения рекомбинантного рецептора (например, CAR) могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный или выделенный у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект, у которого выделяют клетку, является субъектом, страдающим заболеванием или состоянием, или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будут вводить клеточную терапию. 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.

[0471] 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, генетическое конструирование (например, трансдукция вирусным вектором), промывка и/или инкубация. Биологический образец может быть образцом, полученным непосредственно из биологического источника, или образцом, прошедшим обработку. Биологические образцы включают, но не ограничиваются этим, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая полученные из них обработанные образцы.

[0472] В некоторых аспектах образец, из которого получены или выделены клетки, представляет собой кровь или образец, полученный из крови, или представляет собой или получен из продукта афереза или лейкафереза. Примеры образцов включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником, лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистой оболочкой, 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 аутологичных и аллогенных источников.

[0473] 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, или свиньи.

[0474] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток включает одну или несколько стадий подготовки и/или разделения клеток на неаффинной 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 устойчивость к определенным компонентам.

[0475] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкафереза. Образцы в некоторых аспектах содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, а в некоторых аспектах содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

[0476] В некоторых вариантах осуществления клетки крови, взятые у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов 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 осуществляют в полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, в процессоре клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями изготовителя. В некоторых аспектах стадию промывки осуществляют путем фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) в соответствии с инструкциями изготовителя. В некоторых вариантах осуществления после промывки клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS, не содержащий Ca^{++}/Mg^{++}. В некоторых вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, а клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

[0477] В некоторых аспектах для получения выделенных или секретируемых полипептидов, в дополнение к прокариотам, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были модифицированы для имитации или приближения к

таковым в клетках человека, что приводит к продукции антитела с частично или полностью человеческим паттерном гликозилирования. См. Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) и Li *et al.*, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

[0478] Иллюстративные эукариотические клетки, которые можно использовать для экспрессии полипептидов, включая выделенные или секретированные полипептиды, включают, но не ограничиваются этим, COS клетки, включая COS 7 клетки; 293 клетки, включая 293-6E клетки; CHO клетки, включая CHO-S, DG44. Lec13 CHO клетки и FUT8 CHO клетки; PER.C6® клетки; и NSO клетки. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи и/или легкие цепи антител (*например*, V_H область и/или V_L область) могут экспрессироваться в дрожжах. См, например, публикацию США № US 2006/0270045 A1. В некоторых вариантах осуществления конкретная эукариотическая клетка-хозяин выбрана на основании ее способности производить желаемые посттрансляционные модификации тяжелых цепей и/или легких цепей (например, V_H области и/или V_L области). Например, в некоторых вариантах осуществления клетки CHO продуцируют полипептиды с более высоким уровнем сиалилирования, чем тот же полипептид, продуцируемый в клетках 293.

[0479] В некоторых вариантах осуществления способы подготовки включают стадии замораживания, например криоконсервации, клеток либо до, либо после выделения, селекции и/или обогащения, и/или инкубации для трансдукции и конструирования, и/или после культивирования и/или сбора сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия замораживания и последующего оттаивания удаляет гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывки для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах можно использовать любой из множества известных растворов и параметров замораживания. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криопротекции или криоконсервированию, в среде и/или растворе с конечной концентрацией равной или около 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% DMSO, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% DMSO. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криопротекции или криоконсервации, в среде и/или растворе с конечной концентрацией равной или около 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. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем разбавляют средой 1:1, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки обычно замораживают до или примерно до -80 градусов Цельсия со скоростью примерно 1 градус Цельсия в минуту и хранят в паровой фазе в резервуаре для хранения с жидким азотом.

[0480] В некоторых вариантах осуществления выделение клеток или популяций включает одну или несколько стадий подготовки и/или разделения клеток на неаффинной

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 устойчивость к определенным компонентам. 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 Перколла или Фиколла.

[0481] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть стадии отбора включает инкубацию клеток с селективным реагентом. Инкубация с селективным реагентом или реагентами, например, как часть методов селекции, которые можно осуществить с использованием одного или нескольких селективных реагентов для отбора одного или нескольких различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке или на ней одной или нескольких специфических молекул, таки как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой известный способ с использованием селективного реагента или реагентов для разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления селективный реагент или реагенты приводят к разделению, основанному на аффинности или иммуноаффинности. Например, отбор 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, после чего обычно следуют стадии промывки и отделение клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

[0482] В некоторых аспектах таких способов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством желаемого селективного реагента на основе аффинности. Иммуноаффинную селекцию можно осуществить с использованием любой системы или метода, 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 осуществляют с использованием таких частиц, как гранулы, например, магнитные шарики, покрытые селективным агентом (например, антителом), специфическим к маркеру клеток. Частицы (например, шарики) 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, шариков), чтобы способствовать промотированию энергетически благоприятных

взаимодействий. В других случаях способы включают отбор клеток, при котором весь процесс отбора или его часть осуществляется во внутренней полости камеры центрифуги, например, при центрифугировании. В некоторых вариантах осуществления инкубацию клеток с селективными реагентами, такими как селективные реагенты на основе иммуноаффинности, осуществляют в центрифужной камере. В некоторых вариантах осуществления выделение или разделение осуществляют с использованием системы, устройства или аппарата, описанных в международной патентной заявке, номер публикации WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном примере система представляет собой систему, описанную в международной публикации № WO2016/073602.

[0483] В некоторых вариантах осуществления, путем осуществления таких стадий отбора или их частей (например, инкубации с частицами, покрытыми антителами, например, магнитными шариками) в полости центрифужной камеры, пользователь может контролировать определенные параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора во время обработки и ее синхронизация, что может дать преимущества по сравнению с другими доступными методами. Например, возможность уменьшить объем жидкости в полости во время инкубации может увеличить концентрацию частиц (например, гранулированного реагента), используемых для селекции, 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, в сочетании с системами, схемами и констролем, как описано в настоящей заявке, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в желаемое время (время) во время инкубации, что также может улучшить взаимодействие.

[0484] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть стадии отбора осуществляют в центрифужной камере, которая включает инкубацию клеток с селективным реагентом. В некоторых аспектах таких способов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством желаемого селективного реагента на основе аффинности, которое намного меньше, чем обычно используется при осуществлении аналогичного отбора в пробирке или контейнере для отбора того же количества клеток и/или объема клеток в соответствии с инструкциями изготовителя. 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 селективного реагента(реагентов), используемого для селекции клеток в пробирке, или используется инкубация в контейнере для того же количества клеток и/или того же объема клеток в соответствии с инструкциями изготовителя.

[0485] В некоторых вариантах осуществления для селекции, например, селекции клеток на основе иммуноаффинности, клетки инкубируют в полости камеры в композиции, которая также содержит селективный буфер с селективным реагентом, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую

желательно обогатить и/или истощить, но не на других клетках в композиции, такой как антитело, которое необязательно связано с каркасом, таким как полимер или поверхность, например, шарик, например, магнитные гранулы, такие как магнитные гранулы, связанные с моноклональными антителами, специфическими в отношении CD4 и CD8. В некоторых вариантах, как описано, селективный реагент добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое существенно меньше (например, в количестве не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% %, 60%, 70% или 80%) по сравнению с количеством селективного реагента, 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 осуществляют в пробирке при встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубацию осуществляют с добавлением селективного буфера к клеткам и селективному реагенту для достижения целевого объема с инкубацией реагента, например, от 10 до 200 мл, например, по меньшей мере или примерно по меньшей мере 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 селективный буфер и селективный реагент предварительно смешивают перед добавлением к клеткам. В некоторых вариантах осуществления селективный буфер и селективный реагент добавляют к клеткам по отдельности. В некоторых вариантах осуществления селекционную инкубацию осуществляют в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать промотированию энергетически благоприятных взаимодействий и, таким образом, позволяет использовать меньше селективного реагента в целом, достигая при этом высокой эффективности селекции.

[0486] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубации с селективным реагентом составляет от или примерно от 5 минут до 6 часов, например, от 30 минут до 3 часов, например, по меньшей мере или примерно по меньшей мере 30 минут, 60 минут, 120 минут или 180 минут.

[0487] В некоторых вариантах осуществления инкубацию обычно осуществляют в условиях перемешивания, например, при наличии вращения, как правило, при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от около 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или около или по меньшей мере при 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), например, при относительной центробежной силе, направленной на образец или стенку камеры или другого контейнера от или от около 80 g до 100 g (например, около или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют с использованием повторяющихся интервалов вращения на такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например, при вращении и/или отдыхе в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, при вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0488] В некоторых вариантах осуществления такой способ осуществляют в

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

[0489] В некоторых вариантах осуществления после инкубации и/или смешивания клеток и селективного реагента и/или реагентов инкубированные клетки подвергают разделению для отбора клеток на основе присутствия или отсутствия конкретного реагента или реагентов. В некоторых вариантах осуществления разделение осуществляют в той же закрытой системе, в которой осуществляли инкубацию клеток с селективным реагентом. В некоторых вариантах осуществления после инкубации с селективными реагентами инкубированные клетки, включая клетки, в которых был связан селективный реагент, переносят в систему для иммуноаффинного разделения клеток. В некоторых вариантах осуществления система для иммуноаффинного разделения представляет собой или содержит колонку для магнитного разделения.

[0490] 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 такими маркерами, после чего обычно следуют стадии промывки и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связавшихся с антителом или партнером по связыванию.

[0491] 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 доступного антитела, которое специфически идентифицируют тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего осуществлять на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

[0492] В некоторых вариантах осуществления стадии способа дополнительно включают отрицательную и/или положительную селекцию инкубированных клеток, например, с использованием системы или устройства, которые могут выполнять селекцию на основе аффинности. В некоторых вариантах осуществления выделение осуществляют путем обогащения конкретной клеточной популяции путем положительного отбора или истощения конкретной клеточной популяции путем отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительную или отрицательную селекцию осуществляют путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессированными (маркер+) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно селектируемых клетках, соответственно.

[0493] Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих определенный маркер. Например, положительная селекция или обогащение клеток определенного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процента 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 процента таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

[0494] В некоторых примерах осуществляют несколько циклов стадий разделения, где отобранную положительной или отрицательной селекцией фракцию на одной стадии подвергают 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 является специфическим в отношении маркера, предназначенного для отрицательной селекции. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно отобраны положительной селекцией путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

[0495] Например, в некоторых аспектах специфические субпопуляции Т-клеток, таких как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или более поверхностых маркеров, *например*, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, и/или CD45RO+ Т-клетки, выделены методами положительной или отрицательной селекции.

[0496] Например, CD3+, CD28+ Т-клетки могут быть отобраны положительной селекцией с использованием анти-CD3/анти-CD28 конъюгированных магнитных шариков (*например*, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T-cell Expander, MACSiBeads™, и т.п.).

[0497] 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 стадии селекции CD4+ и/или CD8+ используют для выделения CD4+ хелперных и CD8+ цитотоксических Т-клеток из композиции, например, из композиции PBMC, такой как композиция, полученная с использованием лейкафереза. Такие CD4+ и CD8+ популяции, в некоторых аспектах, могут быть дополнительно отсортированы на субпопуляции путем положительной или отрицательной селекции маркеров, экспрессируемых или экспрессированных в относительно более высокой степени на одной или нескольких субпопуляциях наивных Т-клеток, Т-клеток памяти и/или эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления CD4+ и CD8+ клетки смешивают в желаемом соотношении.

[0498] В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки затем обогащают, или истощают, наивными клетками центральной памяти, эффекторной 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 Т-клетками центральной памяти (T_{CM}) осуществляют для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной 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 T_{CM}-обогащенных CD8+ Т-клеток и CD4+ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

[0499] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L+, так и в CD62L- подмножествах CD8+ лимфоцитов периферической крови. Можно осуществить обогащение или истощение PBMC по фракциям CD62L-CD8+ и/или CD62L+CD8+, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

[0500] В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клеток центральной памяти (T_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD27, 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 CD8+ популяции, обогащенной T_{CM} клетками, осуществляют путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и положительной селекции или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном аспекте обогащение Т-клетками центральной памяти (T_{CM}) осуществляют, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которые подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA и положительной селекции на основе CD62L. Такие селекции в некоторых аспектах осуществляют одновременно, а в других аспектах осуществляют последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую для получения CD8+ клеточной

популяции или субпопуляции, также используют для получения CD4+ клеточной популяции или субпопуляции, так что как положительные, так и отрицательные фракции после разделения на основе CD4 сохраняются и их использую на последующих стадиях способов, необязательно после одной или нескольких дополнительных стадий положительной или отрицательной селекции.

[0501] В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA- и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RA-. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CCR7+. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+ или CD62L+/CCR7+/CD45RA- и имеют уровень экспрессии CD44 от среднего до высокого. В некоторых вариантах осуществления CD8+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+ или CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-.

[0502] 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 CD8+ Т-клетки 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 CD4+ Т-клетки выбирают из отрицательной фракции.

[0503] В конкретном примере образец PBMC или другой образец лейкоцитов подвергают отбору CD4+ клеток, при этом сохраняются как отрицательные, так и положительные фракции. Отрицательную фракцию затем подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA и положительной селекции на основе маркерной характеристики Т-клеток центральной памяти, таких как CD62L или CCR7, где положительную и отрицательную селекцию осуществляют в любом порядке.

[0504] В некоторых вариантах осуществления CD4+ Т-хелперные клетки сортируют на наивные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты можно получить стандартными методами. 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 CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+,

CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA- и/или CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CCR7+ и CD45RA-. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+ и CCR7+. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+, или CD62L+/CCR7+/CD45RA- и имеют уровень экспрессии CD44 от среднего до высокого. В некоторых вариантах осуществления CD4+ клетки центральной памяти представляют собой CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+ или CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4+ клетки представляют собой CD62L- и CD45RO-.

[0505] В одном примере для обогащения CD4+ клетками 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 связывают с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитный шарик или парамагнитный шарик, 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 (см. 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).

[0506] В некоторых аспектах образец или композицию клеток, подлежащих разделению, инкубируют с небольшим намагничиваемым или магниточувствительным материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные шарики (например, такие как шарики Dynabeads® или MACS®). Магниточувствительный материал, например, частица, обычно непосредственно или опосредованно 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 подвергнуть отбору методом отрицательной или положительной селекции.

[0507] В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или шарик содержат магниточувствительный материал, связанный со специфическим связывающим членом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует много хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в методах магнитной сепарации. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патент США № 4452773, и в описании европейского патента EP 452342 B, которые

включены в настоящую заявку посредством ссылки. Другими примерами являются отсортированные коллоидные частицы, такие как описанные в Owen, патент США № 4795698, и Liberti et al., патент США № 5200084.

[0508] Инкубацию обычно осуществляют 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 прикреплены к магнитной частице или шарику, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

[0509] В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле, и те клетки, к которым прикреплены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. При положительной селекции, сохраняются клетки, притягиваемые к магниту; при отрицательной селекции, сохраняются клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах комбинацию положительной и отрицательной селекции осуществляют на одной и той же стадии селекции, при этом положительные и отрицательные фракции сохраняются и их затем обрабатывают или подвергают дополнительным стадиям разделения.

[0510] 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 из первичных антител, специфических в отношении одного или нескольких маркеров. В некоторых вариантах осуществления клетки, а не шарики, метят первичным антителом или партнером по связыванию, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфическим 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.

[0511] В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы оставляют прикрепленными к клеткам, которые затем подлежат инкубации, культивированию и/или конструированию; в некоторых аспектах частицы оставляют прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые или магниточувствительные частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничиваемых частиц из клеток известны и включают, например, использование конкурирующих немеченых антител, намагничиваемых частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

[0512] В некоторых вариантах осуществления селекцию на основе аффинности осуществляют посредством магнитно-активируемой клеточной сортировки (MACS®) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитно-активируемой сортировки клеток

(MACS®) способны к высокочистой селекции клеток с прикрепленными к ним намагниченными частицами. В некоторых вариантах осуществления MACS® работает в режиме, при котором нецелевые и целевые частицы последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как неприсоединенные частицы элюируются. Затем, после того как эта первая стадия элюирования завершена, вещества, которые удерживались в магнитном поле и элюирование которых предотвращалось, высвобождаются каким-либо образом, чтобы их можно было элюировать и извлекать. В некоторых вариантах осуществления клетки, не являющиеся мишенями, метят и удаляют из гетерогенной популяции клеток.

[0513] В некоторых вариантах осуществления выделение или разделение осуществляют с использованием системы, устройства или аппарата, осуществляющих одну или несколько стадий методов выделения, подготовки клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или формирования композиции. В некоторых аспектах систему используют для осуществления каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для сведения к минимуму ошибок, осуществляемых пользователем манипуляций и/или загрязнения. В одном примере система представляет собой систему, описанную в международной патентной заявке, номер публикации WO2009/072003, или US 20110003380 A1.

[0514] В некоторых вариантах осуществления система или устройство осуществляет одну или несколько, например, все стадии выделения, обработки, конструирования и формирования композиций в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. В некоторых аспектах система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу, связанную с системой или устройством, что позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или корректировать различные аспекты обработки, выделения, конструирования и формирования композиций.

[0515] 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 устройства и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартной последовательности. Блок магнитной сепарации в некоторых аспектах включает 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.

[0516] Система CliniMACS® в некоторых аспектах использует намагничиваемые частицы, связанные с антителами, которые поставляются в стерильном апирогенном

растворе. В некоторых вариантах осуществления после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления избыточных частиц. Пакет для подготовки клеток затем соединяют 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 предколонку 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 немеченые удаляют с использованием серии промывок. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции для использования в способах, описанных в настоящей заявке, являются немечеными и не сохраняются в колонке. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции для использования с описанными в настоящей заявке способами метят и сохраняют в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования с описанными в настоящей заявке способами элюируют из колонки после удаления магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

[0517] 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 путем центрифугирования. 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, периферическую кровь можно автоматически разделить на слои эритроцитов, лейкоцитов и плазмы. Система CliniMACS Prodigy® также может включать встроенную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, например, дифференцировка и размножение клеток, загрузка антигеном и длительное культивирование клеток. Входные отверстия могут обеспечить стерильное удаление и пополнение среды, а клетки можно контролировать при помощи 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.

[0518] В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящей заявке, собирают и обогащают (или истощают) методом проточной цитометрии, где клетки, окрашенные на множественные маркеры клеточной поверхности, переносятся в потоке жидкости. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящей заявке, собирают и обогащают (или истощают) посредством сортировки в препаративном масштабе (FACS). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящей заявке, собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в сочетании с системой детекции 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 несколькими маркерами, что позволяет выделить четко определенные субпопуляции Т-клеток с высокой чистотой.

[0519] В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию помечены одним или несколькими детектируемыми 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, специфических в отношении одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, осуществляют в потоке жидкости, например, методом сортировки клеток, активируемой флуоресценцией (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и /или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в сочетании с проточной цитометрической системой детекции. Такие методы позволяют осуществлять положительную и отрицательную селекцию на основе нескольких маркеров одновременно.

[0520] В некоторых вариантах осуществления выделение и/или селекция приводит к получению одной или нескольких входящих композиций обогащенных Т-клеток, например, CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две или более отдельных входящих композиций выделяют, отбирают, обогащают или получают из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления отдельные входящие композиции выделяют, отбирают, обогащают и/или получают из отдельных биологических образцов, собранных, взятых и/или полученных от одного и того же субъекта.

[0521] В некоторых вариантах осуществления одна или более входящих 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 100% или около 100% CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления входящая композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD3+ Т-клеток.

[0522] В некоторых вариантах осуществления одна или более входящих 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 100% или около 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления входящая композиция CD4+ Т-клеток включает менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% CD8+ Т-клеток, и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или является свободной или по существу свободной от CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток

состоит по существу из CD4+ Т-клеток.

[0523] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций представляют собой или включают 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 100% или около 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция CD8+ Т-клеток содержит менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 1%, менее чем 0,1% или менее чем 0,01% CD4+ Т-клеток, и/или не содержит CD4+ Т-клеток, и/или является свободной или по существу свободной от CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD8+ Т-клеток.

[0524] В некоторых вариантах осуществления способы подготовки включают стадии замораживания, например криоконсервации, клеток до или после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления стадия замораживания и последующего оттаивания удаляет гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывки 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% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем его разбавляют средой 1:1, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки замораживают до -80 градусов Цельсия со скоростью 1 градус Цельсия в минуту и хранят в паровой фазе в резервуаре для хранения с жидким азотом.

B. Активация и стимуляция

[0525] В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генетическим конструированием. Стадии инкубации могут включать культивирование, выращивание, стимуляцию, активацию и/или размножение. 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 генетическому конструированию, например, введению рекомбинантного антигенного рецептора.

[0526] В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают стадии выращивания, инкубации, культивирования и/или генетического конструирования. Например, в некоторых вариантах осуществления представлены способы инкубации и/или конструирования истощенных клеточных популяций и композиций для инициации

культивирования. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клеточные популяции инкубируют в композиции, инициирующей культивирование.

[0527] Инкубацию и/или конструирование можно осуществить 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.

[0528] 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.

[0529] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия или агенты включают один или несколько агентов, например, лиганд, который способен стимулировать или активировать 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, специфические в отношении TCR, т.е. анти-CD3. В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают один или несколько агентов, например, лиганд, способный стимулировать костимуляторный рецептор, например, анти-CD28. В некоторых вариантах осуществления такие агенты и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как шарик, 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 около 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.

[0530] В некоторых аспектах инкубацию осуществляют в соответствии со способами, такими как описанные в патенте США № 6040177 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.

[0531] В некоторых вариантах осуществления Т-клетки размножают путем добавления к инициирующей культивирование композиции фидерных клеток, таких как неделящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), (например, таким образом, чтобы полученная популяция клеток содержала по меньшей мере около 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток PBMC на каждый Т-лимфоцит в исходной размножаемой популяции); и инкубирования культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения числа Т-клеток). В некоторых аспектах неделящиеся фидерные клетки могут содержать фидерные клетки PBMC, облученные гамма-излучением. В некоторых вариантах осуществления PBMC облучают гамма-лучами в

диапазоне примерно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах фидерные клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

[0532] В некоторых вариантах осуществления стимулирующие условия включают температуру, подходящую для роста Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере около 25 градусов Цельсия, обычно по меньшей мере около 30 градусов Цельсия и обычно около 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне примерно от 6000 до 10000 рад. Фидерные клетки LCL в некоторых аспектах представлены в любом подходящем количестве, таком что отношение фидерных клеток LCL к исходным Т-лимфоцитам составляет по меньшей мере около 10:1.

[0533] В вариантах осуществления антиген-специфические Т-клетки, такие как антиген-специфические CD4+ и/или CD8+ Т-клетки, получают путем стимуляции антигеном наивных или антиген-специфических Т-лимфоцитов. Например, антигенспецифические Т-клеточные линии или клоны могут быть созданы для антигенов цитомегаловируса путем выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимуляции клеток in vitro тем же антигеном.

[0534] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации в присутствии одного или нескольких стимулирующих условий или стимулирующих агентов осуществляют во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центрифугировании, как описано в Международный публикации № WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации, осуществляемой в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами для индукции стимуляции и/или активации. В некоторых вариантах осуществления клетки, такие как выбранные клетки, смешивают со стимулирующими условиями или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких способов определенный объем клеток смешивают с определенным количеством одного или нескольких стимулирующих условий или агентов, которое намного меньше, чем обычно используется при осуществлении аналогичных стимуляций в планшете для культивирования клеток или в другой системе.

[0535] В некоторых вариантах осуществления 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 этого количества) по сравнению с количеством стимулирующего агента, которое обычно используют или было бы необходимо для достижения примерно такой же или подобной эффективности селекции того же количества клеток или того же объема клеток, когда селекцию осуществляют без перемешивания в центрифужной камере, т.е. в пробирке или пакете при периодическом встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления инкубацию осуществляют с добавлением инкубационного буфера к клеткам и стимулирующему агенту

для достижения целевого объема, с инкубацией реагента, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере или примерно по меньшей мере или около или 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 осуществляют в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать промотированию энергетически благоприятных взаимодействий и, таким образом, позволяет использовать меньшее общее количество стимулирующего агента с достижением при этом стимуляции и активации клеток.

[0536] В некоторых вариантах осуществления инкубацию обычно осуществляют в условиях перемешивания, например, при наличии вращения, как правило, при относительно низкой силе или скорости, такой как скорость ниже, чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от около 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или около или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), например, при относительной центробежной силе, направленной на образец или стенку камеры или другого контейнера от или от около 80 g до 100 g (например, около или по меньшей мере 80 g, 85 g, 90 g, 95 g или 100 g). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют с использованием повторяющихся интервалов вращения на такой низкой скорости с последующим периодом отдыха, например, с вращением и/или отдыхом в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, с вращением в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение приблизительно 5, 6, 7 или 8 секунд.

[0537] В некоторых вариантах осуществления общая продолжительность инкубации, например со стимулирующим агентом, составляет 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 примерно по меньшей мере 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления дополнительную инкубацию осуществляют 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.

[0538] В конкретных вариантах осуществления стимулирующие условия включают инкубацию, культивирование и/или выращивание композиции обогащенных Т-клеток с одним или несколькими цитокинами и/или в их присутствии. 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 представляют собой или включают цитокины, являющиеся членами семейства пучков 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления цитокины, являющиеся членами семейства пучков 4-альфа-спиралей, включают, но не ограничиваются этим, 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).

[0539] В некоторых вариантах осуществления стимуляция приводит к активации и/или пролиферации клеток, например, перед трансдукцией.

C. Векторы и способы генетического конструирования

[0540] Также представлены способы, полинуклеотиды, композиции и наборы для экспрессии BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов (*например, CAR*) и получения генетически сконструированных клеток, экспрессирующих такие рекомбинантные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления одие или более рекомбинантных рецепторов (*например, CAR*) или других молекул могут быть генетически сконструированы в клетках или множестве клеток. Генетическое конструирование, как правило, включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или сконструированный компонент, в клетку, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0541] Также представлены полинуклеотиды, кодирующие химерные антигенные рецепторы и/или их части, *например,* цепи. Представленные полинуклеотиды включают такие, которые кодируют анти-BCMA химерные антигенные рецепторы (*например*, антигенсвязывающий фрагмент), описанные в настоящей заявке. Также представлены полинуклеотиды, кодирующие одно или более антитела и/или их части, например, такие, которые, кодируют одно или более из анти-BCMA антител (*например*, антигенсвязывающий фрагмент), описанных в настоящей заявке, и/или других антител и/или их части, *например*, антитела и/или их части, которые связывают другие антигены-мишени. Полинуклеотиды могут включать полинуклеотиды, включающие природные и/или не встречающиеся в природе нуклеотиды и основания, *например*, включая те, которые имеют модификацияи в скелете. Термины “молекула нуклеиновой кислоты”, “нуклеиновая кислота” и “полинуклеотид” можно использовать взаимозаменяемо, и они относятся к полимеру нуклеотидов. Такие полимеры нуклеотидов могут содержать природные и/или не встречающиеся в природе нуклеотиды и включают, но не ограничиваются этим, ДНК, РНК и ПНК. “Нуклеиновокислотная последовательность” относится к линейной последовательности нуклеотидов, которая включает молекулу нуклеиновой кислоты или полинуклеотид.

[0542] Также представлены полинуклеотиды, которые были оптимизированы с точки зрения использования кодонов и/или для устранения сайтов сплайсинга, таких как криптические сайты сплайсинга. Также представлены способы оптимизации и получения кодирующих последовательностей химерных антигенных рецепторов, таких как любой из

химерных антигенных рецепторов, описанных в настоящей заявке. Такие способы описаны в Разделе II в настоящей заявке.

[0543] Также представлены векторы, содержащие полинуклеотиды, такие как любой из полинуклеотидов, описанных в настоящей заявке, и клетки-хозяева, содержащие векторы, *например*, для продуцирования антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор (*например,* CAR), содержащий такие антитела или фрагменты. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Также представлены способы получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов или клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например,* CAR), содержащие такие антитела или фрагменты.

[0544] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, включающую V_L область, и/или аминокислотную последовательность, включающую V_H область антитела (*например*, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Нуклеиновая кислота может кодировать одну или более аминокислотных последовательностей, включающих V_L область и/или аминокислотных последовательностей, включающих V_H область антитела (*например*, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Еще в одном варианте осуществления представлены один или более векторов (*например*, векторов экспрессии), включающих такие полинуклеотиды. Еще в одном варианте осуществления представлена клетка-хозяин включающая такие полинуклеотиды. В одном таком варианте осуществления клетка-хозяин включает (*например*, трансформирована им) вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую V_H область антитела. В другом таком варианте осуществления клетка-хозяин включает (*например*, трансформирована им) (1) вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую V_L область антитела, и аминокислотную последовательность, включающую V_H область антитела, или (2) первый вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую V_L область антитела, и второй вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую V_H область антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает (*например*, трансформирована им) один или более векторов, включающих одну или более нуклеиновых кислот, которые кодируют одну или более аминокислотных последовательностей, включающих одно или более антител и/или их частей, *например*, их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления представлены одна или более таких клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления представлена композиция, содержащая одну или более таких клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток-хозяев могут экспрессировать разные антитела или одно и то же антитело. В некоторых вариантах осуществления каждая из клеток-хозяев может экспрессировать более чем одно антитело.

[0545] Также представлены способы получения анти-BCMA химерных антигенных рецепторов. Для рекомбинантной продукции химерных рецепторов нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая антитело в химерном рецепторе, *например*, описанное в настоящей заявке, может быть выделена и встроена в один или более векторов для последующего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновокислотные последовательности можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (*например*, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). В некоторых вариантах осуществления представлен способ получения анти-BCMA химерного антигенного рецептора, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина, включающей нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую антитело, представленное выше, в условиях, подходящих для экспрессии рецептора.

[0546] В некоторых случаях полинуклеотид, содержащий нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, *например* химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. В некоторых аспектах сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, происходящий из нативного полипептида. В других аспектах сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или не-нативный сигнальный пептид. В некоторых аспектах не ограничивающие иллюстративные сигнальные пептиды включают сигнальный пептид каппа-цепи IgG, представленный в SEQ ID NO: 166 или кодируемый нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 167 или 168-171; альфа-цепи GMCSFR, представленный в SEQ ID NO:154 и кодируемые нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:155; сигнальный пептид альфа CD8, представленный в SEQ ID NO:146; или сигнальный пептид CD33, представленный в SEQ ID NO:142.

[0547] В некоторых вариантах осуществления вектор или конструкция могут содержать промотор и/или энхансер или регуляторные элементы для регуляции экспрессии кодируемого рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах промотор и/или энхансер или регуляторные элементы могут быть зависимыми от условий промоторами, энхансерами и/или регуляторными элементами. В некоторых примерах эти элементы управляют экспрессией трансгена. В некоторых примерах трансген CAR может быть функционально связан с промотором, таким как промотор EF1-альфа с энхансером HTLV1 (SEQ ID NO: 151). В некоторых примерах трансген CAR функционально связан с посттранскрипционным регуляторным элементом вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE; SEQ ID NO: 253), расположенным ниже от трансгена.

[0548] В некоторых вариантах осуществления вектор или конструкция могут содержать один промотор, который управляет экспрессией одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления такие молекулы

нуклеиновой кислоты, например, транскрипты, могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, см., например, патент США № 6060273). Например, в некоторых вариантах осуществления транскрипционные единицы можно сконструировать как бицистронную единицу, содержащую IRES (внутренний сайт посадки рибосомы), которая обеспечивает коэкспрессию генных продуктов (например, кодирующих первый и второй химерные рецепторы) путем информации 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 первый и второй рекомбинантные рецепторы или части рекомбинантного рецептора), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательности расщепления 2A) или сайтом узнавания протеазы (например, фурином). Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который либо во время (в случае T2A), либо после трансляции расщепляется на отдельные белки. В некоторых случаях пептид, такой как T2A, может вызывать пропуск рибосомой (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на C-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим пептидом, находящимся ниже (см., например, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) и deFelipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Известно много элементов 2A. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в раскрытых в настоящей заявке способах и полинуклеотидах, включают, без ограничения, последовательности 2A из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 152 или 153), вируса ринита A лошадей (E2A, например, SEQ ID NO: 148 или 149), вируса asigna (T2A, например, SEQ ID NO: 241, 242 или 243) и свиного тешовируса-1 (P2A, например, SEQ ID NO: 201 или 202), описанные в публикации патента США № 20070116690. В некоторых вариантах осуществления один или несколько разных или отдельных промоторов управляют экспрессией одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих один или несколько рекомбинантных рецепторов или их часть.

[0549] Любые рекомбинантные рецепторы, представленные в настоящей заявке, *например*, BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы и/или дополнительные рекомбинантные рецепторы, могут кодироваться полинуклеотидами, содержащими одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рецепторы, в любых комбинациях или расположениях. Например, один, два, три или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или более разных рецепторов или доменов. В некоторых вариантах осуществления один вектор или конструкция содержит молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие один или более связывающих рекомбинантных рецепторов, и отдельный вектор или конструкция содержит молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие дополнительную молекулу, например, дополнительный рекомбинантный рецептор. Каждая из молекул нуклеиновой кислоты также может кодировать один или более маркеров, таких как поверхностный маркер, *например*, усеченный EGFR (tEGFR).

[0550] Также представлены композиции, содержащие одну или более молекул

нуклеиновой кислоты, векторов или конструкций, например, любых из описанных выше. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, векторы, конструкции или композиции можно использовать для конструирования клеток, таких как Т-клетки, для экспрессии любых рекомбинантных рецепторов и/или дополнительных молекул.

[0551] В некоторых вариантах осуществления один или более рекомбинантных рецепторов (например, CAR) могут быть генетически сконструированы для их экспрессии в клетках или множестве клеток. В некоторых вариантах осуществления первый рекомбинантный рецептор и вторая молекула, *например,* рекомбинантный рецептор, кодируются одной и той же или отдельными молекулами нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления дополнительные молекулы сконструированы для их экспрессии в клетках или множестве клеток.

1. Перенос генов

[0552] В некоторых вариантах осуществления способы получения сконструированных клеток включают введение полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор (например, анти-BCMA CAR), в клетку, например, такую, как стимулированная или активированная клетка. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантные белки представляют собой рекомбинантные рецепторы, такие как любые, описанные в Разделе I. Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку можно осуществить 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. Типичные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе с использованием вирусов, например, ретровирусов или лентивирусов, трансдукции, транспозонов и электропорации. В некоторых вариантах осуществления кончтруирование обеспечивает одну или несколько сконструированных композиций обогащенных Т-клеток.

[0553] В некоторых вариантах осуществления, одна или более 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 выбраны, выделены, и/или обогащены из одного и того же биологического образца, конструируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток конструируют отдельно. В некоторых вариантах осуществления генетически конструируют одну композицию обогащенных Т-клеток. В некоторых

вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композиция представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые были объединены из отдельных композиций до конструирования.

[0554] В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и осуществляют генетическое конструирование, *например*, трансдукцию или трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления отдельные сконструированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после осуществления и/или завершения генетического конструирования.

[0555] В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют путем первой стимуляции клетки, например, путем объединения ее со стимулом, индуцирующим ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, например, измеряемый экспрессией цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения. В некоторых вариантах осуществления перенос генов осуществляют, сначала инкубируя клетки в стимулирующих условиях, таких как любой из способов, описанных в Разделе III-B.

[0556] В некоторых случаях сверхэкспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может быть токсичной для субъекта. Таким образом, в некоторых случаях сконструированные клетки включают генные сегменты, которые делают клетки восприимчивыми к отрицательной селекции in vivo, например, после введения в рамках адоптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах клетки конструируют таким образом, чтобы их можно было элиминировать в результате изменения состояния in vivo пациента, которому их вводят. Отрицательный селективный фенотип может быть результатом вставки гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, соединению. Отрицательные селективные гены включают ген тимидинкиназы вируса простого герпеса I типа (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 2:223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT), бактериальную цитозиндезаминазу (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

[0557] В некоторых аспектах клетки дополнительно конструируют для стимуляции экспрессии цитокинов или других факторов. Различные способы введения генно-инженерных компонентов, например, антигенных рецепторов, например, CAR, хорошо известны и могут быть использованы с предлагаемыми способами и композициями. Типичные способы включают способы переноса полинуклеотидов, кодирующих рецепторы, в том числе с использованием вирусов, например, ретровирусов или лентивирусов, трансдукции, транспозонов и электропорации.

[0558] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полинуклеотиды

переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полинуклеотиды 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).

[0559] В некоторых вариантах осуществления способы генетического конструирования осуществляют путем контактирования одной или нескольких клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления контактирование можно осуществлять путем центрифугирования, такого как спин-окуляция (например, инокуляция центрифугированием). 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 Sepax® и Sepax® 2, включая центрифужные камеры A-200/F и A-200 и различные комплекты для использования с такими системами. Иллюстративные камеры, системы и технологическое оборудование и шкафы описаны, например, в патенте США № 6123655, патенте США № 6733433 и опубликованной патентной заявке США, публикация №: US 2008/0171951, и опубликованной международной патентной заявке, публикация № WO 00/38762, содержание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Примеры наборов для использования с такими системами включают, но не ограничиваются этим, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под названиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0560] В некоторых вариантах осуществления контактирование можно осуществлять путем центрифугирования, такого как спин-окуляция (например, инокуляция центрифугированием). В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, можно подвергать вращению, как правило, с относительно низкой силой или скоростью, такой как скорость ниже скорости, используемой для осаждения клеток, например, от примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или около или по меньшей мере при или около 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют при силе, например, относительной центробежной силе, от или от около 100 g до 3200 g (например, при или около или по меньшей мере при или около 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), измеренной, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин «относительная центробежная сила» или RCF обычно понимается как эффективная сила, прилагаемая к объекту или веществу (такому как клетка, образец или осадок и/или точка во вращающейся камере или другом контейнере), относительно силы земного притяжения 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 (расстояние от оси вращения до объекта, вещества или частицы, на котором измеряется RCF).

[0561] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем контактирования одной или нескольких клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления контактирование можно осуществлять путем центрифугирования, такого как спин-окуляция (например, инокуляция центрифугированием). 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 Sepax® и Sepax® 2, включая центрифужные 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 № 6123655, патенте США № 6733433 и опубликованной патентной заявке США, публикация №: US 2008/0171951, и опубликованной международной патентной заявке, публикация № WO 00/38762, содержание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Примеры наборов для использования с такими системами включают, но не ограничиваются этим, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под названиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

[0562] 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, осуществляемых в системе, например, одной или нескольких стадий обработки, которые можно осуществлять с использованием системы центробежных камер, или в связи с ней, как описано в настоящей заявке или в международной публикации № WO2016/073602. Это оборудование в некоторых вариантах осуществления содержится внутри шкафа. В некоторых вариантах осуществления контрольно-измерительные приборы включают шкаф, который включает корпус, содержащий схему управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Пример такого устройства описан в патенте США №6123655, патенте США №6733433 и патенте США №2008/0171951.

[0563] В некоторых вариантах осуществления система включает 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 подлежащие трансдукции клетки и частицы вирусного вектора, в одном контейнере или в отдельных контейнерах, таких как тот же самый пакет или отдельные пакеты. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких

как мешки, содержащие среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, которая поступает в камеру, и/или другие компоненты для разбавления, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или композиций в процессе осуществления способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или нескольких местах в системе, например, в месте, соответствующем линии ввода, линии разбавителя, линии промывки, линии отходов и/или линии вывода.

[0564] 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 осуществляют 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, а торцевая стенка (стенки) горизонтальна или обычно горизонтальна.

[0565] 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, которая используется для осаждения клеток, например, от или от около 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или около или по меньшей мере при или около 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин, или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют при силе, например, относительной центробежной силе, от или примерно от 100 g до 3200 g (например, при или около или по меньшей мере при или около 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), измеренной, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин «относительная центробежная сила» или RCF обычно понимается как эффективная сила, прилагаемая к объекту или веществу (такому как клетка, образец или осадок и/или точка во вращающейся камере или другом контейнере), относительно силы земного притяжения 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 (расстояние от оси вращения до объекта, вещества или частицы, на котором измеряется RCF).

[0566] В некоторых вариантах осуществления, по меньше мере в процессе генетического конструирования, например трансдукции, и/или после генетического конструирования клетки переносят в мешок биореактора для культивирования сконструированных клеток, например, для культивирования или размножения клеток.

2. Вирусные векторы

[0567] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из обезьяньего вируса 40 (SV40),

аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (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).

[0568] В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор или невирусная ДНК содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую гетерологичный рекомбинантный белок. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная рекомбинантная молекула представляет собой или включает рекомбинантный рецептор, например, антигенный рецептор, SB-транспозоны, например, для подавления генов, заключенные в капсид транспозоны, гомологичную двухцепочечную нуклеиновую кислоту, например, для геномной рекомбинации или репортерные гены (например, флуоресцентные белки, такие как GFP, или люцифераза).

[0569] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор имеет длинную концевую повторяющуюся последовательность (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышиного лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мышей (MSCV), вируса, формирующего фокус селезенки (SFFV), или вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Большинство ретровирусных векторов происходят от мышиных ретровирусов. 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. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5219740; 6207453; 5219740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa *et al.* (1991) Virology 180:849-852; Burns *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109.

[0570] Известны способы лентивирусной трансдукции. Типичные способы описаны, например, в Wang *et al.* (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper *et al.* (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen *et al.* (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; and Cavalieri *et al.* (2003) Blood. 102(2): 497-505.

[0571] В некоторых вариантах осуществления частицы вирусного вектора содержат геном, полученный из вектора на основе ретровирусного генома, например полученный из вектора на основе генома лентивируса. В некоторых аспектах представленных вирусных векторов гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, такой как CAR, содержится и/или расположена между

последовательностями 5'-LTR и 3'-LTR генома вектора.

[0572] В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора представляет собой геном лентивируса, такой как геном ВИЧ-1 или геном SIV. Например, лентивирусные векторы были получены путем множественной аттенуации генов вирулентности, например, гены env, vif, vpu и nef могут быть удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны. Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516; и 5994136). 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.

[0573] Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают векторы, полученные из лентивирусов, таких как вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), Т-лимфотропный вирус человека 1 (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (E1AV). Например, лентивирусные векторы были созданы путем многократной аттенуации генов вирулентности ВИЧ, например, гены env, vif, vpr, vpu и nef удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны в данной области, см. Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6013516; и 5994136). 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.

[0574] 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 R и U5 последовательности из 5'-LTR лентивируса и инактивированный или самоинактивирующийся 3'LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут быть последовательностями LTR из любого лентивируса любого вида. Например, это могут быть последовательности LTR ВИЧ, SIV, FIV или BIV. Как правило, последовательности LTR представляют собой LTR последовательности ВИЧ.

[0575] В некоторых вариантах осуществления в нуклеиновой кислоте вирусного вектора, такого как вирусный вектор ВИЧ, отсутствуют дополнительные

транскрипционные единицы. 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, используемой для получения 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 в процессе интеграции вектора. В некоторых вариантах осуществления может быть устранено достаточно последовательности, включая удаление TATA-бокса, для устранения транскрипционной активности LTR. Это может предотвратить продукцию полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В некоторых аспектах U3 элемент 3' LTR содержит делецию своей энхансерной последовательности, сайтов TATA-бокса, Sp1 и NF-каппа B. 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. В некоторых вариантах осуществления это не влияет на титры вектора или свойства вектора in vitro или in vivo.

[0576] Необязательно, последовательность U3 из лентивирусного 5' LTR может быть заменена промоторной последовательностью в вирусной конструкции, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может увеличить титр вируса, извлеченного из упаковочной клеточной линии. Также может быть включена энхансерная последовательность. Может быть использована любая комбинация энхансер/промотор, которая увеличивает экспрессию вирусного РНК генома в упаковочной клеточной линии. В одном примере используется последовательность энхансера/промотора CMV (патент США № 5385839 и патент США № 5168062).

[0577] В некоторых вариантах осуществления риск инсерционного мутагенеза можно свести к минимуму путем конструирования генома ретровирусного вектора, такого как геном лентивирусного вектора, чтобы он был интеграционно-дефектным. Можно использовать различные подходы для создания генома неинтегрирующегося вектора. В некоторых вариантах осуществления в компонент фермента интегразы гена pol можно ввести мутацию(мутацию) генноинженерным методом, чтобы он кодировал 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 связывания 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 and Levin J Virol 70:5288, 1996).

[0578] 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 детектируемый или селектируемый маркер, такой как резистентность к лекарственным средствам.

[0579] 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 в создание системы доставки генов на основе вируса вовлечены по меньшей мере два компонента: во-первых, упаковочные плазмиды, включающие структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания вирусной векторной частицы, и, во-вторых, сам вирусный вектор, т.е. генетический материал, подлежащий переносу. Гарантии биобезопасности могут быть введены в конструкцию одного или обоих этих компонентов.

[0580] В некоторых вариантах осуществления упаковочная плазмида может содержать все белки, являющиеся ретровирусными, такие как ВИЧ-1, 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, vpu и nef, и/или Tat, первичный трансактиватор ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления лентивирусные векторы, такие как лентивирусные векторы на основе ВИЧ, содержат только три гена исходного вируса: gag, pol и rev, что снижает или устраняет возможность воссоздания вируса дикого типа посредством рекомбинации.

[0581] В некоторых вариантах осуществления геном вирусного вектора вводят в упаковочную клеточную линию, которая содержит все компоненты, необходимые для упаковки вирусной геномной РНК, транскрибированной с генома вирусного вектора, в вирусные частицы. Альтернативно, геном вирусного вектора может включать 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 обеспечивают отдельно в упаковочной клеточной линии.

[0582] 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 последовательности 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 используют несколько векторов для разделения различных генетических компонентов, которые образуют ретровирусные векторные частицы. 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 из таких ретровирусных компонентов.

[0583] В некоторых вариантах осуществления ретровирусная векторная частица, такая как лентивирусная векторная частица, псевдотипирована для повышения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, ретровирусная векторная частица, такая как лентивирусная векторная частица, 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 ненативный оболочечный гликопротеин, чтобы включить ксенотропные, политропные или амфотропные оболочки, такие как оболочка вируса Синдбис, GALV или VSV-G.

[0584] В некоторых вариантах осуществления упаковочная клеточная линия обеспечивает компоненты, включая вирусные регуляторные и структурные белки, которые необходимы в транс для упаковки вирусной геномной РНК в лентивирусные векторные частицы. В некоторых вариантах осуществления упаковывающая клеточная линия может представлять собой любую клеточную линию, которая способна экспрессировать лентивирусные белки и продуцировать функциональные лентивирусные векторные частицы. 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) клетки.

[0585] В некоторых вариантах осуществления упаковочная клеточная линия стабильно экспрессирует вирусный белок (белки). Например, в некоторых аспектах может быть сконструирована упаковочная клеточная линия, содержащая gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковочных компонентов. В некоторых вариантах

осуществления упаковочная клеточная линия может быть транзиторно трансфицирована молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или несколько вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую оболочечный гликопротеин.

[0586] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы и упаковочные и/или хелперные плазмиды вводят посредством трансфекции или инфицирования в упаковочную клеточную линию. Упаковочная клеточная линия продуцирует вирусные векторные частицы, которые содержат геном вирусного вектора. Способы трансфекции или инфицирования хорошо известны. Неограничивающие примеры включают методы на основе фосфата кальция, DEAE-декстрана и липофекции, электропорации и микроинъекции.

[0587] Когда рекомбинантная плазмида и ретровирусный LTR и упаковочные последовательности вводят в специальную клеточную линию (например, путем осаждения фосфатом кальция), упаковочные последовательности могут обеспечить возможность упаковки РНК-транскрипта рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут секретироваться в культуральную среду. Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, в некоторых вариантах осуществления, затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Например, в некоторых аспектах после котрансфекции упаковочных плазмид и вектора-переносчика в упаковочную клеточную линию вирусные векторные частицы извлекают из культуральной среды и титруют стандартными способами, используемыми специалистами в данной области.

[0588] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в упаковочной клеточной линии, такой как типичная клеточная линия HEK 293T, 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 антигенный рецептор, 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 ненативный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления примерно через два дня после трансфекции клеток, например, клеток HEK 293T, клеточный супернатант содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно выделить и титровать.

[0589] Выделенные и/или полученные ретровирусные векторные частицы можно использовать для трансдукции клеток-мишеней с использованием описанных способов. Попав 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.

[0590] В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают способы трансдукции клеток путем контактирования, например инкубации, клеточной композиции, содержащей множество клеток, с вирусной частицей. В некоторых вариантах осуществления клетки, подлежащие трансфекции или трансдукции, представляют собой или включают первичные клетки, полученные от субъекта, такие как клетки, обогащенные и/или отобранные у субъекта.

[0591] В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток для трансдукции в композиции составляет от или от около $1,0\times10^5$ клеток/мл до $1,0\times10^8$ клеток/мл, например, по меньшей мере или примерно по меньшей мере или около $1,0\times10^5$ 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.

[0592] В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы обеспечиваются при определенном отношении копий вирусных векторных частиц или их инфекционных единиц (IU) на общее количество клеток, подлежащих трансдукции (IU/клетка). Например, в некоторых вариантах осуществления вирусные частицы присутствуют во время контактирования при или около или по меньшей мере при или около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 60 IU вирусных векторных частиц на одну клетку.

[0593] В некоторых вариантах осуществления титр вирусных векторных частиц находится между или примерно между 1×10^6 IU/мл и 1×10^8 IU/мл, например, между или примерно между 5×10^6 IU/мл и 5×10^7 IU/мл, например, составляет 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.

[0594] В некоторых вариантах осуществления трансдукция может достигаться при множественности заражения (MOI) менее чем 100, например, в основном, менее чем 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или меньше.

[0595] В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование или инкубацию клеток с вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления контактирование осуществляют в течение 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 примерно по меньшей мере в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов или более.

[0596] В некоторых вариантах осуществления контактирование осуществляют в растворе. В некоторых вариантах осуществления контактироваие клеток и вирусных частиц осуществляют в объеме от или от около 0,5 мл до 500 мл, таком как от или от около 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.

[0597] В некоторых вариантах осуществления входящие клетки обрабатывают, инкубируют или подвергают контактированию с частицами, которые включают связывающие молекулы, которые связываются с рекомбинантным рецептором, кодируемым вирусной ДНК, или распознают его.

[0597] В некоторых вариантах осуществления инкубация клеток с вирусными векторными частицами приводит к получению или дает выходящую композицию, включающую клетки, трансдуцированные вирусными векторными частицами.

[0598] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полинуклеотиды переносят в Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaybam et al., (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полинуклеотиды 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, и Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и осуществления экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию фосфатом кальция (например, как описано в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с использованием частиц вольфрама (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

[0600] Другие подходы и векторы для переноса полинуклеотидов, кодирующих рекомбинантные продукты, описаны, например, в международной патентной заявке, публикация №: WO2014055668, и патенте США № 7446190.

[0601] Среди дополнительных полинуклеотидов, например, гены для введения представляют собой гены для повышения эффективности терапии, например, путем повышения жизнеспособности и/или функции переносимых клеток; гены для обеспечения генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации in vivo; гены для повышения безопасности, например, делающие клетку восприимчивой к отрицательной селекции in vivo, как описано Lupton S.D. et al., Mol. и 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 селективных слитых генов, полученных путем слияния доминантного положительного селективного маркера с отрицательным селективным маркером. См., например, Riddell et al., патент США № 6040177, столбцы 14-17.

3. Сконструированные клетки, векторы и композиции для нацеливания на несколько мишеней

[0602] Также представлены клетки, такие как сконструированные клетки, которые могут связываться с несколькими антигенами и/или нацеливаться на них. В некоторых вариантах осуществления улучшенная селективность и специфичность достигаются за счет

стратегий, нацеленных на несколько антигенов. Такие стратегии обычно включают несколько антигенсвязывающих доменов, которые обычно присутствуют на отдельных генетически сконструированных антигенных рецепторах и специфически связываются с разными антигенами. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы со способностью связывать более одного антигена. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы для экспрессии мультиспецифических рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют несколько рекомбинантных рецепторов, каждый из которых может быть нацелен на один антиген или несколько антигенов, например, один рецептор, который нацелен на BCMA, такой как любой из описанных в настоящей заявке, и другой рецептор, который нацелен на другой антиген, например, опухолевый антиген. В некоторых аспектах в клетку вводят множество генетически сконструированных антигенных рецепторов, которые специфически связываются с разными антигенами, каждый из которых экспрессируется при заболевании или патологическом состоянии, на которое нацелены клетки или ткани или их клетки. Такие характеристики могут в некоторых аспектах устранять или снижать вероятность нецелевых эффектов или повышать эффективность. Например, когда один антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, также экспрессируется на здоровых или нормальных клетках или в них, такие многоцелевые подходы могут обеспечить селективность в отношении желаемых типов клеток, требуя связывания через несколько антигенных рецепторов для активации клетки или индукции определенной эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления можно сконструировать множество клеток для экспрессии одного или нескольких разных рекомбинантных рецепторов, каждый из которых может быть нацелен на один антиген или несколько антигенов.

[0603] Также представлены мультиспецифические клетки, содержащие любой из рекомбинантных рецепторов, описанных в настоящей заявке, такие как клетки, содержащие анти-BCMA рекомбинантный рецептор и дополнительный белок клеточной поверхности, такой как рекомбинантный химерный рецептор, который связывается с другим антигеном или другим эпитопом на BCMA. В некоторых вариантах осуществления представлены композиции клеток, которые экспрессируют рекомбинантные рецепторы, где один или несколько мультиспецифических рекомбинантных рецепторов связываются и/или нацелены на BCMA. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические рекомбинантные рецепторы нацелены на один или несколько разных эпитопов на BCMA.

[0604] В некоторых вариантах осуществления представлена композиция клеток, где каждый тип клеток экспрессирует один или несколько рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления клетка включает (например, была трансформирована) один или несколько векторов, содержащих одну или несколько нуклеиновых кислот, которые кодируют одну или несколько аминокислотных последовательностей, включающих одно или несколько антител и/или их частей, например, их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления представлены

одна или несколько таких клеток. В некоторых вариантах осуществления представлена композиция, содержащая одну или несколько таких клеток. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток могут экспрессировать разные антитела или одно и то же антитело. В некоторых вариантах осуществления каждая из клеток экспрессирует одно или несколько антител, например более одного антитела. В некоторых вариантах осуществления каждая из клеток экспрессирует мультиспецифический рецептор, например, CAR.

[0605] В некоторых вариантах осуществления клетки включают стратегии множественного нацеливания, нацеленные на BCMA и второй или дополнительный антиген, связанный с конкретным заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления на второй или дополнительный антиген нацелен мультиспецифический рецептор и/или множество клеток, например, одна или несколько клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии одного или нескольких рекомбинантных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, нацеленный на второй или дополнительный антиген, экспрессируется на той же клетке, что и BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, или на другой клетке.

[0606] В некоторых вариантах осуществления вторые или дополнительные антигены для стратегий множественного нацеливания включают такие, в которых по меньшей мере один из антигенов представляет собой универсальный опухолевой антиген или член его семейства. В некоторых вариантах осуществления второй или дополнительный антиген представляет собой антиген, экспрессируемый на опухоли. В некоторых вариантах осуществления BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор нацелен на антиген, экспрессируемый на том же типе опухоли, что и второй или дополнительный антиген. В некоторых вариантах осуществления второй или дополнительный антиген также может быть универсальным опухолевым антигеном или может быть опухолевым антигеном, специфическим для типа опухоли. В некоторых вариантах осуществления клетка также включает дополнительный генетически сконструированный антигенный рецептор, который распознает второй или дополнительный антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, подлежащем лечению, и индуцирует стимулирующий или активирующий сигнал.

[0607] Иллюстративные антигены включают CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD74, CD80, CD126, CD138, B7, MUC-1, Ia, HM1,24, HLA-DR, тенасцин, фактор ангиогенеза, VEGF, PIGF, ED-B фибронектин, онкоген, онкогенный продукт, CD66a-d, антигены некроза, Ii, IL-2, T101, TAC, IL-6, ROR1, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), B-клеточный антиген созревания (BCMA), tEGFR, Her2, L1-CAM, мезотелин, CEA, поверхностный антиген гепатита B, антифолатный рецептор, CD24, CD30, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, ErbB3, ErbB4, erbB димеры, EGFR vIII, FBP, FCRL5, FCRH5, фетальный ацетилхолиновый рецептор, GD2, GD3, член D группы 5 класса C связанных с G-белками рецепторов (GPRC5D), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкую

цепь каппа, Lewis Y, L1-молекулу клеточной адгезии (L1-CAM), Меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, преимущественно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), сурвирин, EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, IL-13 рецептор a2 (IL-13Ra2), CA9, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE Al, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, фолатный рецептор-a, CD44v6, CD44v7/8, avb6 интегрин, 8H9, NCAM, рецепторы VEGF, 5T4, фетальный AchR, лиганды NKG2D, двойной антиген, антиген, связанный с универсальной меткой, антиген рака-яичка, MUC1, MUC16, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), простата-специфический антиген, PSMA, Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, эфринB2, CD123, c-Met, GD-2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), CE7, Опухоль Вильмса 1 (WT-1), циклин, циклин A2, CCL-1, hTERT, MDM2, CYP1B, WT1, ливин, AFP, p53, циклин (D1), CS-1, BAFF-R, TACI, CD56, TIM-3, CD123, L1-молекулу клеточной адгезии, MAGE-A1, MAGE A3, циклин, такой как циклин A1 (CCNA1) и/или патоген-специфический антиген, биотинилированные молекулы, молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV и/или другими патогенами, и/или в некоторых аспектах их неоэпитопы или неоантигены. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с универсальной меткой или представляет собой универсальную метку.

[0608] В некоторых вариантах осуществления множество антигенов, *например*, первый антиген, *например* BCMA, и второй или дополнительные антигены экспрессируются на клетке, ткани или при заболевании или состоянии, которые являются мишенью, например, на раковой клетке. В некоторых аспектах клетка, ткань, заболевание или состояние представляют собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. Один или несколько из множества антигенов, как правило, также экспрессируются на клетке, на которую нежелательно воздействовать клеточной терапией, такой как нормальная или здоровая клетка или ткань, и/или на самих сконструированных клетках. В таких вариантах осуществления, требуя лигирования множества рецепторов для достижения ответа клетки, достигается специфичность и/или эффективность.

[0609] В некоторых аспектах антиген, например, второй или дополнительный антиген, такой как специфический для заболевания антиген и/или связанный с ним антиген, экспрессируется при множественной миеломе, такой как член D группы 5 класса C связанных с G-белками рецепторов (GPRC5D), CD38 (циклическая АДФ-рибозогидролаза), CD138 (синдекан-1, синдекан, SYN-1), CS-1 (CS1, CD2 подгруппа 1, CRACC, SLAMF7, CD319 и 19A24), BAFF-R, TACI и/или FcRH5. Другие типичные антигены множественной миеломы включают CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β2-микроглобулин, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1 и рецептор активина типа IIA (ActRIIA). См. Benson and Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46. В некоторых вариантах осуществления антигены включают антигены, присутствующие в лимфоидных опухолях, миеломе, СПИД-ассоциированной лимфоме и/или посттрансплантационных лимфопролиферациях, такие

как CD38. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, направленные против таких антигенов, известны и включают, например, описанные в патентах США №№ 8153765; 8603477, 8008450; публикациях США №№ US20120189622 или US20100260748; и/или международных публикациях PCT №№ WO2006099875, WO2009080829 или WO2012092612 или WO2014210064. В некоторых вариантах осуществления такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (например, scFv) содержатся в мультиспецифических антителах, мультиспецифических химерных рецепторах, таких как мультиспецифические CAR, и/или мультиспецифических клетках.

[0610] В некоторых вариантах осуществления клетки и способы включают стратегии множественного нацеливания, такие как экспрессия двух или более генетически сконструированных рецепторов на клетке, каждый из которых распознает другой антиген и, как правило, каждый включает другой внутриклеточный сигнальный компонент. Такие многоцелевые стратегии описаны, например, в Международной патентной заявке, публикация №: WO 2014055668 A1 (описывающей комбинации стимулирующих или активирующих и костимулирующих CAR, например, нацеливание на два разных антигена, присутствующих по отдельности на не являющихся мишенью клетках, например, нормальных клетках, но присутствующих вместе только на клетках заболевания или состояния, подлежащего лечению), и Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013) (описывающий клетки, экспрессирующие стимулирующий или активирующий и ингибирующий CAR, такие как клетки, в которых стимулирующий или активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым как на нормальных или здоровых клетках, так и на клетках заболевания или состояния, подлежащего лечению, и ингибирующий CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, которые не желательно лечить).

[0611] В некоторых вариантах осуществления представлено множество клеток, каждая из которых сконструирована для экспрессии одного или нескольких рекомбинантных рецепторов. Например, в некоторых вариантах осуществления одна клетка сконструирована для экспрессии рекомбинантного рецептора, который связывает и/или нацеливается на BCMA, а другая клетка сконструирована для экспрессии рекомбинантного рецептора, который связывает и/или нацеливается на дополнительный или второй антиген. В некоторых вариантах осуществления каждая из клеток может экспрессировать мультиспецифический рекомбинантный рецептор, где один или несколько антигенов-мишеней представляют собой BCMA. В некоторых из таких вариантов осуществления множество клеток можно вводить вместе или по отдельности. В некоторых вариантах осуществления множество клеток вводят одновременно или в одно и то же время с клетками, например, вводят в тот же день, и/или последовательно или периодически, в любом порядке, с другой сконструированной клеткой из множества. Например, в некоторых вариантах осуществления сконструированную клетку, экспрессирующую BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, например, CAR, вводят одновременно или последовательно, в любом порядке, с другой сконструированной клеткой,

экспрессирующей рекомбинантный рецептор, который связывает другой антиген-мишень или другой эпитоп на BCMA. В некоторых вариантах осуществления множество клеток может находиться в одной и той же композиции. Примеры композиций клеток включают композиции, описанные в Разделе IV ниже.

D. Культивирование, экспансия и формирование композиций сконструированных клеток

[0612] В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают одну или более стадий cultivating клеток, например, культивирования клеток в условиях, которые промотируют пролиферацию и/или экспансию. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях, которые промотируют пролиферацию и/или экспансию, после стадии генетического конструирования, например, путем введения рекомбинантного полипептида в клетки методом трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют после того, как клетки были инкубированы в стимулирующих условиях и трансдуцированы или трансфицированы рекомбинантным полинуклеотидом, например, полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор.

[0613] В некоторых вариантах осуществления одна или более композиций сконструированных Т-клеток представляют собой или включают две отдельные композиции обогащенных Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных Т-клеток, которые отобраны, выделены и/или обогащены из одного и того же биологического образца, по отдельности культивируют в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления две отдельные композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и обогащенных CD8+ Т-клеток по отдельности культивируют, например, в условиях, которые промотируют пролиферацию и/или экспансию.

[0614] В некоторых вариантах осуществления культивируют одну композицию обогащенных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления одна композицич представляет собой композицию обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток, которые объединили из отдельных композиций до культивирования. В некоторых вариантах осуществления отдельные композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию и культивируют, например, в условиях, которые промотируют пролиферацию и/или экспансию. В некоторых вариантах осуществления отдельные культивированные композиции обогащенных CD4+ и обогащенных CD8+ Т-клеток объединяют в одну композицию после осуществления и/или завершения культивирования.

[0615] В некоторых вариантах осуществления культивирование осуществляют в условиях, которые промотируют пролиферацию и/или экспансию. В некоторых вариантах осуществления такие условия могут быть предназначены для индукции пролиферации,

экспансии, 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 промотирования роста, деления и/или экспансии клеток.

[0616] В конкретных вариантах осуществления клетки культивируют в присутстви одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления один или более цитокинов представляют собой рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления один или более 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 представляют собой или включают цитокины, являющиеся членами семейства пучков 4-альфа-спиралей. В некоторых вариантах осуществления цитокины, являющиеся членами семейства пучков 4-альфа-спиралей, включают, но не ограничиваются этим, 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 более 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, при концентрации между 1 IU/мл и 2000 IU/мл, между 10 IU/мл и 100 IU/мл, между 50 IU/мл и 200 IU/мл, между 100 IU/мл и 500 IU/мл, между 100 IU/мл и 1000 IU/мл, между 500 IU/мл и 2000 IU/мл, или между 100 IU/мл и 1500 IU/мл.

[0617] В некоторых вариантах осуществления культивирование осуществляют в условиях, которые как правило, включают температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты человека, например, по меньшей мере около 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере около 30 градусов Цельсия, и обычно при или около 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при температуре от 25 до 38 градусов Цельсия, например, от 30 до 37 градусов Цельсия, например, при или около 37 градусов Цельсия ± 2 градуса Цельсия. В некоторых вариантах осуществления инкубацию осуществляют в течение периода времени, пока культура, например, культивирование или экспансия не приведет к желаемой или пороговой плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления инкубацию осуществляют в течение времени больше или примерно больше или в течение или примерно в течение 24 часов, 48 часов, 72 часов, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или более.

[0618] В конкретных вариантах осуществления культивирование осуществляют в закрытой системе. В некоторых вариантах культивирование осуществляют в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления культивирование осуществляют в той же закрытой системе, что и одну или несколько стадий представленных систем. В некоторых вариантах осуществления композицию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в биореактор и/или соединяют с ним для культивирования. Примеры подходящих биореакторов для культивирования включают, но не ограничиваются этим, GE Xuri™ W25, GE Xuri™ W5, Sartorius BioSTAT® RM 20 | 50, биореакторные системы Finesse SmartRocker™ и биореакторные системы Pall® XRS. В некоторых вариантах осуществления биореактор используют для перфузии и/или смешивания клеток во время, по меньшей мере, части стадии культивирования.

[0619] 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, но не ограничивается этим, вращение вдоль горизонтальной оси, вращение вдоль вертикальной оси, качательное движение вдоль находящейся под углом или наклонной горизонтальной оси биореактора, или любую комбинацию вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации осуществляют при покачивании. Скорость качания и угол качания можно регулировать для достижения желаемого перемешивания. В некоторых вариантах осуществления угол качания 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 качания находится между 6-16°. В других вариантах осуществления угол качания находится между 7-16°. В других вариантах осуществления угол качания находится между 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 находится между 4 и 12 об/мин, например, между 4 и 6 об/мин, включительно.

[0620] В некоторых вариантах осуществления биореактор поддерживает температуру на уровне 37°C или около этого уровня и уровень CO2 на уровне 5% или около этого при постоянном потоке воздуха примерно при 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 осуществляют 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 экспансии клеточной культуры осуществляют с качательным движением, например, под углом от 5° до 10°, например, 6°, при постоянной скорости качания, такой как скорость между 5 и 15 об/мин, например, 6 об/мин или 10 об/мин.

[0621] В некоторых вариантах осуществления представленные способы изготовления, создания или получения клеточной терапии и/или сконструированных клеток могут включать композицию клеток, например, композицию генетически сконструированных клеток, полученных в результате предусмотренных 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 получение композиций клеток, можно осуществлять в закрытой системе. В некоторых случаях клетки обрабатывают в одну или несколько стадий (например, осуществляемых в центрифужной камере и/или в закрытой системе) для изготовления, создания или получения клеточной терапии, и/или сконструированные клетки могут включать композицию клеток, такую как композиция сконструированных клеток, полученных в результате предусмотренных стадий трансдукции до или после культивирования, например, культивирования и экспансии и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано.

[0622] В некоторых вариантах осуществления доза клеток, включающих клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, представлена в виде композиции или состава, например фармацевтической композиции или состава. Такие композиции можно использовать в соответствии с предложенными способами, например, для профилактики или лечения заболеваний, состояний и расстройств или в способах детекции, диагностики и прогнозирования. В некоторых случаях клетки могут быть сформированы в композицию в количестве для дозированного введения, например, для введения одной стандартной дозы или введения нескольких доз.

[0623] В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть помещены в контейнер, такой как пакет или флакон.

[0624] В некоторых вариантах осуществления клетки формулируют в композицию 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 формирования композиции, который является фармацевтически приемлемым или желательным для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления стадии обработки могут включать промывку 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, включающих 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 предотвращения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

[0625] В некоторых вариантах осуществления буфер для формирования композиции

содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления клетки формулируют в композицию с раствором криоконсерванта, который содержит от 1,0% до 30% раствора DMSO, например, от 5% до 20% раствора DMSO или от 5% до 10% раствора DMSO. В некоторых вариантах осуществления раствор для криоконсервации представляет собой или содержит, например, PBS, содержащий 20% DMSO 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 около 7,5% DMSO. 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 подвергают замораживанию, например, криопротекции или криоконсервации, в среде и/или растворе с конечной концентрацией равной или около 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% DMSO, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% DMSO. В конкретных вариантах осуществления клетки замораживают, например, подвергают криопротекции или криоконсервации, в среде и/или растворе с конечной концентрацией равной или около 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.

[0626] В некоторых вариантах осуществления формирование композиции осуществляют с использованием одной или нескольких стадий обработки, включая промывку, разбавление или концентрирование клеток, таких как культивированные или размноженные клетки. В некоторых вариантах осуществления обработка может включать разбавление или концентрирование клеток до желаемой концентрации или количества, например, для получения композиции в форме единичной дозы, включающей количество клеток для введения в данной дозе или ее фракции. 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 добавление объема, чтобы таким образом уменьшить концентрацию клеток, при необходимости. В некоторых вариантах осуществления обработка включает добавление объема буфера для формирования композиции к трансдуцированным и/или размноженным клеткам. В некоторых вариантах осуществления объем буфера для формирования композиции составляет от или примерно от 10 мл до 1000 мл, например, по меньшей мере или примерно по меньшей мере или около или 50 мл, 100 мл, 200 мл, 300 мл, 400 мл, 500 мл, 600 мл. мл, 700 мл, 800 мл, 900 мл или 1000 мл.

[0627] В некоторых вариантах осуществления такие стадии обработки для формирования клеточной композиции осуществляют в закрытой системе. В качестве примера, такие стадии обработки можно осуществить 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 системами обработки клеток Sepax® или Sepax 2®. Примеры системы и способа описаны в международной публикации № WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления способ включает осуществление экспрессии из сформированной композиции во внутренней полости центрифужной камеры, которая представляет собой композицию клеток, полученную в буфере для формирования композиции, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из приведенных выше вариантов осуществления, как описано. В некоторых вариантах осуществления экспрессия сформу сформированной композиции осуществляется в контейнер, например, флаконы резервуаров для биомедицинских материалов, описанные в настоящей заявке, которые функционально связаны как часть закрытой системы с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления резервуары для биомедицинского материала сконфигурированы для интеграции и/или функционального соединения и/или интегрированы или функционально связаны с закрытой системой или устройством, которое выполняет один или несколько этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления резервуар для биомедицинского материала соединен с системой на линии вывода или в положении вывода. В некоторых случаях закрытая система соединяется с резервуаром для биомедицинского материала на входной трубке. Типичные закрытые системы для использования с описанными в настоящей заявке резервуарами для биомедицинских материалов включают системы Sepax® и Sepax® 2.

[0628] В некоторых вариантах осуществления закрытая система, например, связанная с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает выходной комплект с несколькими отверстиями, содержащий многоканальный трубопровод с отводами, связанный на каждом конце трубопроводной линии с отверстием, с которым может быть соединен один или несколько контейнеров для экспрессии сформированной композиции. В некоторых аспектах желаемое количество или множество флаконов могут быть стерильно соединены с одним или несколькими, как правило, двумя или более, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более отверстиями многоканального выхода. Например, в некоторых вариантах осуществления один или несколько контейнеров, например, резервуаров для биомедицинских материалов, могут быть присоединены к отверстиям или не ко всем отверстиям. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления система может осуществлять экспрессию выводимой композиции во множество флаконов резервуаров для биомедицинского материала.

[0629] В некоторых аспектах клетки могут быть экспрессированы в один или более из множества выходных контейнеров, например флаконов, в количестве для введения дозы, например, для введения разовой стандартной дозы или введения нескольких дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления каждый из флаконов может содержать определенное количество клеток для введения в данной дозе или ее фракции. Таким образом, в некоторых аспектах 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.

[0630] Таким образом, контейнеры, т.е. пакеты или флаконы, как правило, содержат клетки для введения, например, одну или несколько стандартных доз. Стандартная доза может представлять собой количество или число клеток, которое должно быть введено субъекту, или количество, которое в два раза (или более) больше количества клеток, которое должно быть введено. Это может быть самая низкая доза или самая низкая возможная доза клеток, которую можно вводить субъекту.

[0631] В некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров, например пакетов или флаконов, индивидуально включает одноразовую дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления каждый из контейнеров включает одинаковое или примерно или по существу одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления каждая одноразовая доза содержит по меньшей мере или примерно по меньшей мере 1×10^6, 2×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7 или 1×10^8 сконструированных клеток, общего количества клеток, Т-клеток или PBMC. В некоторых вариантах осуществления объем сформированной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от 10 мл до 100 мл, например, по меньшей мере или примерно по меньшей мере 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. В некоторых вариантах осуществления клетки в контейнере, например, пакете или флаконах, могут быть криоконсервированными. В некоторых вариантах осуществления контейнер, например, флаконы, можно хранить в жидком азоте до последующего использования.

[0632] В некоторых аспектах сконструированные клетки или клеточные композиции оценивают на одной или нескольких стадиях или во временных точках в процессе изготовления, в том числе до того как сконструированные клетки или клеточные композиции, содержащие сконструированные клетки, выпускают для инфузии, как готовые для введения субъекту и/или для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки или клеточные композиции выпускают для инфузии, готовыми для введения субъекту и/или для введения субъекту после оценки количества, количества или процента клеток, которые были сконструированы и/или экспрессируют анти-BCMA CAR в соответствии с представленными вариантами осуществления, например, на части, фракции и/или образце сконструированных клеток или клеточных композиций. В конкретных вариантах осуществления сконструированные клетки или клеточные композиции выпускают для инфузии, готовыми для введения субъекту и/или для введения субъекту после того, как будет определено, что клетки являются безопасными, например, стерильными и/или свободными, и/или имеют желаемые биологические характеристики после завершения одного или нескольких способов, такие как содержание меньше или больше требуемого порогового количества копий последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих анти-BCMA CAR, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления такую оценку можно использовать для определения количества и/или процента клеток, экспрессирующих CAR, для определения подходящей дозы клеток

для введения. В некоторых аспектах для субъектов, которые получали предшествующую адоптивную клеточную терапию, такую как предшествующая экспрессирующая BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, CAR) Т-клеточная терапия (CAR Т-клеточная терапия), представленные способы и применения могут также включать оценку сконструированные клетки или клеточных композиций на присутствие, количество и/или уровень предшествующего BCMA-направленного рекомбинантного рецептора (например, CAR). В некоторых аспектах оценку присутствия, количества и/или уровня предшествующего BCMA-направленного рекомбинантного рецептора (например, CAR) можно использовать для детекции любых оставшихся клеток, которые экспрессируют предшествующий рекомбинантный рецептор, и, при необходимости, исключения таких клеток, которые все еще экспрессируют предшествующий рекомбинантный рецептор, или обогащения клетками, которые не экспрессируют предшествующий рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах такие способы можно использовать для уменьшения или предотвращения введения клеток, которые все еще содержат предшествующий рекомбинантный рецептор (например, CAR).

[0633] В некоторых вариантах осуществления присутствие и/или количество анти-BCMA CAR (и, в некоторых случаях, предшествующего рекомбинантного рецептора) оценивают путем детекции экспрессии рекомбинантного рецептора или присутствия последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых аспектах присутствие рекомбинантного рецептора можно оценить любыми способами, которые могут определять присутствие, отсутствие, уровень и/или количество белка или нуклеиновой кислоты в биологическом образце, например, с использованием способов на основе нуклеиновых кислот, таких как количественная ПЦР (кПЦР); или способов на основе клеток, таких как проточная цитометрия, или других анализов, таких как иммуноанализ, ELISA или анализы на основе хроматографии/масс-спектрометрии. Анти-BCMA CAR или клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, могут быть обнаружены с использованием методов на основе проточной цитометрии или количественной ПЦР и экстраполяции на общее число клеток с использованием известных способов. См., например, Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177), Park et al., Molecular Therapy 15(4):825-833 (2007), Savoldo et al., JCI 121(5):1822-1826 (2011), Davila et al., (2013) PLoS ONE 8(4):e61338, Davila et al., Oncoimmunology 1(9):1577-1583 (2012), Lamers, Blood 2011 117:72-82, Jensen et al., Biol Blood Marrow Transplant 2010, сентябрь; 16(9): 1245-1256, Brentjens et al., Blood 2011 118(18):4817-4828.

[0634] Примеры методов на основе нуклеиновых кислот для оценки наличия рекомбинантного рецептора включают методы на основе полимеразной цепной реакции, такие как количественная ПЦР (кПЦР), цифровая ПЦР (цПЦР) или капельная цифровая ПЦР (кцПЦР). В некоторых аспектах присутствие, отсутствие и/или количество конкретной последовательности можно обнаружить с использованием зонда или праймера, которые могут специфически связывать, обнаруживать, распознавать и/или амплифицировать всю или часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный

рецептор. В некоторых вариантах осуществления праймеры или зонд, используемые для количественной ПЦР или других методов на основе нуклеиновых кислот, являются специфическими для связывания, распознавания и/или амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный белок (например, анти-BCMA CAR и, в некоторых случаях, предшествующий рекомбинантный рецептор), и/или других компонентов или элементов плазмиды и/или вектора, включая регуляторные элементы, например, промоторы, транскрипционные и/или посттранскрипционные регуляторные элементы или элементы ответа, или маркеры, например, суррогатные маркеры. В некоторых аспектах примеры методов на основе нуклеиновых кислот для оценки присутствия рекомбинантного рецептора включают высокопроизводительное РНК- секвенирование (RNA-seq) или другие высокопроизводительные способы для оценки экспрессии нуклеиновых кислот в образце. В некоторых аспектах иллюстративные способы оценки сконструированных клеток или композиции на присутствие и/или количество нуклеиновых кислот, кодирующих анти-BCMA CAR, включают способы, описанные в WO 2020/033916.

[0635] Примеры методов на основе клеток или белков для оценки присутствия рекомбинантного рецептора (например, анти-BCMA CAR и, в некоторых случаях, предшествующего рекомбинантного рецептора), включают проточную цитометрию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуноферментный анализ (EIA), радиоиммуноанализ (RIA), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), вестерн-блоттинг, анализ латерального потока, иммуногистохимию, белковый микрочип или иммуно-ПЦР (иПЦР).

[0636] В некоторых вариантах осуществления присутствие клеток, экспрессирующих BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, анти-BCMA CAR и, в некоторых случаях, предшествующий рекомбинантный рецептор), в сконструированных клетках или клеточной композиции можно обнаружить с использованием таких реагентов, как выделенный или очищенный антиген, например, рекомбинантно экспрессированный антиген, например, рекомбинантный BCMA-Fc (растворимый человеческий BCMA, слитый на своем С-конце с Fc-областью IgG). В некоторых вариантах осуществления присутствие клеток, экспрессирующих анти-BCMA CAR, в сконструированных клетках или клеточной композиции можно обнаружить с использованием реагентов, которые могут специфически обнаруживать присутствие анти-BCMA CAR, таких как антиидиотипическое антитело, анти-идиотипическое агонистическое антитело, специфическое в отношении связывающего домена, например, scFv или его части. Иллюстративные антиидиотипические антитела описаны в PCT/US2020/063492, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула представляет собой или содержит выделенный или очищенный антиген, например рекомбинантно экспрессированный антиген. В некоторых случаях, например, для субъектов, которые получали предшествующую терапию клетками, экспрессирующими BCMA-направленный рекомбинантный рецептор (например, CAR Т-клетками), можно сравнить количество или

уровень BCMA-связывающих рекомбинантных рецепторов, оцененный с использованием выделенного или очищенного антигена (например, рекомбинантного BCMA-Fc; детекцией любого рекомбинантного рецептора, который связывается с BCMA, включая предшествующий BCMA-направленный рекомбинантный рецептор и анти-BCMA CAR для использования в соответствии с представленными способами), и количество или уровень анти-BCMA CAR, определенный с использованием конкретного рекомбинантного рецептор-специфического реагента, например, антиидиотипического антитела против специфического анти-BCMA CAR. В некоторых случаях различия между двумя количествами могут указывать на присутствие и/или количество клеток, экспрессирующих предшествующий рекомбинантный рецептор, например, предшествующую BCMA-направленную CAR Т-терапию.

[0637] В некоторых вариантах осуществления такие клетки, полученные данным способом, или композицию, содержащую такие клетки, вводят субъекту для лечения заболевания или состояния.

E. Иллюстративный способ и характеристики

[0638] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, такие как те, которые экспрессируют анти-BCMA CAR, как описано, используемые в соответствии с представленными способами, получают или генерируют способом отбора, выделения, активации, стимуляции, размножения, культивирования и/или формирования композиций клеток. В некоторых вариантах осуществления такие способы включают любые из описанных.

[0639] 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, отбирают, обогащают или получают из одного биологического образца, например, образца PBMC или других лейкоцитов от одного и того же донора, такого как пациент или здоровый субъект. В некоторых вариантах осуществления отдельная композиция обогащенных CD4+ Т-клеток и отдельная композиция обогащенных CD8+ Т-клеток происходили, например, были первоначально выделены, отобраны и/или обогащены из одного и того же биологического образца, такого как один биологический образец, полученный, собранный и/или взятый у одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления биологический образец сначала подвергают селекции CD4+ Т-клеток, при этом сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции, а отрицательную фракцию затем 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, а отрицательную фракцию затем подвергают селекции CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления способы селекции осуществляют, как описано в международной публикации PCT № WO2015/164675. В некоторых аспектах биологический образец сначала подвергается положительной селекции на CD8+ Т-клетки для получения по меньшей мере одной композиции обогащенных CD8+ Т-клеток, а затем отрицательная фракция

подвергается положительной селекции на CD4+ Т-клетки для получения по меньшей мере одной композиции обогащенных CD4+ Т-клеток, таким образом, 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 донора, такого как пациент или здоровый субъект. В некоторых аспектах две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток, 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 того же донора, замораживают по отдельности, например, методом криопротекции или криоконсервирования в криоконсервирующей среде.

[0640] В некоторых вариантах осуществления клетки из композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и клетки из композиции обогащенных CD8+ Т-клеток смешивают, комбинируют и/или объединяют для получения входящей композиции, содержащей CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют перед инкубацией клеток в стимулирующих условиях. В некоторых вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют после выделения, обогащения и/или отбора CD4+ и CD8+ Т-клеток из биологического образца. В конкретных вариантах осуществления композиции обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток объединяют, смешивают и/или комбинируют после замораживания, например криоконсервации, и оттаивания композиций обогащенных CD4+ и CD8+ Т-клеток.

[0641] В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении от 3:1 до 1:3, от 2:1 до 1:2, от 1,5 до 0,75, от 1,25 до 0,75 или от 1,2 до 0,8. В конкретных вариантах осуществления входящая композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении от 3:1 до 1:3. В конкретных вариантах входящая композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении от 2:1 до 1:2. В некоторых вариантах осуществления входящая композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении 2:1 или около этого. В некоторых вариантах осуществления входящая композиция содержит CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении 1:1.

[0642] В некоторых аспектах две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток, например, где 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 того же биологического образца, размораживают и смешивают, объединяют и/или комбинируют, и композиции, необязательно, можно промыть до или после смешивания, объединения и/или комбинирования. В некоторых аспектах смешанные, комбинированные и/или объединенные и необязательно промытые композиции обогащенных Т-клеток образуют входящую композицию. В некоторых

аспектах входящую композицию (например, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки в соотношении примерно 1:1 или примерно 1) активируют и/или стимулируют путем ее контактирования со стимулирующим реагентом (например, путем инкубации с CD3/CD28-конъюгированными магнитными шариками для активации Т-клеток). В некоторых аспектах активированную/стимулированную клеточную композицию используют для конструирования, трансдукции и/или трансфекции, например, с использованием вирусного вектора, кодирующего рекомбинантный белок (например, CAR), для экспрессии такого же рекомбинантного белка в CD4+ Т-клетках и CD8+ Т-клетках клеточной композиции. В некоторых аспектах способ включает удаление стимулирующего реагента, например, магнитных шариков, из клеточной композиции. В некоторых аспектах клеточную композицию, содержащую сконструированные CD4+ Т-клетки и сконструированные CD8+ Т-клетки, культивируют, например, для размножения в ней популяций CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточную композицию из культивирования отбирают, и/или собирают, и/или формируют в композицию, например, путем промывки клеточной композиции в буфере для формирования композиций. В некоторых вариантах осуществления сформированную клеточную композицию, содержащую CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки, замораживают, например, подвергают криопротекции или криоконсервации в среде для криоконсервации. В некоторых аспектах сконструированные Т-клетки CD4+ и Т-клетки CD8+ в композиции происходят от одного и того же донора или биологического образца и экспрессируют один и тот же рекомбинационный белок (например, CAR), и композицию вводят нуждающемуся в этом субъекту, например, тому же донору.

[0643] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, такие как те, которые экспрессируют анти-BCMA CAR, как описано, и композиции, содержащие такие клетки, такие как композиции, содержащие CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA химерный антигенный рецептор (CAR), используемые в соответствии с представленными способами, получают или генерируют с использованием иллюстративного способа, который включает отдельный отбор Т-клеток CD4+ и CD8+ из образца перед объединением выбранных клеток в определенном соотношении для последующих стадий обработки.

[0644] В некоторых аспектах иллюстративного способа отдельные композиции клеток CD4+ и CD8+ выбирают из выделенных PBMC из образца лейкафереза человека, и выбранные композиции клеток подвергают криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления субъект-человек представляет собой субъекта, страдающего множественной миеломой (ММ). В некоторых аспектах выбранные композиции CD4+ и CD8+ Т-клеток затем размораживают и смешивают в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам до осуществления стадий стимулирования, трансдукции и размножения. В иллюстративном варианте осуществления приблизительно 300×10^6 Т-клеток (150×10^6 CD4+ и 150×10^6 CD8+ Т-клеток) из смешанной клеточной композиции при плотности примерно 3×10^6 клеток/мл стимулируют в

присутствии парамагнитных покрытых полистиролом шариков с иммобилизованными анти-CD3 и анти-CD28 антителами, при соотношении шариков к клеткам 1:1, в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления среда также содержит рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. Стимуляцию осуществляют путем инкубации в течение от 18 до 30 часов.

[0645] В некоторых аспектах иллюстративного способа после инкубации примерно 100×10^6 жизнеспособных клеток из стимулированной клеточной композиции промывают и ресуспендируют в иллюстративной бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15. В некоторых случаях адъювант для трансдукции не добавляют. В некоторых аспектах клетки трансдуцируют иллюстративным лентивирусным вектором, кодирующим любой из иллюстративных анти-BCMA CAR, описанных в настоящей заявке (например, содержащий антигенсвязывающий домен scFv, специфический в отношении BCMA, трансмембранную область CD28, костимулирующую сигнальную область 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3-зета), путем спин-окуляции в течение 60 минут с последующей инкубацией в течение от 18 до 30 часов при температуре около 37°C. В некоторых аспектах плотность клеток после спин-окуляции составляет около 1×10^6 клеток/мл.

[0646] В некоторых вариантах осуществления трансдуцированные клетки затем культивируют для размножения путем переноса в биореактор (например, биореактор с качающимся движением) примерно в 500 мл иллюстративной бессывороточной среды, содержащей концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15 в два раза больше той, которую использовали на стадиях инкубации и трансдукции. В некоторых иллюстративных способах иллюстративная среда не содержит полоксамер.

[0647] В некоторых аспектах после достижения пороговой плотности клеток более или около $0,6\times10^6$ клеток/мл среду добавляют поэтапно с периодическим добавлением порций свежей среды, например, с интервалами от примерно 2 до примерно 15 минут до объема 1000 мл, и клетки культивируют в условиях постоянного качания (без перфузии) до тех пор, пока не будет достигнута пороговая плотность жизнеспособных клеток больше или около $0,6\times10^6$ клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления, если плотность жизнеспособных клеток превышает $0,8\times10^6$ клеток/мл, инициируют стадию комбинации наполнения/перфузии, при которой первую среду добавляют поэтапно, например, как указано выше, до достижения целевого объема 1000 мл, затем начинают перфузию, как описано ниже. В некоторых аспектах среду затем заменяют путем полунепрерывной перфузии с непрерывным перемешиванием. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии и/или скорость качания увеличиваю по меньшей мере один раз во время фазы размножения по мере увеличения плотности клеток. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии увеличивают по меньшей мере один раз во время фазы размножения по мере увеличения плотности клеток. В некоторых вариантах осуществления среду добавляют в культуру поэтапно, при этом общий объем в день определяют по плотности жизнеспособных клеток (например, с более высокими скоростями при

достижении определенной плотности), вплоть до скорости, например, приводящей к общему количеству приблизительно 750 мл или 1500 мл свежей среды, добавляемому к культуре в день (с более высокими скоростями, когда достигаются более высокие концентрации клеток), с периодическим добавлением порций свежей среды в течение дня, например, с временными интервалами от примерно 0,5 до примерно 1,5 или 2 часов. В некоторых вариантах осуществления клетки собирают через день после достижения иллюстративного порога размножения примерно 3500×10^6 или 5500×10^6. В некоторых вариантах осуществления клетки собирают через день после того, как общее количество ядерных клеток (TNC) достигает по меньшей мере или по меньшей мере примерно 3500×10^6, и в момент, когда количество TNC достигает по меньшей мере или по меньшей мере примерно 5500×10^6 ядерных клеток. После сбора анти-CD3 и анти-CD28 антитело-конъюгированные шарики удаляют из клеточной композиции под воздействием магнитного поля. Затем клетки формируют в композицию, аликвоты помещают в пакеты для замораживания для введения (например, пакеты для замораживания CryoStore™) и флаконы для дальнейшего анализа и криоконсервируют. В некоторых случаях сформированную клеточную композицию распределяют в пакеты аликвотами по 30 мл объема. В некоторых случаях клетки криоконсервируют при переменной концентрации при условии соблюдения целевого количества клеток для общего количества выходящей композиции.

[0648] В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, такие как те, которые экспрессируют анти-BCMA CAR, как описано, и композиции, содержащие такие клетки, такие как композиции, содержащие CD4+ и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA химерный антигенный рецептор (CAR), используемые в соответствии с представленными способами, получают или генерируют с использованием другого иллюстративного способа. В иллюстративном способе первичные CD4+ и CD8+ клетки обогащают из биологических образцов, содержащих PBMC, из образца лейкафереза человека, в том числе от субъектов, страдающих множественной миеломой (MM). В некоторых аспектах обогащенные CD4+ и обогащенные CD8+ клеточные композиции криоконсервируют по отдельности, а затем размораживают и смешивают в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам перед осуществлением стадий стимуляции, трансдукции и размножения. В некоторых аспектах обогащенные CD4+ и обогащенные CD8+ клеточные композиции криоконсервируют по отдельности, а затем размораживают и смешивают в отношении 2:1 жизнеспособных CD4+ Т-клеток к жизнеспособным CD8+ Т-клеткам до осуществления стадий стимуляции, трансдукции и размножения.

[0649] В некоторых вариантах осуществления приблизительно 300×10^6 Т-клеток (например, 150×10^6 CD4+ и 150×10^6 CD8+ Т-клеток) из смешанной клеточной композиции при плотности примерно 3×10^6 клеток/мл инкубируют в течение от 18 до 30 часов в присутствии покрытых полистиролом парамагнитных шариков с иммобилизованными анти-CD3 и анти-CD28 антителами, при соотношении шариков к клеткам 1:1, в

иллюстративной бессывороточной среде, содержащей рекомбинантный IL-2, IL-7 и IL-15.

[0650] В некоторых аспектах после инкубации по меньшей мере примерно 100×10^6 и вплоть до примерно 200×10^6 жизнеспособных клеток из инкубированной клеточной композиции трансдуцируют, в иллюстративной бессывороточной среде с цитокинами, с использованием лентивирусного вектора, кодирующего любой из иллюстративных анти-BCMA CAR, описанных в настоящей заявке (например, содержащих антигенсвязывающий домен scFv, специфический в отношении BCMA, трансмембранную область CD28, костимулирующую сигнальную область 4-1BB и внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3-зета), путем спин-окуляции в течение 60 минут с последующей инкубацией в течение примерно 18-30 часов при температуре примерно 37°C.

[0651] В некоторых вариантах осуществления трансдуцированные клетки затем размножают путем культивирования в биореакторе (например, в биореакторе с качающимся движением) примерно в 500 мл иллюстративной бессывороточной среды, содержащей концентрацию IL-2, IL-7 и IL-15 в два раза больше, на чем используемая на стадиях инкубации и трансдукции. В некоторых аспектах среда не содержит или свободна от полоксамера. В некоторых аспектах после того, как достижение плотности клеток выше или примерно $0,6\times10^6$ клеток/мл считается достигнутым, среду добавляют поэтапно с периодическим добавлением порций свежей среды, например, с интервалами от примерно 2 до примерно 15 минут, до объема 1000 мл и клетки культивируют в условиях стационарного качания (без перфузии) до тех пор, пока не будет достигнута пороговая плотность жизнеспособных клеток, превышающая или около $0,6\times10^6$ клеток/мл. В некоторых аспектах, если плотность жизнеспособных клеток превышает $0,8\times10^6$ клеток/мл, инициируют стадию комбинации наполнения/перфузии, где первую среду добавляют поэтапно, как указано выше, до целевого объема 1000 мл, затем начинают перфузию. В некоторых вариантах осуществления среду заменяют путем полунепрерывной перфузии с непрерывным перемешиванием. В некоторых аспектах скорость перфузии и/или скорость качания увеличивают по меньшей мере один раз во время фазы размножения по мере увеличения плотности клеток. В некоторых вариантах осуществления скорость перфузии увеличивают по меньшей мере один раз во время фазы размножения по мере увеличения плотности клеток. В некоторых аспектах среду добавляют к культуре поэтапно, при этом общий объем в день определяют по плотности жизнеспособных клеток (например, с более высокими скоростями при достижении определенной плотности), вплоть до скорости, например, приводящей к общему количеству приблизительно 750 мл или 1500 мл свежей среды, добавляемой к культуре в день (например, с более высокой скоростью, когда достигаются более высокие концентрации клеток), с периодическим добавлением порций свежей среды в течение дня, например, с временными интервалами от примерно 0,5 до примерно 1,5 или 2 часов. В некоторых вариантах осуществления клетки собирают через день после того, как общее количество ядерных клеток (TNC) достигает по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1000×10^6, и в момент, когда количество TNC достигает по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 2400×10^6 общего

количества ядерных клеток с жизнеспособностью не менее 85%. В некоторых аспектах после сбора анти-CD3 и анти-CD28 антитело-конъюгированные шарики удаляют из клеточной композиции.

[0652] В некоторых вариантах осуществления клетки затем формируют в композицию и аликвоты композиции переносят в контейнеры, например, для последующего хранения или использования. В некоторых вариантах осуществления сформированные композиции или их части переносят в пакеты для замораживания, подходящие для криоконсервации и хранения клеточных композиций, например, для потенциального введения субъектам (такие как пакеты для замораживания CryoStore™), и/или композиции или их части переносят во флаконы или другие контейнеры, например, для дальнейшего анализа клеток. В некоторых аспектах клетки криоконсервируют, например, в условиях, подходящих для последующего оттаивания и использования для введения. В некоторых случаях в отдельных пакетах используются 30 мл сформированныех в композицию клеток. В некоторых случаях клетки криоконсервируют при переменной общей концентрации клеток, например, чтобы обеспечить постоянное количество или концентрацию CAR+ Т-клеток в каждой дозе в контексте клеток для введения. В некоторых вариантах осуществления количество целевых CAR+CD3+ клеток равно или приблизительно равно желаемому количеству (например, равному или около $37,5\times10^6$) CAR+CD3+ клеток на 30 мл или на пакет, что в некоторых вариантах осуществления включает варьирование общих концентраций клеток в композициях, полученных от разных доноров или пациентов.

[0653] В некоторых аспектах, для отдельных образцов лейкафереза, полученных от ряда пациентов с множественной миеломой, такой иллюстративный способ получения сконструированных клеточных композиций из таких образцов может привести к диапазону продолжительности части способа от начала активации до сбора клеток от 5 до 8 дней, и средней продолжительности среди этих образцов 5,5 дней. В некоторых аспектах среднее число кумулятивных удвоений популяции в этом способе для этой группы образцов может составлять приблизительно 5.

[0654] В некоторых аспектах иллюстративные способы, описанные в настоящей заявке, можно использовать для получения композиций сконструированных Т-клеток из ряда образцов лейкафереза множественной миеломы человека. В некоторых аспектах оценивают различные параметры, в том числе те, которые отражают клеточный фенотип, функцию и конструирование клеток. В некоторых вариантах осуществления чистота Т-клеток, представление Т-клеточной линии, частота трансдукции и функциональность, согласно наблюдениям, по существу аналогичны композициям, полученным с этими продуктами лейкафереза с использованием другого иллюстративного способа (например, описанного выше). В некоторых аспектах наблюдается уменьшенное число удвоений популяции и средняя продолжительность дней между началом активации и сбором клеток при использовании описанного выше иллюстративного способа по сравнению с другим иллюстративным способом (например, описанным выше). В некоторых аспектах

аналогичный или повышенный процент клеток фенотипа центральной памяти (и аналогичный или уменьшенный процент клеток, имеющих фенотип эффекторной памяти) наблюдается в сконструированных клеточных композициях, полученных различными иллюстративными способами, описанными в настоящей заявке.

[0655] В некоторых вариантах осуществления композиции сконструированных клеток получают с использованием способов, которые в некоторых аспектах имеют определенные показатели эффективности, такие как высокие показатели эффективности или показатели эффективности, превышающие пороговое значение, такие как те, которые способны создавать терапевтические клеточные композиции, например, способные создавать такие композиции, обладающие определенными требуемыми или желательными характеристиками, для большого количества или процента образцов, например, для всех или большого процента образцов, каждый из которых получен от другого отдельного субъекта или пациента, такого как субъект или пациент, подлежащий лечению терапевтической композицией (например, в контексте аутологичной клеточной терапии). В некоторых аспектах субъекты или пациенты имеют заболевание или состояние, такое как рак, такой как рак крови, или гематологический рак, такой как множественная миелома. В некоторых аспектах образцы, из которых, в большом проценте случаев, можно получить терапевтические клеточные композиции, представляют собой образцы от пациентов, включая те, которые являются вариабельными, например, с точки зрения клеточного фенотипа или других параметров образцов или клеток из образцов. В некоторых вариантах осуществления композиции сконструированных клеток имеют улучшенную или высокую степень здоровья клеток, например, по сравнению с клеточными композициями, полученными другими способами. В некоторых вариантах осуществления композиции включают высокий процент клеток, отрицательных по маркеру апоптоза. В некоторых вариантах осуществления композиции сконструированных клеток получают способом, который позволяет получить композицию, включающую полифункциональные клетки с устойчивой продукцией цитокинов. В некоторых вариантах осуществления композиции сконструированных клеток получают способом, который дает Т-клеточные композиции, обогащенные фенотипом памяти, обогащенные фенотипом центральной памяти и/или обогащенные клетками, которые являются CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, гранзим B- и/или CD127+. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% или более клеток в композиции (или по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% или более клеток в композиции для по меньшей мере половины или большей части образцов, полученных с использованием конкретных способов, или, в среднем, для образцов, полученных с использованием конкретных способов), Т-клеток в композиции или сконструированных Т-клеток в композици, представляют собой Т-клетки фенотипа центральной памяти; представляют собой CD27+, CD28+; представляют собой CCR7+, CD45RA-; и/или представляют собой CCR7+, CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, или 80 или 85 или 90 или 95% или

более клеток в композиции (или по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, или 80, или 85, или 90, или 95% или более клеток в композиции для по меньшей мере половины или большей части образцов, полученных с использованием конкретных способов, или, в среднем, для образцов, полученных с использованием конкретных способов), Т-клеток в композици, или сконструированных Т-клеток в композици, представляют собой Т-клетки фенотипа памяти; представляют собой CD45RA-; и/или представляют собой CD45RO+.

[0656] В некоторых вариантах осуществления клетки композиции имеют высокую долю и/или частоту встречаемости клеток центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% клеток композиции имеют фенотип клеток памяти, имеют фенотип клеток центральной памяти или имеют фенотип Т-клеток центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% клеток композиции имеют фенотип Т-клеток центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60% или от или от около 60% и до или до около 65% клеток композиции имеют фенотип клеток памяти, имеют фенотип клеток центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% Т-клеток композиции имеют фенотип клеток памяти, имеют фенотип клеток центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% Т-клеток композиции имеют фенотип клеток памяти, имеют фенотип клеток центральной памяти, или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65% Т-клеток композиции имеют

фенотип клеток памяти, имеют фенотип клеток центральной памяти или представляют собой Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% CD4+ Т-клеток композиции представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% CD4+ Т-клеток композиции представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления, от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65% CD4+ Т-клеток композиции представляют собой CD4+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% CD4+CAR+ Т-клеток композиции представляют собой CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% CD4+CAR+ Т-клеток композиции представляют собой CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65% CD4+CAR+ Т-клеток композиции представляют собой CD4+CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% CD8+ Т-клеток композиции представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или

на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% CD8+ Т-клеток композиции представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65% CD8+ Т-клеток композиции представляют собой CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% CD8+CAR+ Т-клеток композиции представляют собой CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% CD8+CAR+ Т-клеток композиции представляют собой CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65% CD8+CAR+ Т-клеток композиции представляют собой CD8+CAR+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около 90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% CAR+ Т-клеток (например, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток) композиции представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% CAR+ Т-клеток (например, CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток) композиции представляют собой CD4+ или CD8+ Т-клетки центральной памяти. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 30%, по меньшей мере или на уровне или около 40%, по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 60%, по меньшей мере или на уровне или около 70%, по меньшей мере или на уровне или около 75%, по меньшей мере или на уровне или около 80%, по меньшей мере или на уровне или около 85%, по меньшей мере или на уровне или около

90%, по меньшей мере или на уровне или около 95% или больше чем 95% клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B- и/или CD127+. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере или на уровне или около 50%, по меньшей мере или на уровне или около 55%, по меньшей мере или на уровне или около 60% или по меньшей мере или на уровне или около 65% CAR+ Т-клеток в композиции представляют собой CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B-, и/или CD127+.

[0657] В некоторых вариантах осуществления итерации способов дают множество композиций, необязательно из биологических образцов от человека, где способ осуществляют среди множества различных индивидуальных субъектов. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент клеток фенотипа клеток памяти в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65%. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент клеток фенотипа центральной памяти в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65%. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент клеток, которые являются CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, гранзим B-, и/или CD127+ в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65%. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент клеток, которые являются CCR7+/CD45RA- или CCR7+/CD45RO+, в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65%. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент CD4+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD4+ Т-клетках (например, CAR+CD4+ Т-клетках) в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65%. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент CD8+ Т-клеток центральной памяти в сконструированных CD8+ Т-клетках (например, CAR+CD8+ Т-клетках) в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%,

от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%, или от или от около 60% и до или до около 65%. В некоторых вариантах осуществления средний (т.е. среднее значение) или медианный процент Т-клеток центральной памяти (например, CD4+ Т-клеток центральной памяти и CD8+ Т-клеток центральной памяти) в сконструированных Т-клетках (например, CAR+ Т-клетках) в множестве композиций составляет от или от около 40% и до или до около 65%, от или от около 40% и до или до около 45%, от или от около 45% и до или до около 50%, от или от около 50% и до или до около 55%, от или от около 55% и до или до около 60%. или от или от около 60% и до или до около 65%.

IV. Фармацевтические композиции

[0658] Также представлены композиции, включающие сконструированные клетки, экспрессирующие BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор, включая фармацевтические композиции и составы. Среди таких композиций есть те, которые включают сконструированные клетки, такие как множество сконструированных клеток, экспрессирующих представленные анти-BCMA рекомбинантные рецепторы (например, CAR). В некоторых аспектах также представлены композиции, например, клеточные композиции для использования в представленных способах и применениях, например, терапевтических способах и применениях. В некоторых вариантах осуществления представленные композиции способны достигать определенных терапевтических результатов, например, результатов ответа и безопасности, при введении субъектам, имеющим заболевание или расстройство, например, множественную миелому.

[0659] Представлены фармацевтические композиции, включающие BCMA-связывающие рекомбинантные химерные антигенные рецепторы или сконструированные клетки, экспрессирующие указанные рецепторы, множество сконструированных клеток, экспрессирующих указанные рецепторы и/или дополнительные средства для комбинированного лечения или терапии. Фармацевтические композиции и составы, как правило, включают один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления композиция включает по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство.

[0660] Термин “фармацевтическая композиция” относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введена композиция.

[0661] “Фармацевтически приемлемый носитель” относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается этим, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

[0662] В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной

клеткой, дополнительным терапевтическим средством и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих композиций. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и бензалконий хлорид. В некоторых аспектах используют смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси обычно присутствуют в количестве от около 0,0001% до около 2% по массе от общей массы композиции. Носители описаны, *например*, 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 ограничиваются этим: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмоний хлорид, гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид; бензетоний хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее примерно 10 остатков); 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 EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

[0663] 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 используют смесь двух или более буферных агентов. Буферные агенты или их смеси обычно присутствуют в количестве от около 0,001% до около 4% по массе от общей массы композиции. Известны способы получения вводимых фармацевтических композиций. Иллюстративные способы описаны более подробно в, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[0664] Состав или композиция также могут содержать более одного активного ингредиента, полезного при конкретном показании, заболевании или состоянии, которое лечат с использованием клеток или их композиций, предпочтительно с активностью, комплементарной клеткам или их композициям, где соответствующие активности 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 средства или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства, *например*, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин,

доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и др.

[0665] Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит клетки или их композиции 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 введения могут быть полезны и могут быть определены. Желаемая доза может доставляться путем однократного болюсного введения композиции, путем многократного болюсного введения композиции или путем непрерывного инфузионного введения композиции.

[0666] В некоторых вариантах осуществления, в контексте генетически сконструированных клеток, содержащих рекомбинантный рецептор, например CAR, субъекту вводят клетки в количестве, находящемся в диапазоне на уровне или около одного миллиона - на уровне или около 100 миллиардов клеток, как, *например*, 1 миллион - на уровне или около 50 миллиардов клеток (*например*, на уровне или около 5 миллионов клеток, на уровне или около 25 миллионов клеток, на уровне или около 50 миллионов клеток, на уровне или около 500 миллионов клеток, на уровне или около 1 миллиардов клеток, на уровне или около 5 миллиардов клеток, на уровне или около 20 миллиардов клеток, на уровне или около 30 миллиардов клеток, на уровне или около 40 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений), так как на уровне или около 10 миллионов до на уровне или около 100 миллиардов клеток (*например*, на уровне или около 20 миллионов клеток, на уровне или около 30 миллионов клеток, на уровне или около 40 миллионов клеток, на уровне или около 60 миллионов клеток, на уровне или около 70 миллионов клеток, на уровне или около 80 миллионов клеток, на уровне или около 90 миллионов клеток, на уровне или около 10 миллиардов клеток, на уровне или около 25 миллиардов клеток, на уровне или около 50 миллиардов клеток, на уровне или около 75 миллиардов клеток, на уровне или около 90 миллиардов клеток, или в диапазоне, определяемом любыми двумя из вышеперечисленных значений), и в некоторых случаях на уровне или около 100 миллионов клеток - на уровне или около 50 миллиардов клеток (*например*, на уровне или около 120 миллионов клеток, на уровне или около 150 миллионов клеток, на уровне или около 250 миллионов клеток, на уровне или около 300 миллионов клеток, на уровне или около 350 миллионов клеток, на уровне или около 450 миллионов клеток, на уровне или около 650 миллионов клеток, на уровне или около 800 миллионов клеток, на уровне или около 900 миллионов клеток, на уровне или около 1,2 миллиардов клеток, на уровне или около 3 миллиардов клеток, на уровне или около 30 миллиардов клеток, на уровне или около 45 миллиардов клеток), или количество клеток, равное любому промежуточному значению в этих пределах, и/или такое количество

клеток, которое определено в расчете на килограмм массы тела субъекта. В некоторых аспектах в контексте генетически сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например, CAR, композиция может содержать по меньшей мере количество клеток для введения для дозы клеточной терапии, такое как по меньшей мере количество, или около этого, клеток, описанных в настоящей заявке для введения, например, в Разделе I.A (3).

[0667] Композиции можно вводить с использованием стандартных способов введения, лекарственных форм и/или устройств. Представлены лекарственные формы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Введение клеток может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или клетки-предшественники можно получить от одного субъекта и ввести тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомство (*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), она, как правило, получена в виде стандартной дозированной формы для инъекций (раствор, суспензия, эмульсия).

[0668] Композиции включают композиции для перорального, внутривенного, интраперитонеального, подкожного, легочного, чрескожного, внутримышечного, интраназального, трансбуккального, сублингвального введения или введения в форме суппозиториев. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции вводят парентерально. Термин “парентеральный” в контексте настоящей заявки включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное, внутричерепное, внутригрудное и интраперитонеальное введение. В некоторых вариантах осуществления клеточные популяции вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, интраперитонеальной или подкожной инъекции.

[0669] 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 уровня 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, можно формулировать в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут включать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0670] Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения терапевтического средства в растворитель, такой как смесь с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза и т.п.

[0671] Композиции, используемые для введения *in vivo*, обычно стерильны. Стерильность легко может достигаться, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

[0672] Также представлены фармацевтические композиции для комбинированной терапии. Любые из дополнительных средств для комбинированной терапии, описанные в настоящей заявке, такие как средства, описанные в Разделе I.B, можно получить и вводить в виде одной или нескольких фармацевтических композиций, с сконструированными клетками, экспрессирующими BCMA-связывающие рекомбинантные рецепторы, описанные в настоящей заявке. Комбинированную терапию можно вводить в виде одной или нескольких фармацевтических композиций, например, когда клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, находятся в той же фармацевтической композиции, что и дополнительное средство, или в отдельных фармацевтических композициях. Например, в некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой дополнительную сконструированную клетку, например, клетку, сконструированную для экспрессии другого рекомбинантного рецептора, и вводимую в той же композиции или в отдельной композиции. В некоторых вариантах осуществления каждую из фармацевтических композиций получают в виде подходящий композиции в соответствии с конкретными клетками, например, сконструированными клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор, и/или дополнительным средством, и конкретной схемой введения и/или способом доставки.

V. Готовые изделия или наборы

[0673] Также представлены готовые изделия или наборы, содержащие представленные генетически сконструированные клетки (например, экспрессирующие BCMA-связывающий рекомбинантный рецептор), и/или композиции, включающие их и/или дополнительное терапевтическое средство (например, рекомбинантный IL-1Ra), например, для комбинированной терапии. Также представлены готовые изделия или наборы, содержащие представленные рекомбинантные рецепторы (*например, CAR*), генетически сконструированные клетки, и/или включающие их композиции. Готовые изделия могут включать контейнер и этикетку или инструкцию по применению на контейнере или относящуюся к нему. Подходящие контейнеры включают, например, бутыли, флаконы, шприцы, пробирки, пакеты с раствором для внутривенного введения и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. В некоторых вариантах осуществления контейнер имеет стерильное отверстие для доступа. Иллюстративные контейнеры включают пакеты для внутривенных растворов, флаконы, в том числе с пробками, прокалываемыми иглой для инъекций. Готовое изделие или набор могут дополнительно включать инструкцию по применению, указывающую, что

композиции можно использовать для лечения конкретного состояния, такого как состояние, описанное в настоящей заявке (*например*, множественная миелома). Альтернативно или дополнительно, готовое изделие или набор могут дополнительно включать другой или такой же контейнер, включающий фармацевтически приемлемый буфер. Он может дополнительно включать другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и/или шприцы.

[0674] На этикетке или инструкции по применению может быть указано, что композицию используют для лечения BCMA-экспрессирующего или BCMA-связанного заболевания, расстройства или состояния у индивидуума. Этикетка или вкладыш в упаковку, которые находятся на контейнере или относятся к нему, могут содержать инструкции по восстановлению и/или использованию препарата. На этикетке или инструкции по применению дополнительно может быть указано, что препарат полезен или предназначен для подкожного, внутривенного или других способов введения для лечения или профилактики BCMA-экспрессирующего или BCMA-связанного заболевания, расстройства или состояния у индивидуума.

[0675] Контейнер в некоторых вариантах осуществления содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики состояния. Готовое изделие или набор могут включать (a) первый контейнер с содержащейся в нем композицией (т.е. первое лекарственное средство), где композиция включает антитело (*например*, анти-BCMA антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент или рекомбинантный рецептор (*например*, CAR); и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией (т.е. второе лекарственное средство), где композиция включает дополнительное средство, например, для комбинированной терапии, такое как IL-1Ra (например, анакинра), цитотоксическое или другое терапевтическое средство, и при этом изделие или набор дополнительно включает инструкции на этикетке или листке-вкладыше для лечения субъекта вторым лекарственным средством в эффективном количестве.

VI. Определения

[0676] В контексте настоящей заявки термин “соответствующая форма” антитела означает, что при сравнении свойства или активности двух антител свойство сравнивается с использованием одной и той же формы антитела. Например, если указано, что антитело обладает большей активностью по сравнению с активностью соответствующей формы первого антитела, это означает, что конкретная форма, такая как scFv этого антитела, обладает большей активностью по сравнению с формой scFv первого антитела.

[0677] Термин “Fc область” в настоящей заявке используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Термин включает Fc области с нативной последовательностью и вариантные Fc области. В одном варианте осуществления Fc область тяжелой цепи IgG человека простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc области может присутствовать или отсутствовать.

Если в настоящей заявке не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc области или константной области соответствует системе нумерации EC, также называемой EC-индексом, как описано в Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

[0678] Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "полное антитело" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре нативного антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат Fc область, как определено в настоящей заявке.

[0679] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его природного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищено до более чем 95% или 99% чистоты, как определено, например, электрофоретическим (например, SDS-PAGE, изоэлектрическим фокусированием (IEF), капиллярным электрофорезом) или хроматографическим методом (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Обзор способов оценки чистоты антител см., например, в Flatman *et al.*, J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

[0680] "Выделенная" нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомной локализации, которая отличается от ее естественной хромосомной локализации.

[0681] "Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-BCMA антитело" относится к одной или нескольким молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела (или их фрагменты), включая такую молекулу(молекулы) нуклеиновых кислот в одном векторе или отдельных векторах, и такую молекулу(молекулы) нуклеиновых кислот, присутствующую в одной или более локализаций в клетке-хозяине.

[0682] Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичную трансформированную клетку и полученное из нее потомство независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот родительской клетке, но может содержать мутации. Мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, которые определены методом скрининга или селекции в исходно трансформированной клетке, включены в настоящую заявку.

[0683] Термины "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков и не ограничиваются минимальной длиной. Полипептиды, включая антитела и цепи антител и другие пептиды, *например*,

линкеры и BCMA-связывающие пептиды, могут включать аминокислотные остатки, включая природные и/или неприродные аминокислотные остатки. Термины также включают модификации полипептида после экспрессии, например, гликозилирование, сиалирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. В некоторых аспектах полипептиды могут содержать модификации по отношению к нативной или природной последовательности при условии, что белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, как результат сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, как результат мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок при ПЦР амплификации.

[0684] В контексте настоящей заявки “процент (%) идентичности аминокислотной последовательности” и “процент идентичности” и “идентичность последовательности” при использовании в отношении аминокислотной последовательности (эталонной полипептидной последовательности) определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (например, рассматриваемом антителе или фрагменте), которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0685] Аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющий интерес рекомбинантный рецептор, а продукты подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, на сохранение/улучшение связывания антигена или снижение иммуногенности.

[0686] Аминокислоты обычно можно сгруппировать в соответствии со следующими общими свойствами боковой цепи:

(1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислые: Asp, Glu;

(4) основные: His, Lys, Arg;

(5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;

(6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0687] Неконсервативные аминокислотные замены будут включать замену члена

одного из этих классов на другой класс.

[0688] Термин “вектор” в контексте настоящей заявки относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся нуклеиновокислотную структуру, 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 называют в настоящей заявке “векторами экспресси”.

[0689] Термин “инструкция по применению” используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждения относительно использования таких терапевтических продуктов.

[0690] При использовании в настоящей заявке формы единственного числа “a”, “an” и “the” включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Например, “a” или “an” означает “по меньшей мере один” или “один или несколько”. Понятно, что аспекты, варианты осуществления и вариации, описанные в настоящей заявке, включают “включающие”, “состоящие” и/или “по существу состоящие из” аспекты, варианты осуществления и вариации.

[0691] В различных разделах настоящего раскрытия различные аспекты заявленного объекта изобретения 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 объекта изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона. Например, когда представлен 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 изобретением. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, а также охвачены заявленным изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленное изобретение. Это применимо независимо от широты диапазона.

[0692] Термин “около” в контексте настоящей заявки относится к обычному диапазону погрешности для соответствующего значения, хорошо известному специалистам в данной области техники. Ссылка на “около” значения или параметра в настоящей заявке включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковой. Например, описание, относящееся к “около X” включает описание “X”.

[0693] В контексте настоящей заявки “композиция” относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, неводный раствор или любая их комбинация.

[0694] В контексте настоящей заявки 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 методом проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и детекции указанного антитела, при этом окрашивание выявляется методом проточной цитометрии при уровне окрашивания, существенно превышающем уровень окрашивания, обнаруженный при осуществлении той же процедуры с изотипически сходным контролем при прочих равных условиях, и/или на уровне, существенно схожим с уровнем для клеток, о которых известно, что они являются положительными в отношении маркера, и/или на уровне, существенно более высоком чем для клетки, которая, как известно, является отрицательной для маркера.

[0695] В контексте настоящей заявки утверждение о том, что клетка или популяция клеток является “отрицательной” в отношении определенного маркера относится к отсутствию по существу поддающегося обнаружению присутствия на или в клетке определенного маркера, обычно поверхностного маркера. Когда речь идет о поверхностном маркере, этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, выявляемой методом проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и детекции указанного антитела, при этом окрашивание не выявляется методом проточной цитометрии на уровне, значительно превышающем уровень окрашивания, обнаруженный при осуществлении той же процедуры с с изотипически сходным контролем при прочих равных 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 схожим с уровнем для клетки, которая, как известно, является отрицательной в отношении маркера.

[0696] Если не указано иное, все термины, используемые в области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящей заявке, 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 настоящей заявке для ясности и/или для удобства ссылки, и включение таких определений не обязательно должно толковаться как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимают в данной области техники.

VII. Иллюстративные варианты осуществления

[0697] Среди представленных вариантов осуществления:

1. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание

или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение субъекту дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных Т-клеток.

2. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra).

3. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) субъекту, который является кандидатом для клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA.

4. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение субъекту дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят до введения дозы сконструированных Т-клеток.

5. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra).

6. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение по меньшей мере одной дозы антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) субъекту, который является кандидатом для клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в

отношении BCMA.

7. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-6, где субъект получил по меньшей мере одну дозу IL-1Ra за или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

8. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-7, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra включает по меньшей мере две дозы IL-1Ra.

9. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

10. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения субъекту клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

11. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение субъекту клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом субъект получил по меньшей мере одну дозу антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и субъекту следует ввести по меньшей мере одну дозу IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток.

12. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает:

введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) за или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и

введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток.

13. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

14. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra, которую вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

15. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-14, где по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 21, 18, 15 или 12 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток.

16. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-15, где по меньшей мере одна доза IL-Ra, вводимая до введения дозы сконструированных Т-клеток, включает по меньшей мере две дозы IL-1Ra, вводимых до введения дозы сконструированных Т-клеток.

17. Способ в соответствии с вариантом осуществления 16, где одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra, вводимых до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 6, 5, 4, 3 или 2 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток.

18. Способ в соответствии с вариантом осуществления 16 или 17, где одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra, вводимых до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

19. Способ в соответствии с вариантами осуществления 16-18, где одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток и одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

20. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-8 и 15-19, дополнительно

включающий введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток.

21. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-20, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток.

22. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-21, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает 3, 4, 5, 6 или 7 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток.

23. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-22, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает 4 дозы сконструированных Т-клеток.

24. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-22, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает 5 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток.

25. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-24, где по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую после введения дозы сконструированных клеток, вводят ежедневно в течение нескольких дней подряд.

26. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-25, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, представляет собой 4 дозы, где одну из четырех доз вводят каждый день в течение 4 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток.

27. Способ в соответствии с вариантами осуществления 9-25, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, представляет собой 5 доз, вводимых ежедневно в течение 5 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток.

28. Способ в соответствии с вариантами осуществления 20-27, где дозу IL-1Ra вводят через каждые 24 часа (q24h) в Дни 2-5.

29. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере 6 доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, где клеточную терапию вводят в День 1 и:

(a) одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток, необязательно за ночь до введения дозы сконструированных Т-клеток;

(b) одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы

сконструированных Т-клеток в День 1;

(c) четыре дозы IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток, при этом одну дозу из четырех доз вводят каждый день в Дни 2, 3, 4 и 5.

30. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-29, дополнительно включающий введение по меньшей мере одной дополнительной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток, если субъект демонстрирует симптомы или признаки синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

31. Способ в соответствии с вариантом осуществления 30, где по меньшей мере одна дополнительная доза IL-1Ra включает введение множества доз, необязательно при этом множество доз вводят ежедневно в течение нескольких дней подряд, вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

32. Способ в соответствии с вариантом осуществления 31, где множество доз вводят два раза в день в течение нескольких дней подряд, вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

33. Способ в соответствии с вариантами осуществления 20-32, где, если субъект демонстрирует симптомы или признаки синдрома высвобождения цитокинов (CRS), дозу IL-1Ra вводят через каждые 12 часов (q12h) вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

34. Способ в соответствии с вариантами осуществления 30-33, где ежедневное введение IL-1Ra осуществляют в одно и тоже или примерно в одно и тоже время каждый день.

35. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-34, где IL-1Ra представляет собой рекомбинантный IL-1Ra.

36. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-35, где IL-1Ra включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:256, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокую идентичность последовательности с SEQ ID NO:256, которая сохраняет функцию антагониста IL-1R.

37. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-36, где IL-1Ra представляет собой анакинру.

38. Способ в соответствии с вариантом осуществления 37, где анакинра представляет собой рекомбинантную анакинру.

39. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-38, где каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 500 мг, на уровне или около 400 мг, на уровне или около 300 мг, на уровне или около 200 мг, на уровне или около 100 мг или на уровне или около 50 мг или в диапазоне, определяемом любыми из вышеуказанных, при этом необязательно каждая доза рекомбинантного IL-1Ra составляет от или от около 50 мг до или до около 200 мг.

40. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-39, где каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 100 мг.

41. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-40, где IL-1Ra вводят подкожно.

42. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-41, где способ уменьшает тяжесть, облегчает и/или предотвращает возникновение токсичности, связанной с введением клеточной терапии.

43. Способ в соответствии с вариантами осуществления 4-8 и 13-42, где токсичность представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS).

44. Способ в соответствии с вариантом осуществления 43, где CRS представляет собой тяжелый CRS или CRS 3 или более высокой степени.

45. Способ в соответствии с вариантами осуществления 4-8 и 13-42, где токсичность представляет собой нейротоксичность (NT).

46. Способ в соответствии с вариантом осуществления 45, где NT представляет собой тяжелую NT, или NT 2 или более высокой степени, или NT 3 или более высокой степени.

47. Способ в соответствии с вариантами осуществления 4-8 и 13-42, где токсичность представляет собой синдром активации макрофагов (MAS) или гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH).

48. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-47, где на момент или до введения дозы сконструированных Т-клеток субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из:

предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR, специфический в отношении BCMA;

предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и

предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

49. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение субъекту клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом на момент или до введения дозы сконструированных Т-клеток субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из:

предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR, специфический в отношении BCMA;

предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и

предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

50. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), при этом способ включает введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных

Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, который предварительно получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из:

предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR, специфический в отношении BCMA;

предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и

предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

51. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-50, где субъект имел рецидив после одной или нескольких предшествующих BCMA-направленных терапий или он был невосприимчив к одной или нескольким предшествующим BCMA-направленным терапиям.

52. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-51, где субъект имел рецидив после одной или нескольких предшествующих BCMA-направленных терапий или он был невосприимчив к одной или нескольким предшествующим BCMA-направленным терапиям за или примерно за 1 год до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

53. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-51, где субъект имел рецидив после одной или нескольких предшествующих BCMA-направленных терапий или он был невосприимчив к одной или нескольким предшествующим BCMA-направленным терапиям за или примерно за 6 месяцев до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

54. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-51, где субъект имел рецидив после одной или нескольких предшествующих BCMA-направленных терапий или он был невосприимчив к одной или нескольким предшествующим BCMA-направленным терапиям за или примерно за 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

55. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-54, где BCMA-направленный TCE представляет собой или включает биспецифическое антитело или биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE).

56. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-55, где BCMA-направленный TCE выбран из одного или нескольких из AMG 420/BI 836909, AMG 701, CC-93269, JNJ-64007957, PF-06863135 и REGN5458.

57. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-56, где BCMA-направленный ADC выбран из одного или нескольких из Белантамаба мафодотина (GSK2857916), MEDI2228, CC-99712 и AMG 224.

58. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-57, где первый CAR включает:

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую

комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116, и вариабельную область легкой цепи(V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 119;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 105, 107 и 108, соответственно;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 104, 106 и 108, соответственно; или

V_H, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, и V_L, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119;

(b) спейсер, включающий химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, который необязательно имеет длину около 228 аминокислот; или спейсер, представленный в SEQ ID NO: 174;

(c) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен из человеческого CD28; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток или его сигнальную часть.

59. Способ в соответствии с вариантом осуществления 58, где V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119.

60. Способ варианта в соответствии с вариантом осуществления 58 или 59, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает scFv.

61. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-60, где V_H и V_L

соединены гибким линкером, при этом необязательно гибкий линкер включает аминокислотную последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:1).

62. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-61, где V_H является карбокси-концевым по отношению к V_L.

63. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-62, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114.

64. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-63, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

65. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-64, где нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает (a) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:113; (b) последовательность нуклеотидов, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с вышеуказанной последовательностью; или (c) вырожденную последовательность (a) или (b).

66. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-65, где нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:115.

67. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-66, где трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен из человеческого CD28.

68. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-67, где трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138.

69. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-57, где первый CAR включает внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 125, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 127; и/или

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 260, 261 и 262, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 257, 258 и 259, соответственно.

70. Способ в соответствии с вариантом осуществления 69, где V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

71. Способ в соответствии с вариантом осуществления 69 или вариантом осуществления 70, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128.

72. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-71, где цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143.

73. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-72, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS или его сигнальную часть.

74. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-73, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

75. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-74, где костимулирующая сигнальная область представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4.

76. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-75, где костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CD3-зета (CD3ζ) цепи.

77. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-76, где первый CAR включает от своего N до C-конца по порядку: внеклеточный антигенсвязывающий домен, спейсер, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область.

78. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-77, где первый CAR включает

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность

область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 119;

(b) спейсер, включающий модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, который имеет длину около 228 аминокислот;

(c) трансмембранный домен из человеческого CD28; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB.

79. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-78, где первый CAR включает

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 114, или последовательность аминокислот, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114;

(b) спейсер, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:174;

(c) трансмембранный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4.

80. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-79, где первый CAR включает

(a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 114;

(b) спейсер, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 174;

(c) трансмембранный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:138; и

(d) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен, включающий последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, и костимулирующую сигнальную область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:4.

81. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-80, где первый CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:19.

82. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-81, где первый CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с вышеуказанной последовательностью.

83. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-68 и 72-82, где первый CAR кодируется полинуклеотидной последовательностью, включающей последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

84. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-57 и 69-77, где первый CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:312.

85. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-84, где первый CAR и второй CAR связываются с одним и тем же эпитопом BCMA.

86. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-84, где первый CAR и второй CAR связываются с разными эпитопами BCMA.

87. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-86, где первый CAR и второй CAR являются разными.

88. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-87, где второй CAR включает:

V_H область, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:260, 261 и 262, соответственно; и V_L область, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотную последовательность SEQ ID NO:257, 258 и 259, соответственно;

V_H область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:125, и V_L область, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO:127;

аминокислотные остатки 22-493 последовательности, представленной в SEQ ID NO:263; и/или

последовательность, кодируемую SEQ ID NO:264.

89. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-88, где второй CAR представляет собой мультивалентный CAR.

90. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-89, где второй CAR включает аминокислотные остатки, начиная с остатка 22 до конца последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 265-302.

91. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-89, где второй CAR включает центирин-содержащий CAR.

92. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-91, где второй CAR включает аминокислотные остатки 22-334 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 310.

93. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-85, где первый CAR и второй CAR являются одинаковыми.

94. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-93, где доза

сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, получена из образца, включающего Т-клетки, полученные от того же субъекта, который ранее получил предшествующую дозу сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR.

95. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-94, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR получена из образца, включающего Т-клетки, полученные от субъекта после того, как субъект уже получил предшествующую дозу сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR.

96. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-95, где до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, способ дополнительно включает оценку, в образце для анализа, полученном от субъекта, присутствия или количества (i) клеток, экспрессирующих второй CAR, или (ii) нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR.

97. Способ в соответствии с вариантами осуществления 94-96, где образец для анализа получают от субъекта одновременно с получением образца, включающего Т-клетки для получения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, от того же субъекта.

98. Способ в соответствии с вариантами осуществления 48-97, где до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, способ дополнительно включает оценку присутствия или количества (i) клеток, экспрессирующих второй CAR, или (ii) нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR, в композиции, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

99. Способ в соответствии с вариантами осуществления 96-98, где определение присутствия или количества клеток, экспрессирующих второй CAR, осуществляют путем контактирования образца или композиции, включающей дозу сконструированных Т-клеток, с очищенным или рекомбинантным BCMA, необязательно BCMA-Fc.

100. Способ в соответствии с вариантами осуществления 96-98, где определение присутствия или количества нуклеотидной последовательности, присутствующей в конструкции, кодирующей второй CAR, осуществляют методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

101. Способ в соответствии с вариантами осуществления 58-100, где связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена и/или первого CAR, или показатель, указывающий на функцию или активность первого CAR после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется или по существу не снижается или не блокируется в присутстви растворимой или выделенной формы BCMA.

102. Способ варианта осуществления 101, где концентрация или количество растворимой или выделенной формы BCMA соответствуют концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке или крови или плазме субъекта или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов с множественной

миеломой, или при концентрации или количестве растворимого или выделенного BCMA, при которых связывание или показатель снижается или блокируется, или по существу снижается или блокируется, для клеток, экспрессирующих эталонный анти-BCMA рекомбинантный рецептор, необязательно эталонный анти-BCMA CAR, в том же анализе.

103. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-102, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает от или от около 1×10^7 CAR+ Т-клеток до или до около 2×10^9 CAR+ Т-клеток.

104. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-103, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает от или от около 1×10^7 CAR+ Т-клеток до или до около 1×10^9 CAR+ Т-клеток.

105. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-104, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает от или от около 1×10^8 CAR+ Т-клеток до или до около 8×10^8 CAR+ Т-клеток.

106. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-104, где доза сконструированных Т-клеток находится на уровне или около 5×10^7 клеток или CAR+ Т-клеток.

107. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-105, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, находится на уровне или около $1{,}5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток.

108. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-105, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, находится на уровне или около 3×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток.

109. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-105, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, находится на уровне или около $4{,}5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток.

110. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-105, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, находится на уровне или около $5{,}5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток.

111. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-105, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, находится на уровне или около 6×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток.

112. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-111, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает комбинацию $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток.

113. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-112, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает комбинацию $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток.

114. Способ варианта осуществления 112 или 113, где соотношение $CD4^+$ CAR+ Т-клеток к $CD8^+$ CAR+ Т-клеткам и/или $CD4^+$ Т-клеток к $CD8^+$ Т-клеткам составляет или приблизительно составляет 1:1, или составляет от или приблизительно от 1:3 до или

приблизительно до 3:1.

115. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-114, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает $CD3^+$ CAR+ Т-клетки.

116. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-115, где менее чем или около 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% CAR+ Т-клеток в дозе сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, экспрессируют маркер апоптоза, необязательно аннексин V или активную каспазу 3.

117. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-116, где до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, субъект получил лимфодеплеционную терапию, включающую введение флударабина при или около 20-40 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно при или около 30 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней, и/или циклофосфамида при или около 200-400 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно при или около 300 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней.

118. Способ варианта осуществления 117, где лимфодеплеционная терапия включает введение флударабина при или около 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, ежедневно, и циклофосфамида при или около 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, ежедневно в течение 3 дней.

119. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-118, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или расстройство.

120. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-119, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA, представляет собой рак, необязательно BCMA-экспрессирующий рак.

121. Способ варианта осуществления 120, где рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

122. Способ варианта осуществления 120 или 121, где рак представляет собой лимфому, лейкоз или злокачественное новообразование из плазматических клеток.

123. Способ в соответствии с вариантами осуществления 120-122, где рак представляет собой лимфому, и лимфома представляет собой лимфому Беркита, неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому Ходжкина, макроглобулинемию Вальденстрема, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфому с нерассеченными ядрами, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому маргинальной зоны, лимфому селезенки, узловую моноцитоидную В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, крупноклеточную лимфому, диффузную смешанно-клеточную лимфому, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому (LPL) или лимфому из клеток мантийной зоны (MCL).

124. Способ в соответствии с вариантами осуществления 120-122, где рак представляет собой лейкоз, и лейкоз представляет собой хронический лимфоцитарный

лейкоз (CLL), лейкоз плазматических клеток или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

125. Способ в соответствии с вариантами осуществления 120-122, где рак представляет собой злокачественное новообразование из плазматических клеток, и злокачественное новообразование из плазматических клеток представляет собой множественную миелому (MM) или плазмоцитому.

126. Способ в соответствии с вариантами осуществления 120-122 и 125, где рак представляет собой множественную миелому (MM), необязательно рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому (R/R MM).

127. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-126, где субъект получил три или более предшествующих терапий для лечения заболевания или расстройства, необязательно четыре или более предшествующих терапий, необязательно, выбранных из:

аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT);

иммуномодулирующего средства;

ингибитора протеасом; и

анти-CD38 антитела.

128. Способ в соответствии с вариантом осуществления 127, где иммуномодулирующее средство выбрано из талидомида, леналидомида и помалидомида.

129. Способ в соответствии с вариантом осуществления 127 или 128, где ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба.

130. Способ в соответствии с вариантами осуществления 127-129, где анти-CD38 антитело представляет собой или включает даратумумаб.

131. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-130, где субъект получил от 3 до 15 или от 4 до 15 предшествующих терапий, или около 10 предшествующих терапий.

132. Способ в соответствии с вариантами осуществления 127-131, где субъект имел рецидив после или оказался невосприимчивым к одной или более из 3 или более предшествующих терапий.

133. Способ в соответствии с вариантами осуществления 127-132, где субъект имел рецидив после или оказался невосприимчивым к по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 из 3 или более предшествующих терапий.

134. Способ в соответствии с вариантом осуществления 132 или 133, где субъект был невосприимчив или не отвечал на бортезомиб, карфилзомиб, леналидомид, помалидомид и/или анти-CD38 моноклональное антитело.

135. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-134, где субъект имел предшествующую аутологичную трансплантацию стволовых клеток.

136. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-134, где субъект не имел предшествующей аутологичной трансплантации стволовых клеток.

137. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-136, где у субъекта нет активного или в анамнезе лейкоза плазматических клеток (PCL).

138. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-137, где у субъекта развился вторичный лейкоз плазматических клеток (PCL).

139. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-138, где субъект представляет собой взрослого субъекта или субъекта возраста 25 или 35 лет или старше.

140. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-139, где после диагностирования заболевания или расстройства у субъекта прошло приблизительно 4 года, или от 2 до 15 лет, или от 2 до 12 лет.

141. Способ в соответствии с вариантами осуществления 1-140, где субъект имеет высокий цитогенетический риск согласно IMWG.

VIII. ПРИМЕРЫ

[0698] Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Создание нуклеиновокислотных конструкций и химерных антигенных рецепторов (CAR), связывающихся с BCMA

[0699] Были созданы полинуклеотиды, кодирующие иллюстративные химерные антигенные рецепторы (CAR), каждый из которых содержит анти-BCMA scFv антигенсвязывающий домен человека. Среди полученных CAR были CAR, содержащие scFv, содержащие последовательности V_H и V_L, описанные в WO2016090320, WO2016090327 и WO2019090003. В некоторых случаях scFv, V_H была аминоконцевой по отношению к V_L, а в некоторых случаях V_L была аминоконцевой по отношению к V_H. Иллюстративные scFv области в созданных CAR представлены в Таблице E1.

Таблица E1

Идентификатор последовательности (SEQ ID NO) для иллюстративных scFv

Антигенсвязывающий домен	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V_H	V_L	scFv
BCMA-23	34	35	36	22	23	24	32	33	29
BCMA-25	37	38	39	40	41	42	52	53	49
BCMA-26	34	35	54	55	56	57	61	62	58
BCMA-52	66	70	72	74	76	77	85	88	83
BCMA-55	97	101	103	105	107	108	116	119	114

[0700] Эпитопы, распознаваемые, специфически связываемые иллюстративными анти-BCMA scFv клонами, определяли на основе картирования полного прерывистого эпитопа методом химического связывания пептидов на каркасах (CLIPS; Pepscan Presto BV, Lelystad, The Netherlands; см., например, Timmerman et al., (2007) J. Mol. Recognit. 20: 283-329). Было обнаружено, что BCMA-23 и BCMA-25 scFv связываются с пептидом SNTPPLTCQR (представленным в SEQ ID NO:160), который может быть распознан в линейной форме. В некоторых аспектах такие антитела распознают нелинейный или линейный эпитоп, включающий остатки такого пептида SEQ ID NO: 160, и в некоторых аспектах распознают нелинейный эпитоп, дополнительно включающий остатки CIPCQLR (представленный в SEQ ID NO:159), SNTPPLTCQR и/или SVTNSVK (представленный в SEQ ID NO:161). Было обнаружено, что BCMA-26 scFv распознает эпитоп, включающий остатки, присутствующие в CSQNEYF (представленный в SEQ ID NO:162) и LLHACIPCQLR (представленный в SEQ ID NO:158). Было обнаружено, что BCMA-52-scFv-mFc связывается с эпитопом, содержащим остатки следующих прерывистых пептидов: QNEYF (SEQ ID NO:91), CIPCQL (SEQ ID NO:92) и CQRYC (SEQ ID NO:93). Было обнаружено, что BCMA-55-scFv специфически связывается с эпитопом, содержащим остатки, присутствующие в пептидах, включающих прерывистые части полипептидной последовательности BCMA человека, каждый из которых включает следующие последовательности: MLMAG (SEQ ID NO:122), YFDSLL (SEQ ID NO:123) и QLRCSSNTPPL (SEQ ID NO:124).

[0701] Иллюстративные полинуклеотидные конструкции CAR содержали нуклеиновые кислоты, кодирующие сигнальную последовательность IgG-каппа человека (SEQ ID NO: 167, кодирующая SEQ ID NO: 166); анти-BCMA scFv человека, указанный выше; спейсер (такой, как спейсер, содержащий модифицированный IgG4-шарнир C_H2-C_H3 (SEQ ID NO:175, кодирующая SEQ ID NO:174); также называемый “длинный спейсер” или LS); трансмембранный домен CD28 человека; внутриклеточную ко-сигнальную последовательность, полученную из 4-1BB человека; и внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3-зета человека.

[0702] Нуклеотидные последовательности, кодирующе различные BCMA CAR, оценивали на потенциальные сайты сплайсинга и модифицировали консервативным образом, включая удаление потенциальных предполагаемых криптических донорных и акцепторных сайтов сплайсинга.

[0703] Клоны кДНК, кодирующие такие CAR, были связаны с нижележащим элементом проскока рибосомы (таким как T2A-кодирующая последовательность SEQ ID NO: 244 или 245, кодирующая SEQ ID NO: 243), за которым следовала укороченная последовательность, кодирующая рецептор, и клонированы в лентивирусный вектор экспрессии.

Пример 2: Введение анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (MM)

[0704] Композиции Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор

(CAR), содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR, специфический в отношении В-клеточного антигена созревания (BCMA), вводили людям с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой (ММ).

А. Субъекты и лечение

[0705] Композиции, содержащие аутологичные Т-клетки, сконструированные для экспрессии иллюстративного CAR, специфического в отношении BCMA, описанного в Примере 1 выше, вводили взрослым людям с рецидивирующей или рефрактерной (R/R) множественной миеломой (ММ), которые ранее получали 3 или более предшествующих лечения (3 или более предшествующих лечения, включающих по меньшей мере ингибитор протеасом, иммуномодулирующее средство и анти-CD38 моноклональное антитело, в каждом случае, кроме случаев, когда субъект не являлся кандидатом на получение такого лечения, например, из-за того, что оно противопоказано).

[0706] Вводимые композиции Т-клеток были созданы способом, включающим обогащение на основе иммуноаффинности CD4+ и CD8+ клеточных популяций из образцов лейкафереза от отдельных субъектов с ММ, объединение клеток таких популяций, например, в соотношении 1:1 или приблизительно в соотношении 1:1, и осуществление стадий обработки объединенных клеток, в том числе для стимуляции, клеточной трансдукции и размножения, в иллюстративной бессывороточной среде, криоконсервацию и получение клеток с определенным диапазоном соотношений CD4+ к CD8+ CAR Т-клеткам. В результате была получена клеточная композиция, которая, как было замечено, была обогащена фенотипом клеток центральной памяти по сравнению с исходными образцами и клеточными композициями, полученными с использованием другого способа изготовления. CAR содержал связывающий домен scFv, полученный из BCMA-55, модифицированный IgG-происходящий C_H2-C_H3-шарнирный спейсер, трансмембранный домен CD28 и внутриклеточную сигнальную область, включающую, по порядку, эндодомен 4-1BB и эндодомен CD3зета, как описано в Примере 1.

[0707] За два-семь дней до инфузии CAR+ Т-клеток субъекты получали лимфодеплеционную химиотерапию (LDC) флударабином (flu, 30 мг/м^2/день) и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м^2/день) в течение 3 дней, LDC завершали по меньшей мере за 48 часов до инфузии CAR+ Т-клеток. Криоконсервированные клеточные композиции размораживали у постели больного перед внутривенным введением, при этом день инфузии обозначали как день 1. В день 1 субъектам вводили дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток следующим образом: в разовой дозе уровня дозы 1 (DL1), содержащей общее количество 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, или в разовой дозе уровня дозы 2 (DL2), содержащей общее количество $1{,}5\times10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток.

[0708] В определенный момент времени анализа 19 взрослых субъектов были включены в продолжающееся клиническое исследование, включающее такую терапию. Из этих 19 субъектов в этот конкретный момент времени 13 субъектам вводили анти-BCMA CAR+ клетки, каждому либо при DL1, либо при DL2. Из этих 13 субъектов в этот конкретный момент времени в продолжающемся исследовании 8 субъектов подлежали

оценке признаков, указывающих на безопасность (оценка основана на последующем наблюдении в течение ≥ 1 месяца) (n=5 DL1; n=3 DL2). Один субъект не смог получить CAR+ Т-клетки из-за сепсиса после LDC, что привело к смерти до введения CAR+ Т-клеток. Три субъекта (все DL1) подлежали оценке в этот момент времени на подтвержденный ответ (оценка основана на последующем наблюдении в течение ≥ 2 месяцев) в соответствии с едиными критериями ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) (Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346).

[0709] Для этих 8 субъектов, обследованных в этот момент времени, средний период наблюдения составил 5 недель (диапазон 4-13 недель). Средний возраст был 53 года (диапазон 36-66 лет) со средним временем с момента постановки диагноза 4 года (диапазон 2-12 лет). Субъекты получали в среднем 10 предшествующих схем лечения ММ (диапазон 4-15 предшествующих схем). Из 8 пациентов 4 (50%) были невосприимчивы (отсутствие ответа или прогрессирование в течение 60 дней после последней терапии) к бортезомибу, карфилзомибу, леналидомиду, помалидомиду и анти-CD38 моноклональному антителу. Семь из 8 субъектов (88%) ранее получили аутологичную трансплантацию стволовых клеток, и 4 из 8 (50%) имели высокий цитогенетический риск IMWG.

[0710] На момент оценки в текущем исследовании не наблюдали дозолимитирующей токсичности (DLT) у субъектов, получающих DL1 или DL2. Синдром высвобождения цитокинов (CRS), все степени 1 или 2, наблюдали у 6 из 8 (75%) субъектов в этот момент времени. Медиана до начала CRS на этот момент времени среди 8 субъектов составила 9 дней (диапазон 4-10 дней) со средней продолжительностью 4,5 дня (диапазон 2-19 дней). Ни один из субъектов с CRS 2 степени на этот момент времени не нуждался в вазопрессорной поддержке, и только 1 субъект получал тоцилизумаб. Ни у одного из испытуемых не был выявлен CRS 3 степени или выше. Трое из 8 (38%) субъектов испытали неврологические неблагоприятные события (AE). У двух из восьми испытуемых на этот момент времени наблюдали события 1 степении, и 1 продемонстрировал событие 3 степени (летаргия), которые нормализовались в течение 24 часов после приема стероидов. Период начала развития неврологических AE составил 9, 11 и 12 дней с продолжительностью 2, 3 и 1 день, соответственно, у 3 субъектов, испытавших неврологические AE. У субъекта, который испытал нейротоксичность 3 степени (NT) на момент анализа в этот момент времени, развился вторичный лейкоз плазматических клеток (PCL) непосредственно перед получением LDC.

[0711] У всех 8 субъектов на этот момент времени наблюдали признаки объективного ответа, включая субъекта с вторичным PCL. Было замечено, что у трех субъектов, которым вводили DL1, был достигнут подтвержденный ответ (у 1 частичный ответ, PR; у 2 строгий полный ответ, sCR), тогда как у остальных субъектов отсутствовало подтверждение (у 1 полный ответ, CR; у 2 очень хороший частичный ответ, VGPR; у 1 PR, у 1 минимальный ответ, MR). На момент оценки ни у одного субъекта не наблюдали прогрессирования.

[0712] Результаты показали, что при оцененных уровнях доз введение анти-BCMA

CAR клеточной терапии продемонстрировало благоприятные профили безопасности, при этом в текущем клиническом исследовании не не было зарегистрировано никаких DLT. Результаты согласовывались с выводом о том, что в этот момент времени частота NT степени 3 или выше была низкой, и не наблюдали никаких CRS 3 степени или выше с клиническим ответом.

Пример 3: Дальнейшая оценка ответа и безопасности после введения анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (MM)

[0713] Ответы и безопасность оценивали у субъектов в последующие моменты времени в клиническом исследовании, описанном в Примере 2, при этом некоторые дополнительные субъекты получали разные дозы клеток.

A. Субъекты и лечение

[0714] Анализ в моменты времени, представленные в этом примере, основан на оценке в общей сложности 44 субъектов, которым вводили анти-BCMA CAR-экспрессирующие клетки. 44 субъекта были взрослыми людьми с рецидивирующей или рефрактерной (R/R) множественной миеломой (MM), которые ранее получали 3 или более предшествующих лечения, которые не дали эффекта (3 или более предшествующих лечения, включая по меньшей мере (1) аутологичную трансплантацию стволовых клеток, (2) ингибитор протеасом и иммуномодулирующее средство, либо отдельно, либо в комбинации, и (3) анти-CD38 моноклональное антитело, как часть комбинированной терапии или монотерапи, в каждом случае, кроме случаев, когда субъект не являлся кандидатом на получение такого лечения, например, из-за того, что оно противопоказано). Среди субъектов, получавших лечение, были субъекты, у которых последняя линия терапии оказалась неэффективной и которые имели баллы по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) от 0 до 1. Субъекты не были отобраны на основе уровня экспрессии BCMA в образце от субъекта.

[0715] В день 1 субъектам вводили дозу CAR+ Т-клеток следующим образом: в разовой дозе уровня дозы 1 (DL1), содержащей общее количество 5×10^7 CAR+ Т-клеток, в разовой дозе уровня дозы 2 (DL2), содержащей общее количество $1,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток, в разовой дозе уровня дозы 2A (DL2A), содержащей общее количество $3,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток, или в разовой дозе уровня дозы 3 (DL3), содержащей общее количество $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток. В день 15 после введения осуществляли исследование костного мозга, а заболевание оценивали на 29-й день после введения.

[0716] Субъектов контролировали с течением времени на ответ, включая объективную частоту ответа (ORR), полный ответ (CR), строгий полный ответ (sCR), частичный ответ (PR), очень хороший частичный ответ (VGPR), минимальное остаточное заболевание (MRD), прогрессирующее заболевание (PD), стабильное заболевание (SD) и минимальный ответ (MR) (например, в соответствии с едиными критериями ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG); Kumar et al. (2016) Lancet Oncol 17(8):e328-346), и развитие любых неблагоприятных событий, таких как серьезные

неблагоприятные события (SAE). Минимальное остаточное заболевание (MRD) оценивали методом секвенирования следующего поколения (NGS) у субъектов, у которых преобладающий клонотип был идентифицирован при скрининговой оценке.

[0717] Экспансию и длительную персистенцию анти-BCMA CAR$^+$ Т-клеток в периферической крови субъектов в когортах DL1, DL2 и DL3 оценивали в дни 1, 5, 8, 11, 15, 22, 29, 60 и 90 после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток путем количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) препаратов геномной ДНК, полученных из образцов цельной крови от субъектов, с использованием праймеров, специфических в отношении вектора, кодирующего анти-BCMA CAR (копии вектора/мкг геномной ДНК). Уровни растворимого BCMA (sBCMA) в образцах сыворотки субъектов также измеряли до введения CAR+ Т-клеток и в различные моменты времени после введения CAR+ Т-клеток.

[0718] Демографические и исходные характеристики всех субъектов когорт DL1, DL2 и DL3 на этот момент времени представлены в Таблице E2. У субъектов обычно была высокорефрактерная миелома, при этом 77% субъектов имели высокий цитогенетический риск. Более чем у 50% субъектов, получавших промежуточную терапию, наблюдали прогрессирование заболевания до введения анти-BCMA CAR+ Т-клеток. Также было показано, что субъекты, как правило, имели высокую опухолевую нагрузку до введения CAR+ Т-клеток, на что указывали уровни М-белка в сыворотке и моче, уровни свободных легких цепей (FLC) в сыворотке и наличие плазматических клеток в костном мозге и экстрамедуллярные плазмоцитомы.

Таблица E2

Демографические данные и исходные характеристики субъектов

		Доза CAR+ Т-клеток		
Характеристика	Общее количество (N=44)	DL 1 50×10^6 (N=14)	DL 2 150×10^6 (N=28)	DL 3 450×10^6 (N=2)
Медиана (диапазон) возраста, годы	62 (36–79)	56 (36–70)	63 (42–79)	67 (64–69)
Мужчины, n (%)	25 (57)	9 (64)	15 (54)	1 (50)
Высокий цитогенетический риск, n (%)[a]	34 (77)	11 (79)	22 (79)	1 (50)
Оценка общего состояния по шкале ECOG 0 или 1, n (%)	43 (98)	14 (100)	27 (96)	2 (100)
Медиана (диапазон) времени с момента установления диагноза, годы	6 (2–17)	6 (2–15)	5 (2–17)	6 (5–7)
III стадия по ISS, n (%)	11 (25)	1(7)	9 (32)	1 (50)
Измеряемое повышение уровня М-белка в сыворотке, n (%)	24 (55)	4 (29)	19 (68)	1 (50)
Измеряемое повышение уровня М-белка в моче, n (%)	23 (55)	8 (62)	14 (52)	1 (50)
Измеряемый только по sFLC, n (%)	8 (18)	4 (29)	3 (11)	1 (50)
Плазматические клетки в BM до LDC, медиана (диапазон) %	40 (0–100)	50 (3–100)	35 (0–95)	31 (12–50)
EMP, n (%)	13 (30)	5 (36)	8 (29)	0
Получали переходную химиотерапию, n	34 (77)	9 (64)	23 (82)	2 (100)

(%)				
Прогрессирование при переходной химиотерапии, n (%)	19 (56)	5 (56)	12 (52)	2 (100)

BM-костный мозг; ECOG-Восточная объединенная онкологическая группа; EMP-экстрамедуллярная плазмоцитома; ISS-Международная система стадирования; sFLC-свободные легкие цепи в сыворотке.

[a]Высокий цитогенетический риск основан на локальном тестировании и включает: del(17p), t(4; 14), t(14; 16), 1q21 amp.

[0719] История лечения для всех субъектов когорты DL1, DL2 и DL3 на данный момент времени представлена в Таблице E3.

Таблица E3

История лечения, характеристики субъектов

		Доза CAR+ T-клеток		
	Общее количество (n=44)	DL1 50×10^6 (n=14)	DL2 150×10^6 (n=28)	DL3 450×10^6 (n=2)
Медиана (диапазон) предшествующих схем лечения	7 (3-23)	8 (4-23)	7 (3-14)	7 (7-7)
Предшествующая аутологичная SCT, n (%)				
1	30 (68)	10 (71)	19 (68)	1 (50)
> 1	12 (27)	4 (29)	7 (25)	1 (50)
Кумулятивное воздействие, n (%)				
Предшествующие PI, IMiD и анти-CD38 средство	44 (100)	14 (100)	28 (100)	2 (100)
Предшествующие 2 PI, 2 IMiD и анти-CD38 средство	38 (86)	12 (86)	24 (86)	2 (100)

SCT-трансплантация стволовых клеток; ImiD-иммуномодулирующее лекарственное средство; PI-ингибитор протеасом

B. Оценки ответа и безопасности после лечения

[0720] В Таблице E4 представлено общее количество серьезных неблагоприятных событий (SAE), которые возникали в когортах DL1, DL2 и DL3.

Таблица E4

Оценка безопасности после введения клеток CAR+

		Доза CAR+ T-клеток		
	Общее количество (n=44)	DL1 50×10^6 (n=14)	DL2 150×10^6 (n=28)	DL3 450×10^6 (n=2)
Любое SAE, n (%)	12 (27)	1 (7)	9 (32)	2 (100)
AE представляющей особый интерес степени ≥ 3/4, n (%)				
Нейтропения	38 (86)	11 (79)	25 (89)	2 (100)
Анемия	22 (50)	6 (43)	15 (54)	1 (50)
Тромбоцитопения	19 (43)	4 (29)	13 (46)	2 (100)

Фебрильная нейтропения	8 (18)	1 (7)	6 (21)	1 (50)
Инфекции[a]	6 (14)	0	4 (14)	2 (100)
CRS	4 (9)	1 (7)	2 (7)	1 (50)
Неврологические явления[b]	3 (7)	0	2 (7)	1 (50)
TLS	1 (2)	0	1 (4)	0
DLT, n	1	0	0	1

CRS-синдром высвобождения цитокинов; DLT-дозоограничивающая токсичность; SAE-серьезные неблагоприятные события; AESI-неблагоприятные события, представляющие особый интерес.

[a] Пневмония, аппендицит, кампилобактериоз, флегмона, сепсис.

[b]Спутанность сознания, возбуждение, арефлексия, летаргия, угнетенное состояние сознания.

[0721] CRS, DLT степени 4, возник у субъекта в когорте DL3, у которого в анамнезе было хроническое заболевание почек, связанное с миеломой, с неврологическим эпизодом спутанности сознания, а также отсутствием глоточного рефлекса, острым повреждением почек и сепсисом, вызванным нозокомиальной инфекцией *Klebsiella pneumonia*, и он умер в день 19 после введения CAR+ Т-клеток.

[0722] Таблица E5 показывает оценку безопасности для всех когорт DL1, DL2 и DL3 в отношении CRS и неврологических событий. Неврологические события, как правило, были связаны с CRS. CRS 1 или 2 степени наблюдали у 71% от общего числа субъектов, в то время как CRS 3 степени или выше наблюдали только у 9% от общего числа субъектов. Один субъект испытал неврологическое событие арефлексии 4 степени. Одному субъекту, у которого было событие CRS, потребовалась высокая доза вазопрессора.

Таблица E5

Синдром высвобождения цитокинов и неврологические явления

		Доза CAR+ Т-клеток		
	Общее количество (n=44)	DL1 50×10^6 (n=14)	DL2 150×10^6 (n=28)	DL3 450×10^6 (n=2)

Синдром высвобождения цитокинов, n (%)	35 (80)	11 (79)	22 (79)	2 (100)
Среднее время до начала проявления, дни (диапазон)	3 (1–10)	7 (3–10)	3 (1–10)	1
Средняя продолжительность, дни (диапазон)	5 (1–19)	3 (2–16)	5 (1–19)	8
Неврологические явления, n (%)	11 (25)	1 (7)	8 (29)	2 (100)
Среднее время до начала проявления, дни (диапазон)	3 (1–12)	11	3 (1–12)	3 (2–3)
Средняя продолжительность, дни (диапазон)	6 (1–58)	3	9 (1–58)	6
Лечение CRS и неврологических явлений, n (%)				
Тоцилизумаб	15 (34)	3 (21)	10 (36)	2 (100)
Силтуксимаб	3 (7)	0	2 (7)	1 (50)
Анакинра	2 (5)	0	1 (4)	1 (50)
Стероиды	9 (20)	1 (7)	6 (21)	2 (100)
Тоцилизумаб и Стероиды	8 (18)	1 (7)	5 (18)	2 (100)
Поступившие в отделение интенсивной терапии, n (%)	3 (7)	0	1 (4)	2 (100)

CRS-Синдром высвобождения цитокинов.

[0723] Что касается продолжительной цитопении, например, как определено на основании лабораторной оценки, анемия 3 или 4 степени и тромбоцитопения до начала лимфодеплетирующей химиотерапии возникали у 18% субъектов. Цитопению 3 или 4 степени продолжительностью более 29 дней наблюдали у 28/42 пациентов (67%). Цитопения нормализовалась до степени $\leq$ 2 к 3 месяцу у 17/24 пациентов (71%), при последующем наблюдении в течение 3 месяцев. Среднее время до нормализации, где в некоторых случаях выздоровление определяли как степень 2 или ниже без трансфузии в течение 1 недели после лабораторной оценки или без поддержки фактором роста в течение 1 недели после лабораторной оценки (2 недели для пегфилграстима), составляло 2,1 месяца для нейтропении, 2,2 месяца для анемии и 3,4 месяца для тромбоцитопении.

[0724] Объективная частота ответов (ORR) на основе наилучшего общего ответа среди всех когорт DL1, DL2 и DL3 показана на Фиг. 1. У всех субъектов наблюдали ORR 82%, при этом у 48% субъектов ответ был лучше, чем VGPR. Показатель полного ответа (CR) 43% наблюдали при самом низком уровне дозы 5×10^7 общего количества CAR-экспрессирующих Т-клеток (DL1). Эффективность у одного субъекта в когорте DL3 не подлежала оценке из-за отсутствия оценки ответа после исходного уровня на 29-й день. В таблице E6 представлены результаты оценки минимального остаточного заболевания (MRD) методом секвенирования следующего поколения (NGS) у 21 субъекта, у которых оценка MRD была возможна.

Таблица E6

Оценка MRD методом NGS

	День 29/Месяц 2 (n=21)	Месяц 3 (n=4)
MRD отрицательные ($\leq 10^{-5}$) субъекты, n (%)	9 (43)	3 (75)

[0725] Оценка ответа с течением времени у субъектов в когортах DL1 при самом длительном периоде наблюдения после введения CAR-экспрессирующих Т-клеток (n=14) показана на Фиг. 2. В целом, наблюдали, что ответ продолжал улучшаться с течением времени, при этом у пяти (5) из 14 субъектов (36%) наблюдали углубление ответа после дня 29. Шесть (6) из девяти (9) субъектов, оцениваемых на MRD, были MRD отрицательными (как определено методом NGS) на день 29, при этом у одного субъекта оценка MRD была через 2 месяца.

C. Персистенция

[0726] Экспансия и длительная персистенция CAR+ Т-клеток в периферической крови субъектов в когортах DL1, DL2 и DL3 показаны в Фиг. 3. Результаты согласовывались с сильной экспансией CAR+ Т-клеток, наблюдаемой при всех уровнях доз (DL1, DL2 и DL3). В целом, повышенную персистенцию в течение 2 месяцев наблюдали у субъектов, которым вводили дозу $\geq 150\times10^6$ общего количества CAR-экспрессирующих Т-клеток (DL2 и DL3).

D. Растворимый BCMA

[0727] Уровень растворимого BCMA (sBCMA) (нг/мл) в сыворотках субъектов до введения CAR+ Т-клеток и в различных точках времени после введения показан в Фиг. 4A. Фиг. 4B показывает уровень sBCMA до введения CAR+ Т-клеток (предшествующее лечение) у субъектов, которые продемонстрировали общий ответ PR или лучше (ответившие на терапию), и у субъектов, которые продемонстрировали ответ хуже чем PR (MR или SD; не ответившие на терапию). Ответы наблюдали у субъектов в широком диапазоне уровней sBCMA, и ответ или его отсутствие не коррелировали с уровнями sBCMA. Снижение уровня sBCMA наблюдали после введения анти-BCMA CAR, что согласуется с активностью уничтожения опухоли клетками анти-BCMA CAR+. Результаты показали большее снижение sBCMA, наблюдаемое у субъектов с общим ответом PR или лучше (PR, VGPR, CR или sCR; ответившие на терапию) по сравнению с субъектами с общим ответом, который хуже чем PR (MR или SD; не ответившие на терапию) на день 29 или позже. Результаты согласовывались с наблюдением, что анти-BCMA CAR+ Т-клетки не ингибировались высокими присутствующими до лечения уровнями sBCMA.

E. Заключение

[0728] Результаты согласовались с наблюдением высокого показателя общего ответа (ORR) (82%) в ответ на введение анти-BCMA CAR+ клеток, которые экспрессируют полностью человеческий антигенсвязывающий домен и получены способом изготовления, который приводит к популяции, обогащенной фенотипами Т-клеток центральной памяти, который был высоким у ранее получавших интенсивное лечение субъектов с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой (R/R MM), 77% из которых имели высокий цитогенетический риск. Сильную экспансию вводимых клеток наблюдали при всех испытанных уровнях доз, и приблизительно у 27% субъектов был достигнут полный ответ (CR) или строгий полный ответ (sCR), с общим наблюдением углубления ответа с течением времени. Высокий показатель CR и sCR 43% наблюдали при наименьшем

уровне введенной дозы (50×10^6 CAR+ Т-клеток). Результаты также согласовывались с управляемым профилем токсичности, включая низкий процент случаев CRS степени 3 или более высокой степени (9%) и неврологических явлений (7%) степени 3 или выше. CRS 1 или 2 степени наблюдали примерно у 71% субъектов, а неврологические явления степени 1 или 2 наблюдали у 18% субъектов. Результаты также показали, что анти-BCMA CAR+ Т-клетки проявляли активность у субъектов, имевших до лечения высокий уровень растворимого BCMA.

Пример 4: Дальнейшая оценка ответа и безопасности после введения анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (MM)

[0729] Показатели ответа и безопасности оценивали у пациентов в последующие моменты времени в клиническом исследовании, описанном в Примерах 2 и 3, при этом некоторые дополнительные субъекты получали разные дозы клеток.

A. Субъекты и лечение

[0730] Анализ в моменты времени, представленные в этом примере, основан на оценке в общей сложности 51 субъекта, которым вводили анти-BCMA CAR-экспрессирующие клетки. 51 субъект представляли собой взрослых людей с рецидивирующей или рефрактерной (R/R) множественной миеломой (MM), которые получили не давшие эффекта 3 или более предшествующих лечения (3 или более предшествующие лечения, включая по меньшей мере (1) аутологичную трансплантацию стволовых клеток, (2) ингибитор протеасом, (3) иммуномодулирующее средство и/или (4) анти-CD38 моноклональное антитело, в каждом случае, кроме случаев, когда субъект не являлся кандидатом на получение такого лечения, например, из-за того, что оно противопоказано).

[0731] В День 1 субъектам вводили дозу CAR+ Т-клеток следующим образом: в разовой дозе уровня дозы 2A (DL2A), содержащей общее количество $3,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток, в разовой дозе уровня дозы 3 (DL3), содержащей общее количество $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток, или в разовой дозе уровня дозы 3A (DL3A), содержащей общее количество $6,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток. Субъектов наблюдали и ответ оценивали, как описано в Примерах 2 и 3 выше.

B. Оценки ответа и безопасности после лечения

[0732] На момент оценки 51 субъект получил анти-BCMA CAR-экспрессирующие клетки при DL2A (n=19), DL3 (n=19) и DL3A (n=13). Средний возраст составлял 61 (33-77) год; среднее время с момента постановки диагноза составляло 7,0 (1,7-23,6) лет; и у субъекты получили в среднем 6 (3-18) предшествующих схем лечения. В целом, 92% субъектов ранее получали 2 терапии иммуномодулирующими средствами, 2 терапии ингибитором протеасом и терапию анти-CD38 моноклональным антителом, 92% имели предшествующую аутологичную трансплантацию стволовых клеток (ASCT) и 96% субъектов были рефрактерны к последней терапии; 61% субъектов имели переходную терапию (77% были рефрактерными). У двух субъектов наблюдали дозоограничивающую

токсичность: неврологическое явление (NE) 3-й степени в течение более 7 дней при DL2A и нейтропения 4-й степени в течение >28 дней при DL3. У одного субъекта была не связанная с лечением остановка сердца 5-й степени со стероид-индуцированной миопатией в качестве способствующего фактора через 53 дня после инфузии. Синдром высвобождения цитокинов (CRS) 3/4 степени наблюдали у 2% субъектов (любая степень, 92%); среднее время до начала и нормализации составляло 2 (1-4) дня и 3 (1-10) дня. NE степени 3/4 возникали у 4% субъектов (любая степень, 10%). Среднее время до начала и нормализации составляло 6 (1-6) дней и 5 (2-8) дней. CRS/NE лечили тоцилизумабом и/или стероидами (78%), анакинрой (14%) и/или сосудосуживающими средствами (6%). Анемия степени 3 или выше, нейтропения и тромбоцитопения возникали у 21%, 55% и 44% субъектов на день 29 (среднее время до нормализации до степени 2 или менее любой цитопении $\leq$ 2,1 месяца). Инфекции степени 3 или выше возникали у 14%. В общей сложности 44 субъектов оценивали на ответ, как показано в Таблице E7. Медиана PFS не была достигнута. Сильную клеточную экспансию наблюдали при всех уровнях доз.

Таблица E7

Оценка безопасности после введения CAR+ клеток

n (%)	DL2A ($3,0\times10^8$) N=19	DL3 ($4,5\times10^8$) N=18	DL3A ($6,0\times10^8$) N=7	Все N=44
ORR (sCR+CR+VGPR+PR)	18 (95)	17 (94)	5 (71)	40 (91)
sCR+CR	5 (26)	9 (50)	3 (43)	17 (39)
VGPR	8 (42)	3 (17)	0	11 (25)
PR	5 (26)	5 (28)	2 (29)	12 (27)
Медиана наблюдения, месяцы	6,1	5,8	1,7	5,9
CRS степени $\geq$ 3[a]	0	1 (5)	0	1 (2)
NE степени $\geq$ 3[a]	1 (5)	1 (5)	0	2 (4)

[a]n=19, 19, 13 и 51 для DL2A, DL3, DL3A и общее количество

C. Заключение

[0733] Результаты согласовывались с наблюдением управляемого профиля безопасности и высокой частоты ответа в ответ на введение $3,0\times10^8$, $4,5\times10^8$ или $6,0\times10^8$ общего количества анти-BCMA CAR+ Т-клеток, с 91% субъектов с объективной частотой ответа (ORR), и при этом 39% субъектов достигли полного ответа (CR) или строгого CR (sCR). Наблюдали углубление ответа с течением времени.

Пример 5: Профилактическое введение антагонистов рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) с введением анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (MM)

[0734] Антагонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), анакинру (AKR), профилактически вводили людям с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой (MM), которым вводили композиции экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR, специфический в отношении В-клеточного антигена созревания (BCMA), для оценки

эффекта на возникновение, частоту и тяжесть потенциальных событий, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS).

[0735] Композиции, содержащие аутологичные Т-клетки, были сконструированы для экспрессии иллюстративного CAR, специфического в отношении BCMA, описанного в Примере 1 выше, и их вводили взрослым людям с рецидивирующей или рефрактерной (R/R) множественной миеломой (MM), которые уже получили 3 или более предшествующих лечений.

[0736] Вводимые композиции Т-клеток обычно получали способом, как описано в Примере 2 выше. CAR содержал полученный из BCMA-55 связывающий домен scFv, модифицированный полученный из IgG C_H2-C_H3-шарнирный спейсер, трансмембранный домен CD28 и внутриклеточную сигнальную область, включающую, по порядку, эндодомен 4-1BB и эндодомен CD3зета, с оптимизированными полинуклеотидами, кодирующими CAR, как описано в Примере 1.

[0737] За два-семь дней до инфузии CAR+ Т-клеток субъекты получали лимфодеплеционную химиотерапию (LDC) флударабином (flu, 30 мг/м^2/день) и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м^2/день) в течение 3 дней, LDC завершали по меньшей мере за 48 часов до инфузии CAR+ Т-клеток. Клеточные композиции вводили внутривенно, при этом день инфузии обозначали как День 1. В День 1 субъектам вводили дозу CAR+ Т-клеток следующим образом: либо в разовой дозе уровня дозы 3 (DL3), содержащей общее количество $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток, либо в разовой дозе уровня дозы 3A (DL3A), содержащей общее количество $6,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток. В частности, в исследовании, описанном в этом примере, четырнадцати пациентам вводили разовую дозу, содержащую общее количество $6,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток.

[0738] Субъекты получали 2 дозы по 100 мг AKR, вводимые подкожно (п/к) перед инфузией CAR+ Т клеток: одну дозу вводили за ночь до введения анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток, и одну дозу вводили за 3 часа до введения анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток в День 1 (n=14). Затем субъекты получили четыре дополнительные дозы AKR после введения анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток: разовую дозу 100 мг п/к AKR вводили один раз в день в течение четыре дней подряд (введение в каждый из дней 2-5; например, каждые 24 часа). В случае возникновения CRS вводили п/к 100 мг AKR два раза в день (например, каждые 12 часов) до нормализации CRS. Дозы AKR вводили примерно в одно и то же время каждый день. В случае ухудшения CRS и/или в случае возникновения неврологической токсичности следовали рекомендациям по контролю токсичности. Всех субъектов, получавших соответствующий анти-BCMA CAR-экспрессирующий Т- клеточный продукт и получавших по меньшей мере 1 дозу AKR для профилактики, оценивали на безопасность и переносимость анти-BCMA CAR-экспрессирующих Т-клеток после профилактического лечения Анакинрой.

[0739] Субъекты, которым вводили анти-BCMA CAR-экспрессирующие клетки, но не получавшие AKR, служили в качестве контрольной группы (n=19). В группах, получавших и не получавших AKR, среднее количество предшествующих схем лечения

составляло 6 и 5, и переходную терапию использовали для 57% и 68% субъектов, соответственно.

[0740] Определяли частоту возникновения и начало синдрома высвобождения цитокинов (CRS) в соответствии с критериями Lee (2014), неврологические явления (NE), экспансию и персистенцию (например, фармокинетику) CAR-экспрессирующих клеток в крови субъектов и ответ на лечение CAR-экспрессирующими Т-клетками, включая объективную частоту ответа (ORR), процент полного ответа (CR) или строгого полного ответа (sCR), в соответствии с едиными критериями ответа IMWG. Медиана наблюдения составила 3,0 (1,8-6,2) месяца для субъектов, получавших AKR, и 8,8 (5,3-12,2) месяца для контрольных субъектов. Результаты представлены в Таблице E8.

[0741] Было замечено, что использование AKR профилактики не оказывает неблагоприятного влияния на частоту NE, инфекцию, синдром активации макрофагов/гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (MAS/HLH), экспансию CAR+ Т-клеток или ответ заболевания. В частности, общая частота CRS была одинаковой в двух группах субъектов, но с меньшим количеством CRS событий степени 2 у субъектов, получавших AKR; относительный риск (95% CI)=0,54 (0,21, 1,38). Ни в одной из групп не наблюдали CRS событий степени 3 или выше. Частота неврологических явлений (NE), инфекции степени 3 или выше и MAS/HLH также была одинаковой между группами. Использование тоцилизумаба и стероидов было в количественном отношении ниже у субъектов, получавших AKR. Кинетика экспансии CAR+ Т-клеток была одинаковой в двух группах. Всех субъектов оценивали на эффективность через два месяца, с показателем общего ответа (ORR) 100% у субъектов, получавших AKR, и 95% у контрольных субъектов.

Таблица E8

Характеристики заболевания и показатели безопасности после введения CAR+ клеток

	Группа AKR n=14	Группа без AKR n=19
Международная система стадирования, стадии I/II/III, %	43/36/21	47/37/16
Измеряемый М-белок в сыворотке и/или моче, n (%)	13 (93)	14 (74)
LDH >ULN, n (%)	3 (21)	0 (0)
CRS, G1/G2 /G ≥3, %	64/29/0	37/53/0
Время до начала/продолжительность CRS, медианное значение (диапазон), дни	2 (1-11) / 3 (2-8)	2 (1-2) / 3 (1-7)
NE, G1/G2/G ≥3, %	7/7/7	5/5/0
Инфекция, G1/G2/G ≥3, %	0/0/14	15/11/11
MAS/HLH, G1/G2/G ≥3, %	0/7/0	5/0/5
Любой Т/ несколько Т любой S /T+S,%	79/29/43/43	90/37/63/63

CRS: синдром высвобождения цитокинов; G: степень; HLH: гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; LDH: лактатдегидрогеназа; MAS: синдром активации макрофагов; NE: неврологическое явление; S: Стероид; T: Тоцилизумаб; ULN: верхняя граница нормы

[0742] Эти результаты согласуются с выводами о том, что частота CRS степени 2 или выше может быть снижена за счет профилактики Анакинрой в сочетании с введением анти-BCMA CAR-экспрессирующих Т-клеток.

Пример 6: Введение анти-BCMA CAR-экспрессирующих клеток субъектам с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой (ММ), ранее получавших BCMA-направленное лечение ММ

[0743] Композиции Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR, специфический в отношении В-клеточного антигена созревания (BCMA), вводят людям с рецидивирующей и/или рефрактерной множественной миеломой (ММ), которые ранее получили предшествующую BCMA-направленную терапию.

[0744] Композиции, содержащие аутологичные Т-клетки, сконструированные для экспрессии типичного CAR, специфического в отношении BCMA, описанного в Примере 1 выше, вводят взрослым людям с рецидивирующей или рефрактерной (R/R) множественной миеломой (ММ), которые получили предшествующую BCMA-направленную терапию ММ, достигали по меньшей мере частичного ответа (PR) в соответствии с критериями ответа IMWG и впоследствии имели прогрессирование. Предшествующая BCMA-направленная терапия может включать BCMA-направленную CAR-экспрессирующую Т-клеточную терапию; BCMA-направленный рекрутер Т-клеток (TCE), который включает антитела, которые связываются одновременно с поверхностным антигеном опухолевых клеток и компонентом комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) для индуцирования Т-клеточно-опосредованного уничтожения опухолевых клеток, несущих целевой поверхностный антиген; и BCMA-направленный конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Для субъектов, которые получали предшествующую BCMA-направленную CAR-экспрессирующую Т-клеточную терапию, последнее введение предшествующей CAR Т-клеточной терапии должно быть получено не менее чем за 6 месяцев до начала исследования. Субъекты с предшествующей BCMA-направленной терапией против миеломы не были обязаны получать по меньшей мере 3 предшествующих схемы лечения миеломы и не были обязаны быть рефрактерными к последней схеме лечения миеломы.

[0745] Вводимые композиции Т-клеток получают способом, в целом описанным в Примере 2 выше. В некоторых случаях для субъектов, которые получили предшествующую BCMA-направленную CAR-экспрессирующую Т-клеточную терапию, первичные популяции Т-клеток от субъекта, например, полученные из образцов лейкафереза, оценивают на наличие или экспрессию предшествующей предшествующего BCMA-направленного CAR, например, методом проточной цитометрии с окрашиванием рекомбинантным BCMA-Fc (растворимый человеческий BCMA, слитый на своем С-конце с Fc-областью IgG), и/или с использованием количественной полимеразной цепной реакции (PCR) с праймерами или зондами, специфическими в отношении последовательностей, присутствующих в конструкции, содержащей нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие предшествующий BCMA-направленный CAR. BCMA-связывающий CAR для терапии (например, новый BCMA-связывающий CAR) содержит полученный из BCMA-55связывающий домен scFv, модифицированный полученный из IgG C_H2-C_H3-шарнирный спейсер, трансмембранный домен CD28 и внутриклеточную сигнальную область,

включающую, по порядку, эндодомен 4-1BB и эндодомен CD3зета, с оптимизированными полинуклеотидами, кодирующими CAR, как описано в Примере 1.

[0746] В некоторых случаях для субъектов, которые получили предшествующую BCMA-направленную CAR-экспрессирующую Т-клеточную терапию, полученные клеточные композиции для введения, например, экспрессирующий BCMA-связывающий CAR, описанный в Примере 1, оценивали на присутствие, количество или численность предшествующего BCMA-направленного CAR и/или BCMA-связывающего CAR для клеточной терапии (например, нового BCMA-связывающего CAR; описанного в Примере 1). В некоторых случаях присутствие, количество или численность предшествующих BCMA-направленный CAR-экспрессирующих клеток и клеток, экспрессирующих BCMA-связывающий CAR для клеточной терапии (например, новый BCMA-связывающий CAR), можно обнаружить методом проточной цитометрии с окрашиванием рекомбинантным BCMA-Fc. В некоторых случаях присутствие, количество или численность клеток, экспрессирующих BCMA-связывающий CAR для клеточной терапии (например, новый BCMA-связывающий CAR), можно обнаружить методом проточной цитометрии с окрашиванием антиидиотипическим антителом, специфическим в отношении BCMA-связывающего CAR для клеточной терапии (например, нового BCMA-связывающего CAR). В некоторых случаях присутствие BCMA-связывающего CAR для клеточной терапии (например, нового BCMA-связывающего CAR) также оценивают методом кПЦР с праймерами или зондами, специфическими в отношении последовательностей, присутствующих в конструкции, содержащей нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие BCMA-связывающий CAR для клеточной терапии (например, новый BCMA-связывающий CAR). Любое такое количество или численность можно использовать для определения присутствия и/или доли предшествующего BCMA-направленного CAR, присутствующего в клеточной композиции для введения, и/или для определения дозы клеток, экспрессирующих BCMA-связывающий CAR для клеточной терапии.

[0747] За два-семь дней до инфузии CAR+ Т-клеток субъекты получали лимфодеплеционную химиотерапию (LDC) флударабином (flu, 30 мг/м^2/день) и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м^2/день) в течение 3 дней, LDC завершали по меньшей мере за 48 часов до инфузии CAR+ Т-клеток. Клеточные композиции вводят внутривенно, при этом день инфузии обозначается как День 1. В День 1 субъектам вводят дозу CAR+ Т-клеток следующим образом: в разовой дозе уровня дозы 1 (DL1), содержащей общее количество 5×10^7 CAR+ Т-клеток; в разовой дозе уровня дозы 2 (DL2), содержащей общее количество $1,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток; в разовой дозе уровня дозы 2A (DL2A), содержащей общее количество $3,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток; в разовой дозе уровня дозы 3 (DL3), содержащей общее количество $4,5\times10^8$ CAR+ Т-клеток; или в разовой дозе уровня дозы 3A (DL3A), содержащей общее количество $6,0\times10^8$ CAR+ Т-клеток.

[0748] Определяли ответ на лечение CAR-экспрессирующими Т-клетками, включая объективную частоту ответа (ORR), показатель полного ответа (CR) или строгого полного ответа (sCR), в соответствии с едиными критериями ответа IMWG. Также определяли

частоту и тяжесть неблагоприятных событий (AE) и частоту и тяжесть отклонений лабораторных показателей.

Пример 7: Оценка композиций Т-клеток, полученных иллюстративными способами изготовления

[0749] В иллюстративном способе 50 композиций CAR+ Т-клеток, содержащих аутологичные Т-клетки, экспрессирующие анти-BCMA CAR, были получены методом афереза из образцов, собранных от 50 отдельных субъектов-людей (по одному от каждого субъекта), включая 10 здоровых доноров и 40 пациентов с множественной миеломой. CD4+ и CD8+ Т-клетки отбирали из образцов афереза и отдельно криоконсервировали. Затем клетки размораживали и отдельные CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки объединяли в соотношении 1:1 жизнеспособных CD4+ к CD8+ клеткам. Объединенные CD4+ и CD8+ Т-клетки стимулировали, трансдуцировали вектором, кодирующим CAR, и размножали в иллюстративной бессывороточной среде и замораживали путем криоконсервации, в основном как описано в Примере 2.

[0750] В иллюстративном альтернативном способе терапевтические композиции Т-клеток получали спообом, включающим основанную на иммуноаффинности селекцию Т-клеток из образцов лейкафереза от 55 отдельных субъектов-людей. Массу Т-клеток подвергали активации и трансдукции вирусным вектором, кодирующим CAR, экспансии и криоконсервации.

[0751] Клетки в замороженных композициях размораживали и оценивали методом проточной цитометрии на жизнеспособность, экспрессию маркера апоптоза, такого как активная каспаза 3 (CAS), и поверхностную экспрессию CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7, CD45RA и CAR. Определяли процент CD3+ клеток, процент CAR+ апоптический маркер-отрицательных клеток в клетках CD3+CAR+ в композициях и процент клеток центральной памяти CD4+CAR+ и клеток центральной памяти CD8+CAR+ в композициях. Фенотипы клеток клеточных композиций, полученных способом изготовления, оценивали и в некоторых аспектах сравнивали с фенотипами из клеточных композиций, полученных в альтернативном способе.

[0752] Способ изготовления в этом примере привел к получению сконструированных клеточных композиций, отвечающих конкретным заранее определенным характеристикам, включая пороговые количества клеток, экспрессирующих CAR, при введении клеточной композиции пациентам, в 100% биологических образцов человека, на которых это осуществляли. Фиг. 5A и 5B показывают медиану (горизонтальные линии), межквартильный диапазон (прямоугольник) и 1,5-кратный межквартильный диапазон (усы) для процентного содержания клеток указанных фенотипов (на основе поверхностной экспрессии CD45RA и CCR7), среди CD4+CAR+ клеток (Фиг. 5A) и среди CD8+CAR+ клеток (Фиг. 5B) в композициях, соответственно, для композиций, индивидуально созданных из группы образцов от 40 субъектов с множественной миеломой. Фиг. 5C и 5D показывают медиану (горизонтальные линии), межквартильный диапазон (прямоугольник) и 1,5x межквартильный диапазон (усы) для процентного содержания

клеток указанных фенотипов (на основании поверхностной экспрессии CD27 и CD28), среди CD4+CAR+ клеток (Фиг. 5C) и среди CD8+CAR+ клеток (Фиг. 5D) в композициях, соответственно, для композиций, индивидуально созданных из группы образцов от 40 субъектов с множественной миеломой. Для отдельных образцов лейкафереза, полученных от ряда пациентов с множественной миеломой, с использованием этого иллюстративного способа для создания сконструированных клеточных композиций из таких образцов, было замечено, что диапазон продолжительности части способа от инициации активации до сбора клеток составлял от 7 до 10 дней, и средняя продолжительность среди этих образцов была приблизительно 7,5 дней. Далее было установлено, что среднее число кумулятивных удвоений популяции в ходе оосуществления способа среди различных образцов составляло примерно 7,5.

[0753] В этом исследовании сконструированные популяции Т-клеток в клеточных композициях, полученных иллюстративным способом, включали менее 15% клеток, экспрессирующих маркер апоптоза, и были обогащены фенотипом центральной памяти по сравнению с исходными образцами и клеточными композициями, полученными с использованием иллюстративного альтернативного способа.

[0754] Настоящее изобретение не предназначено для ограничения объема конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из представленного в настоящей заявке описания и указаний. Такие варианты могут применяться на практике без отклонения от истинного объема и сущности изобретения, и предполагается, что они входят в объем настоящего изобретения.

Последовательности

SEQ ID:	Последовательность	Описание
1	GGGGSGGGGSGGGGS	$(4GS)_3$ линкер (aa)
2	GGGS	3GS линкер (aa)
3	gctgagagtcaagttttccaggtccgccgacgctccagcct	4-1BB/CD3 зета предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
4	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB-происходящая внутриклеточная ко-сигнальная последовательность (aa)
5	aagcgggggagaaagaaactgctgtatattttcaaacagccctttatgagacctgtgcagactacccaggaggaagacggatgcagctgtaggtttcccgaggaagaggaaggaggctgtgagctg	4-1BB-происходящая внутриклеточная ко-сигнальная последовательность (nt)
6	aagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaagcagcccttcatgcggccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctg	4-1BB-происходящая внутриклеточная ко-сигнальная последовательность (nt)
7	GGGGS	4GS линкер (aa)
8	gaatctaagtacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggacttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggaccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagaggaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacactcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag	Альтернативный CO/SSE спейсер (nt)
9	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctccctgaggctgtcttgcgcagccagcggcttcacctttagcgactactatatgtcctggatcagacaggcacctggcaagggcctggagtgggtgagctacatcagctcctctggctccacaatctactatgccgactctgtgaagggccggtttaccatcagcagagataacgccaagaattccctgtatctgcagatgaacagcctgagggccgaggacacagccgtgtactattgcgccaaggtggacggcgattacaccgaggattattggggccagggcacactggtgaccgtgagctccggcggcggcggctctggaggaggaggcagcggcggaggaggctcccagtctgccctgacacagccagccagcgtgtccggctctcccggacagtccatcacaatctcttgtaccggctctagctccgacgtgggcaagtacaacctggtgtcctggtatcagcagccccctggcaaggcccctaagctgatcatctacgatgtgaacaagaggccatctggcgtgagcaatcgcttcagcggctccaagtctggcaataccgccacactgaccatcagcggcctgcagggcgacgatgaggcagattactattgttctagctacggcggcagcagatcctacgtgttcggcacaggcaccaaggtgaccgtgctggaatctaagtacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagt	анти-BMCA CAR

	tcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctag agaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctg caccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagcca agagagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaag aatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgcc gtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacct cctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggat aaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgag gccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaaga tgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggt taccgtggccttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctgctcta catcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagat ggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgaga gtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaacc agctgtacaacgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctgg ataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacggaag aatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgagg cctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaagggaca cgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacgca ctgcacatgcaggccctgccacctaga	
10	gaggtgcagctggtgcagagcggaggaggcctggtgcagcctggcaggtc cctgcgcctgtcttgcaccgccagcggcttcacatttggcgactatgccatgtc ctggttcaagcaggcaccaggcaagggcctggagtgggtgggctttatccgc tctaaggcctacggcggcaccacagagtatgccgccagcgtgaagggccgg ttcaccatcagccgggacgactctaagagcatcgcctacctgcagatgaactc tctgaagaccgaggacacagccgtgtactattgcgcagcatggagcgcccca accgattattggggccagggcaccctggtgacagtgagctccggcggcggc ggctctggaggaggaggaagcggaggaggaggatccgacatccagatgac acagtcccctgcctttctgtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgacatg tcgcgcctcccagggcatctctaactacctggcctggtatcagcagaagcccg gcaatgcccctcggctgctgatctacagcgcctccaccctgcagagcggagt gccctcccggttcagaggaaccggctatggcacagagttttctctgaccatcg acagcctgcagccagaggatttcgccacatactattgtcagcagtcttacacca gccggcagacatttggccccggcacaagactggatatcaaggagtctaaata cggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcc tgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtg acctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagttcaactg gtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagagga acagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccag gattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgc ctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaagagagc cccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggt gtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatg ggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctcctgtgctg gacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaaga tggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaagatgttctgggt gctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccgtggc cttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaag cagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcct gcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagtgaagttca	анти-BMCA CAR

	gcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtaca acgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcgg agaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaa gagggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagc gagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaagggacacgatggact gtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacgcactgcacatg caggccctgccacctaga	
11	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctct ctgaggctgagctgcgcagcctccggcttcacctttctgactactatatgagct ggatcaggcaggcaccaggcaagggcctggagtgggtgtcttacatcagctc ctctggcagcacaatctactatgccgactccgtgaagggcaggttcaccatctc tcgcgataacgccaagaatagcctgtatctgcagatgaactccctgcgggccg aggatacagccgtgtactattgcgccaaggtggacggcccccctttcctttgata tctggggccagggcacaatggtgaccgtgagctccggaggaggaggatccg gcggaggaggctctggcggcggcggctctagctatgtgctgacccagccac catccgtgtctgtggcacctggacagacagcaaggatcacctgtggagcaaa caatatcggcagcaagtccgtgcactggtaccagcagaagcctggccaggc cccaatgctggtggtgtatgacgatgacgatcggcccagcggcatccctgag agattttctggcagcaactccggcaataccgccacactgaccatctctggagtg gaggcaggcgacgaggcagattacttctgtcacctgtgggaccggagcaga gatcactacgtgttcggcacaggcaccaagctgaccgtgctggaatctaagta cggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggaccttccgtgttcc tgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggacccctgaagtg acctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtgcagttcaactg gtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagagga acagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagtgctgcaccag gattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgc ctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccagccaagagagc cccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgaccaagaatcaggt gtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatg ggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacacctcctgtgctg gacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaaga tggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaagatgttctgggt gctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccgtggc cttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaagctgctctacatcttcaag cagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaagaggaagatggctgctcct gcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcgagctgagagtgaagttca gcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtaca acgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcgg agaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaa gagggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagc gagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaagggacacgatggact gtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacgcactgcacatg caggccctgccacctaga	анти-BMCA CAR
12	agctatgagctgacacagcctccaagcgcctctggcacacctggacagcgag tgacaatgagctgtagcggcaccagcagcaacatcggcagccacagcgtga actggtatcagcagctgcctggcacagcccctaaactgctgatctacaccaac aaccagcggcctagcggcgtgcccgatagattttctggcagcaagagcggca caagcgccagcctggctatttctggactgcagagcgaggacgaggccgacta ttattgtgccgcctgggacggctctctgaacggccttgtttttggcggaggcac caagctgacagtgctgggatctagaggtggcggaggatctggcggcggagg	анти-BMCA CAR

	aagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtct ggcgccgaagtgaagaagcctggcgagagcctgaagatcagctgcaaagg cagcggctacagcttcaccagctactggatcggctgggtccgacagatgcct ggcaaaggccttgagtggatgggcatcatctaccccggcgacagcgacacc agatacagccctagctttcagggccacgtgaccatcagcgccgacaagtctat cagcaccgcctacctgcagtggtccagcctgaaggcctctgacaccgccatg tactactgcgccagatactctggcagcttcgacaattggggccagggcacact ggtcaccgtgtccagcgagtctaaatacggaccgccttgtcctccttgtcccgc tcctcctgttgccggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacacc ctgatgatcagcaggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtccca agaggatcccgaggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcac aacgccaagaccaagcctagagaggaacagttccagagcacctacagagtg gtgtccgtgctgacagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtaca agtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctc caaggccaagggccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaag ccaagaggaaatgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggc ttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaa caactacaagaccacacctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgta tagtagactcaccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagct gcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctga gcctgtctctgggcaagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctgg cctgttacagcctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtcaagcgggg cagaaagaagctgctctacatcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcaga ccacacaagaggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaag gcggctgcgagctgagagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagccta tcagcagggccaaaaccagctgtacaacgagctgaacctggggagaagaga agagtacgacgtgctggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcgg caagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaa gacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcag aagaggcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccacca aggatacctatgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	
13	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatc gccatcagctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccc tggcaaggcccctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcgg cgtgtccaatagattcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgac aattagcggactgcaggccgaggacgaggccgattactactgcagcagcaa cacccggtccagcacactggttttttggcggaggcaccaagctgacagtgctg ggatctagaggtggcggaggatctggcggcggaggaagcggaggcggcg gatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtctggcgccgagatgaag aaacctggcgcctctctgaagctgagctgcaaggccagcggctacaccttcat cgactactacgtgtactggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatct atgggctggatcaaccccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattcc agggcagagtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatgg aactgagccggctgagatccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatc tcagcgcgacggctacatggattattggggccagggaaccctggtcaccgtgt ccagcgagtctaaatacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgc cggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagc aggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccg aggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagac caagcctagagaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctg acagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgt ccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagg	анти-BMCA CAR

	gccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaa tgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccg atatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaaga ccacacctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactca ccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgat gcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctg ggcaagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagc ctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtcaagcggggcagaaagaag ctgctctacatcttcaagcagcccttcatgcggcccgtgcagaccacacaaga ggaagatggctgctcctgcagattccccgaggaagaagaaggcggctgcga gctgagagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggc caaaaccagctgtacaacgagctgaacctggggagaagagaagagtacgac gtgctggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccag acggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatg gccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggca agggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacct atgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	
14	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatc gccatcagctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccc tggcaaggcccctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcgg cgtgtccaatagattcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgac aattagcggactgcaggccgaggacgaggccgattactactgcagcagcaa cacccggtccagcacactggtttttggcggaggcaccaagctgacagtgctg ggatctagaggtggcggaggatctggcggcggaggaagcggaggcggcg gatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtctggcgccgagatgaag aaacctggcgcctctctgaagctgagctgcaaggccagcggctacaccttcat cgactactacgtgtactggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatct atgggctggatcaaccccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattcc agggcagagtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatgg aactgagccggctgagatccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatc tcagcgcgacggctacatggattattggggccagggaaccctggtcaccgtgt ccagcgagtctaaatacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgc cggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagc aggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccg aggtgcagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagac caagcctagagaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctg acagtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgt ccaacaagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagg gccagccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaa tgaccaagaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccg atatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaaga ccacacctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactca ccgtggataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgat gcacgaggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctg ggcaagatgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagc ctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtcaggagtaagaggagcagg ctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccaccc gcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc agagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaa accagctgtacaacgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgc tggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacgg aagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccg	анти-BMCA CAR

	aggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaaggg acacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgac gcactgcacatgcaggccctgccacctaga	
15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGD YTEDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQS ALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVSW YQQPPGKAPKLIIYDVNKRPSGVSNRFSGSKSGNT ATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGSRSYVFGTGTK VTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	анти-BMCA CAR
16	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAM SWFKQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVK GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAW SAPTDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPAFLSASVGDRVTVTCRASQGISNYLAW YQQKPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYGTE FSLTIDSLQPEDFATYYCQQSYTSRQTFGPGTRLDI KESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	анти-BMCA CAR
17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGP PSFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSY VLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHWYQ QKPGQAPMLVVYDDDDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRDHYVFGTGTK LTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV	анти-BMCA CAR

	HNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMFWVLV VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR	
18	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSLNGLVFGG GTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGHVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGSFDN WGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG KMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	анти-BMCA CAR
19	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEM KKPGASLKLSCKASGYTFIDYYVYWMRQAPGQG LESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQ GTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	анти-BMCA CAR
20	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQH	анти-BMCA CAR

	PGKAPKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEM KKPGASLKLSCKASGYTFIDYYVYWMRQAPGQG LESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQ GTLVTVSSESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKMF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	
21	YFDSL	эпитоп BCMA
22	TGSSSDVGKYNLVS	BCMA-23 CDR-L1 (aa)
23	DVNKRPS	BCMA-23 CDR-L2 (aa)
24	SSYGGSRSYV	BCMA-23 CDR-L3 (aa)
25	ggctgattattattgtagctcatatggaggtagtaggtctt	BCMA-23 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
26	ctactacatgagctggatccgccaggctccagggaaggggc	BCMA-23 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
27	ctactatatgtcctggatcagacaggcacctggcaagggcc	BCMA-23 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
28	ggcagattactattgttctagctacggcggcagcagatcct	BCMA-23 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
29	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGD YTEDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQS ALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVSW YQQPPGKAPKLIIYDVNKRPSGVSNRFSGSKSGNT ATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGSRSYVFGTGTK VTVL	BCMA-23 scFv (aa)
30	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTACTA CATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTG	BCMA-23 scFv (nt)

	GTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGG GCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAG AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAA AGTAGACGGAGACTACACAGAGGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTG GAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT GGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCC TCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACT ATCTCCTGCACTGGAAGCAGCAGTGATGTTGGC AAATATAATCTTGTCTCCTGGTACCAACAGCCC CCAGGCAAAGCCCCCAAGCTCATAATTTATGAC GTCAATAAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGC TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCACC CTGACAATCTCTGGGCTCCAGGGTGACGACGAG GCTGATTATTATTGTAGCTCATATGGAGGTAGT AGGTCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAAGGTG ACCGTCCTA	
31	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctc cctgaggctgtcttgcgcagccagcggcttcacctttagcgactactatatgtcc tggatcagacaggcacctggcaagggcctggagtgggtgagctacatcagct cctctggctccacaatctactatgccgactctgtgaagggccggtttaccatca gcagagataacgccaagaattccctgtatctgcagatgaacagcctgagggc cgaggacacagccgtgtactattgcgccaaggtggacggcgattacaccgag gattattggggccagggcacactggtgaccgtgagctccggcggcggcggc tctggaggaggaggcagcggcggaggaggctcccagtctgccctgacaca gccagccagcgtgtccggctctcccggacagtccatcacaatctcttgtaccg gctctagctccgacgtgggcaagtacaacctggtgtcctggtatcagcagccc cctggcaaggcccctaagctgatcatctacgatgtgaacaagaggccatctgg cgtgagcaatcgcttcagcggctccaagtctggcaataccgccacactgacca tcagcggcctgcagggcgacgatgaggcagattactattgttctagctacggc ggcagcagatcctacgtgttcggcacaggcaccaaggtgaccgtgctg	BCMA-23 scFv (nt)
32	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGD YTEDYWGQGTLVTVSS	BCMA-23 V_H цепь (aa)
33	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVS WYQQPPGKAPKLIIYDVNKRPSGVSNRFSGSKSG NTATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGSRSYVFGTG TKVTVL	BCMA-23 V_L цепь (aa)
34	DYYMS	BCMA-23, -26 CDR-H1 (aa) Kabat numbering
35	YISSSGSTIYYADSVKG	BCMA-23, -26 CDR-H2 (aa) номенклатура Kabat
36	VDGDYTEDY	BCMA-23 CDR-H3 (aa)
37	DYAMS	BCMA-25 CDR-H1 (aa) номенклатура Kabat
38	FIRSKAYGGTTEYAASVKG	BCMA-25 CDR-H2 (aa) номенклатура Kabat
39	WSAPTDY	BCMA-25 CDR-H3 (aa)
40	RASQGISNYLA	BCMA-25 CDR-L1 (aa)
41	SASTLQS	BCMA-25 CDR-L2 (aa)

42	QQSYTSRQT	BCMA-25 CDR-L3 (aa)
43	ctatgccatgtcctggttcaggcaggcaccaggcaagggcc	BCMA-25 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
44	gtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgacatgtcgcg	BCMA-25 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
45	gtgggctttatccgctctaaggcctacggcggcaccacaga	BCMA-25 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
46	gtgacatgtcgcgcctcccagggcatctctaactacctggc	BCMA-25 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
47	tacagcgcctccaccctgcagagcggagtgccctcccggtt	BCMA-25 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
48	ctatgccatgtcctggttcaagcaggcaccaggcaagggcc	BCMA-25 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
49	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAM SWFRQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVK GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAW SAPTDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSD IQMTQSPAFLSASVGDRVTVTCRASQGISNYLAW YQQKPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYGTE FSLTIDSLQPEDFATYYCQQSYTSRQTFGPGTRLDI K	BCMA-25 scFv последовательность (aa)
50	gaggtgcagctggtgcagagcggaggaggcctggtgcagcctggcaggtc cctgcgcctgtcttgcaccgccagcggcttcacatttggcgactatgccatgtc ctggttcaggcaggcaccaggcaagggcctggagtgggtgggctttatccgc tctaaggcctacggcggcaccacagagtatgccgccagcgtgaagggccgg ttcaccatcagccgggacgactctaagagcatcgcctacctgcagatgaactc tctgaagaccgaggacacagccgtgtactattgcgcagcatggagcgcccca accgattattggggccagggcaccctggtgacagtgagctccggcggcggc ggctctggaggaggaggaagcggaggaggaggatccgacatccagatgac acagtcccctgcctttctgtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgacatg tcgcgcctcccagggcatctctaactacctggcctggtatcagcagaagcccg gcaatgcccctcggctgctgatctacagcgcctccaccctgcagagcggagt gccctcccggttcagaggaaccggctatggcacagagttttctctgaccatcg acagcctgcagccagaggatttcgccacatactattgtcagcagtcttacacca gccggcagacatttggccccggcacaagactggatatcaag	BCMA-25 scFV(nt)
51	gaggtgcagctggtgcagagcggaggaggcctggtgcagcctggcaggtc cctgcgcctgtcttgcaccgccagcggcttcacatttggcgactatgccatgtc ctggttcaagcaggcaccaggcaagggcctggagtgggtgggctttatccgc tctaaggcctacggcggcaccacagagtatgccgccagcgtgaagggccgg ttcaccatcagccgggacgactctaagagcatcgcctacctgcagatgaactc	BCMA-25 scFV(nt) (O/SSE)

	tctgaagaccgaggacacagccgtgtactattgcgcagcatggagcgcccca accgattattggggccagggcaccctggtgacagtgagctccggcggcggc ggctctggaggaggaggaagcggaggaggaggatccgacatccagatgac acagtcccctgcctttctgtccgcctctgtgggcgatagggtgaccgtgacatg tcgcgcctcccagggcatctctaactacctggcctggtatcagcagaagcccg gcaatgcccctcggctgctgatctacagcgcctccaccctgcagagcggagt gccctcccggttcagaggaaccggctatggcacagagttttctctgaccatcg acagcctgcagccagaggatttcgccacatactattgtcagcagtcttacacca gccggcagacatttggccccggcacaagactggatatcaag	
52	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAM SWFRQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVK GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAW SAPTDYWGQGTLVTVSS	BCMA-25 VH цепь (aa)
53	DIQMTQSPAFLSASVGDRVTVTCRASQGISNYLA WYQQKPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYG TEFSLTIDSLQPEDFATYYCQQSYTSRQTFGPGTR LDIK	BCMA-25 VL цепь (aa)
54	VDGPPSFDI	BCMA-26 CDR-H3 (aa)
55	GANNIGSKSVH	BCMA-26 CDR-L1 (aa)
56	DDDDRPS	BCMA-26 CDR-L2 (aa)
57	HLWDRSRDHYV	BCMA-26 CDR-L3 (aa)
58	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGP PSFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSY VLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHWYQ QKPGQAPMLVVYDDDDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRDHYVFGTGTK LTVL	BCMA-26 scFv последовательность (aa)
59	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctct ctgaggctgagctgcgcagcctccggcttcacctttctgactactatatgagct ggatcaggcaggcaccaggcaagggcctggagtgggtgtcttacatcagctc ctctggcagcacaatctactatgccgactccgtgaagggcaggttcaccatctc tcgcgataacgccaagaatagcctgtatctgcagatgaactccctgcgggccg aggatacagccgtgtactattgcgccaaggtggacggcccccttcctttgata tctggggccagggcacaatggtgaccgtgagctccggaggaggaggatccg gcggaggaggctctggcggcggcggctctagctatgtgctgacccagccac catccgtgtctgtggcacctggacagacagcaaggatcacctgtggagcaaa caatatcggcagcaagtccgtgcactggtaccagcagaagcctggccaggc cccaatgctggtggtgtatgacgatgacgatcggcccagcggcatccctgag agattttctggcagcaactccggcaataccgccacactgaccatctctggagtg gaggcaggcgacgaggcagattacttctgtcacctgtgggaccggagcaga gatcactacgtgttcggcacaggcaccaagctgaccgtgctg	BCMA-26 scFV(nt)
60	gaggtgcagctggtggagtccggaggaggcctggtgaagccaggaggctct ctgaggctgagctgcgcagcctccggcttcacctttctgactactatatgagct ggatcaggcaggcaccaggcaagggcctggagtgggtgtcttacatcagctc ctctggcagcacaatctactatgccgactccgtgaagggcaggttcaccatctc tcgcgataacgccaagaatagcctgtatctgcagatgaactccctgcgggccg aggatacagccgtgtactattgcgccaaggtggacggcccccttcctttgata tctggggccagggcacaatggtgaccgtgagctccggaggaggaggatccg gcggaggaggctctggcggcggcggctctagctatgtgctgacccagccac catccgtgtctgtggcacctggacagacagcaaggatcacctgtggagcaaa	BCMA-26 scFV(nt) (O/SSE)

	caatatcggcagcaagtccgtgcactggtaccagcagaagcctggccaggc cccaatgctggtggtgtatgacgatgacgatcggcccagcggcatccctgag agattttctggcagcaactccggcaataccgccacactgaccatctctggagtg gaggcaggcgacgaggcagattacttctgtcacctgtgggaccggagcaga gatcactacgtgttcggcacaggcaccaagctgaccgtgctg	
61	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGP PSFDIWGQGTMVTVSS	BCMA-26 V_H цепь (aa)
62	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHW YQQKPGQAPMLVVYDDDDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRDHYVFGTG TKLTVL	BCMA-26 VL цепь (aa)
63	GYSFTSYW	BCMA-52 CDR-H1 (aa)
64	GYSFTSYWIG	BCMA-52 CDR-H1 (aa) - номенклатура AbM
65	GYSFTSY	BCMA-52 CDR-H1 (aa) - номенклатура Chothia
66	SYWIG	BCMA-52 CDR-H1 (aa) - номенклатура Kabat
67	IYPGDSDT	BCMA-52 CDR-H2 (aa)
68	IIYPGDSDTR	BCMA-52 CDR-H2 (aa) - номенклатура AbM
69	YPGDSD	BCMA-52 CDR-H2 (aa) - номенклатура Chothia
70	IIYPGDSDTRYSPSFQG	BCMA-52 CDR-H2 (aa) - номенклатура Kabat
71	ARYSGSFDN	BCMA-52 CDR-H3 (aa)
72	YSGSFDN	BCMA-52 CDR-H3 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
73	SSNIGSHS	BCMA-52 CDR-L1 (aa)
74	SGTSSNIGSHSVN	BCMA-52 CDR-L1 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
75	TNN	BCMA-52 CDR-L2 (aa)
76	TNNQRPS	BCMA-52 CDR-L2 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
77	AAWDGSLNGLV	BCMA-52 CDR-L3 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
78	ctggccatcagtggcctccagtctgaggatgaggctgatta	BCMA-52 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
79	agatacagcccgtccttccaaggccacgtcaccatctcagc	BCMA-52 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
80	ctggctatttctggactgcagagcgaggacgaggccgacta	BCMA-52

		предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
81	agatacagccctagctttcagggccacgtgaccatcagcgc	BCMA-52 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
82	tcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagaggg tcaccatgtcttgttctggaaccagctccaacatcggaagtcactctgtaaactg gtaccagcagctcccaggaacggcccccaaactcctcatctatactaataatca gcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag cctccctggccatcagtggcctccagtctgaggatgaggctgattattactgtg cagcatgggatggcagcctgaatggtctggtattcggcggagggaccaagct gaccgtcctaggttctagaggtggtggtggtagcggcggcggcggctctggt ggtggtggatccctcgagatggccgaggtgcagctggtgcagtctggagcag aggtgaaaaagcccggggagtctctgaagatctcctgtaagggttctggatac agctttaccagctactggatcggctgggtgcgccagatgcccgggaaaggcc tggagtggatggggatcatctatcctggtgactctgataccagatacagcccgt ccttccaaggccacgtcaccatctcagctgacaagtccatcagcactgcctac ctgcagtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgc gctactctggttctttcgataactggggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca	BCMA-52 scFv
83	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSLNGLVFGG GTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGHVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGSFDN WGQGTLVTVSS	BCMA-52 scFv (aa)
84	agctatgagctgacacagcctccaagcgcctctggcacacctggacagcgag tgacaatgagctgtagcggcaccagcagcaacatcggcagccacagcgtga actggtatcagcagctgcctggcacagcccctaaactgctgatctacaccaac aaccagcggcctagcggcgtgcccgatagattttctggcagcaagagcggca caagcgccagcctggctatttctggactgcagagcgaggacgaggccgacta ttattgtgccgcctgggacggctctctgaacggccttgtttttggcggaggcac caagctgacagtgctgggatctagaggtggcggaggatctggcggcggagg aagcggaggcggcggatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtct ggcgccgaagtgaagaagcctggcgagagcctgaagatcagctgcaaagg cagcggctacagcttcaccagctactggatcggctgggtccgacagatgcct ggcaaaggccttgagtggatgggcatcatctaccccggcgacagcgacacc agatacagccctagctttcagggccacgtgaccatcagcgccgacaagtctat cagcaccgcctacctgcagtggtccagcctgaaggcctctgacaccgccatg tactactgcgccagatactctggcagcttcgacaattggggccagggcacact ggtcaccgtgtccagc	BCMA-52 scFv (nt) (O/SSE)
85	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGHV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGS FDNWGQGTLVTVSS	BCMA-52 VH цепь (aa)
86	gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtct ctgaagatctcctgtaagggttctggatacagctttaccagctactggatcggct gggtgcgccagatgcccgggaaaggcctggagtggatggggatcatctatc ctggtgactctgataccagatacagcccgtccttccaaggccacgtcaccatct	BCMA-52 VH цепь (nt)

	cagctgacaagtccatcagcactgcctacctgcagtggagcagcctgaaggc ctcggacaccgccatgtattactgtgcgcgctactctggttctttcgataactgg ggtcaaggtactctggtgaccgtctcctcagc	
87	gaagtgcagctggtgcagtctggcgccgaagtgaagaagcctggcgagagc ctgaagatcagctgcaaaggcagcggctacagcttcaccagctactggatcg gctgggtccgacagatgcctggcaaaggccttgagtggatgggcatcatctac cccggcgacagcgacaccagatacagccctagctttcagggccacgtgacc atcagcgccgacaagtctatcagcaccgcctacctgcagtggtccagcctgaa ggcctctgacaccgccatgtactactgcgccagatactctggcagcttcgaca attggggccagggcacactggtcaccgtgtccagc	BCMA-52 VH цепь (nt) (O/SSE)
88	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSLNGLVFGG GTKLTVLG	BCMA-52 VL цепь (aa)
89	tcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagaggg tcaccatgtcttgttctggaaccagctccaacatcggaagtcactctgtaaactg gtaccagcagctcccaggaacggcccccaaactcctcatctatactaataatca gcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag cctccctggccatcagtggcctccagtctgaggatgaggctgattattactgtg cagcatgggatggcagcctgaatggtctggtattcggcggagggaccaagct gaccgtcctaggt	BCMA-52 VL цепь (nt)
90	agctatgagctgacacagcctccaagcgcctctggcacacctggacagcgag tgacaatgagctgtagcggcaccagcagcaacatcggcagccacagcgtga actggtatcagcagctgcctggcacagcccctaaactgctgatctacaccaac aaccagcggcctagcggcgtgcccgatagattttctggcagcaagagcggca caagcgccagcctggctatttctggactgcagagcgaggacgaggccgacta ttattgtgccgcctgggacggctctctgaacggccttgtttttggcggaggcac caagctgacagtgctggga	BCMA-52 VL цепь (nt) (O/SSE)
91	QNEYF	BCMA-52-scFV-mFc BCMA связывающийся эпитоп 1
92	CIPCQL	BCMA-52-scFV-mFc BCMA связывающийся эпитоп 2
93	CQRYC	BCMA-52-scFV-mFc BCMA связывающийся эпитоп 3
94	GYTFIDYY	BCMA-55 CDR-H1 (aa)
95	GYTFIDYYVY	BCMA-55 CDR-H1 (aa) - номенклатура AbM
96	GYTFIDY	BCMA-55 CDR-H1 (aa) - номенклатура Chothia
97	DYYVY	BCMA-55 CDR-H1 (aa) - номенклатура Kabat
98	INPNSGGT	BCMA-55 CDR-H2 (aa)
99	WINPNSGGTN	BCMA-55 CDR-H2 (aa) - номенклатура AbM
100	NPNSGG	BCMA-55 CDR-H2 (aa) - номенклатура Chothia
101	WINPNSGGTNYAQKFQG	BCMA-55 CDR-H2 (aa) - номенклатура Kabat
102	ARSQRDGYMDY	BCMA-55 CDR-H3 (aa)

103	SQRDGYMDY	BCMA-55 CDR-H3 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
104	ISCTGTSSD	BCMA-55 CDR-L1 (aa)
105	TGTSSDVG	BCMA-55 CDR-L1 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
106	EDS	BCMA-55 CDR-L2 (aa)
107	EDSKRPS	BCMA-55 CDR-L2 (aa) - номенклатура Kabat, Chothia и AbM
108	SSNTRSSTLV	BCMA-55 CDR-L3 (aa) - Kabat, Chothia и номенклатура AbM
109	gccctcaggggtttctaatcgcttctctggctccaagtctg	BCMA-55 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
110	cgaggctgattattactgcagctcaaatacaagaagcagca	BCMA-55 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
111	cgaggccgattactactgcagcagcaacacccggtccagca	BCMA-55 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
112	gcccagcggcgtgtccaatagattcagcggcagcaagagcg	BCMA-55 предсказанный акцепторный сайт сплайсинга (O/SSE)
113	caatctgccctgactcagcctgcctccgtgtctgcgtctcctggacagtcgatc gccatctcctgcactggaaccagcagtgacgttggttggtatcaacagcaccc aggcaaagcccccaaactcatgatttatgaggacagtaagcggccctcaggg gtttctaatcgcttctctggctccaagtctggcaacacggcctccctgaccatct ctgggctccaggctgaggacgaggctgattattactgcagctcaaatacaaga agcagcactttggtgttcggcggagggaccaagctgaccgtcctaggttctag aggtggtggtggtagcggcggcggcggctctggtggtggtggatccctcga gatggccgaagtgcagctggtgcagtctggggctgagatgaagaagcctgg ggcctcactgaagctctcctgcaaggcttctggatacaccttcatcgactactat gtatactggatgcgacaggcccctggacaagggcttgagtccatgggatgga tcaaccctaacagtggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtc accatgaccagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcagg ctgagatctgacgacaccgccatgtattactgtgcgcgctcccagcgtgacgg ttacatggattactggggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca	BCMA-55 scFv
114	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAEM KKPGASLKLSCKASGYTFIDYYVYWMRQAPGQG LESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQ GTLVTVSS	BCMA-55 scFv (aa)

115	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatc gccatcagctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccc tggcaaggcccctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcgg cgtgtccaatagattcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgac aattagcggactgcaggccgaggacgaggccgattactactgcagcagcaa cacccggtccagcacactggtttttggcggaggcaccaagctgacagtgctg ggatctagaggtggcggaggatctggcggcggaggaagcggaggcggcg gatctcttgaaatggctgaagtgcagctggtgcagtctggcgccgagatgaag aaacctggcgcctctctgaagctgagctgcaaggccagcggctacaccttcat cgactactacgtgtactggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatct atgggctggatcaaccccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattcc agggcagagtgaccatgaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatgg aactgagccggctgagatccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatc tcagcgcgacggctacatggattattggggccagggaaccctggtcaccgtgt ccagc	BCMA-55 scFv (nt) (O/SSE)
116	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCKASGYTFIDYYV YWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQ RDGYMDYWGQGTLVTVSS	BCMA-55 VH цепь (aa)
117	gaagtgcagctggtgcagtctggggctgagatgaagaagcctggggcctca ctgaagctctcctgcaaggcttctggatacaccttcatcgactactatgtatactg gatgcgacaggcccctggacaagggcttgagtccatgggatggatcaaccct aacagtggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcaccatga ccagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagat ctgacgacaccgccatgtattactgtgcgcgctcccagcgtgacggttacatg gattactggggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca	BCMA-55 VH цепь (nt)
118	gaagtgcagctggtgcagtctggcgccgagatgaagaaacctggcgcctctc tgaagctgagctgcaaggccagcggctacaccttcatcgactactacgtgtact ggatgcggcaggcccctggacagggactcgaatctatgggctggatcaacc ccaatagcggcggcaccaattacgcccagaaattccagggcagagtgaccat gaccagagacaccagcatcagcaccgcctacatggaactgagccggctgag atccgacgacaccgccatgtactactgcgccagatctcagcgcgacggctac atggattattggggccagggaaccctggtcaccgtgtccagc	BCMA-55 VH цепь (nt) (O/SSE)
119	QSALTQPASVSASPGQSIAISCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG	BCMA-55 VL цепь (aa)
120	caatctgccctgactcagcctgcctccgtgtctgcgtctcctggacagtcgatc gccatctcctgcactggaaccagcagtgacgttggttggtatcaacagcaccc aggcaaagcccccaaactcatgatttatgaggacagtaagcggccctcaggg gtttctaatcgcttctctggctccaagtctggcaacacggcctccctgaccatct ctgggctccaggctgaggacgaggctgattattactgcagctcaaatacaaga agcagcactttggtgttcggcggagggaccaagctgaccgtccta	BCMA-55 VL цепь (nt)
121	cagtctgccctgacacagcctgccagcgttagtgctagtcccggacagtctatc gccatcagctgtaccggcaccagctctgacgttggctggtatcagcagcaccc tggcaaggcccctaagctgatgatctacgaggacagcaagaggcccagcgg cgtgtccaatagattcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgac aattagcggactgcaggccgaggacgaggccgattactactgcagcagcaa cacccggtccagcacactggtttttggcggaggcaccaagctgacagtgctg	BCMA-55 VL цепь (nt) (O/SSE)
122	MLMAG	BCMA-55-scFV-mFc BCMA связывающийся эпитоп 1
123	YFDSLL	BCMA-55-scFV-mFc

		BCMA связывающийся эпитоп 2
124	QLRCSSNTPPL	BCMA-55-scFV-mFc BCMA связывающийся эпитоп 3
125	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGR FAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSVTVSS	BCMA-C1 V_H цепь (aa)
126	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGR FAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV LTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHW YQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTD FTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEI K	BCMA-C1 VH-VL scFv (aa)
127	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLI HWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGT KLEIK	BCMA-C1 V_L цепь (aa)
128	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLI HWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGT KLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGPELKKP GETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKW MGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYL QINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVT VSS	BCMA-C1 VL-VH scFv (aa)
129	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGM NWVKQAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKG RFAFSVETSATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEI YYGYDGGFAYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGGSG GGGSDVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDV NTAVSWYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFT GSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWT FGGGTKLDIK	BCMA-C2 VH-VL scFv (aa)
130	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVS WYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSG ADFTLTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGT KLDIKGGGGSGGGGSGGGGSQIQLVQSGPDLKKP GETVKLSCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGKGFK WMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATTA YLQINNLKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYW GQGTLVTVSA	BCMA-C2 VL-VH scFv (aa)
131	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGM NWVKQAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKG RFAFSVETSATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEI YYGYDGGFAYWGQGTLVTVSA	BCMA-C2 V_H цепь (aa)
132	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVS WYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSG ADFTLTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGT	BCMA-C2 V_L цепь (aa)

	KLDIK	
133	QNEYFDSLL	BMCA эпитоп
134	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	CD28 эктодоменовый спейсер (aa)
135	attgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccc	CD28 эктодоменовый спейсер (nt)
136	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 эндо (aa)
137	aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc	CD28 эндо (nt)
138	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 трансмембранный домен (aa)
139	atgttttgggtgctggtcgtggtcggaggggtgctggcctgttacagcctgctggtgacagtcgctttcatcatcttctgggtg	CD28 трансмембранный домен (nt)
140	atgttctgggtgctcgtggtcgttggcggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccgtggccttcatcatcttttgggtc	CD28 трансмембранный домен (nt)
141	aggggtgctggcctgttacagcctgctggtgacagtcgctt	CD28TM предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
142	MPLLLLLPLLWAGALA	CD33 сигнальный пептид
143	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3-зета-происходящий внутриклеточный сигнальный домен (aa)
144	agagtcaagttttccaggtccgccgacgctccagcctaccagcaggggcagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcggagaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaaggccacgacggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgcaggccctgcccccaagg	CD3-зета-происходящий внутриклеточный сигнальный домен (nt)
145	agagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcctatcagcagggccaaaaccagctgtacaacgagctgaacctggggagaagagaagagtacgacgtgctggataagcggagaggcagagatcctgaaatgggcggcaagcccagacggaagaatcctcaagagggcctgtataatgagctgcagaaagacaagatggccgaggcctacagcgagatcggaatgaagggcgagcgcagaagaggcaagggacacgatggactgtaccagggcctgagcaccgccaccaaggatacctatgacgcactgcacatgcaggccctgccacctaga	CD3-зета-происходящий внутриклеточный сигнальный домен (nt)
146	MALPVTALLLPLALLLHA	CD8 альфа сигнальный пептид
147	MLQMARQCSQNEYFDSLLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNAILWTCLGLSLIISLAVFVLTFLLRKMSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKGRTGDEIVLPRGLEYTVEECTCEDCIKNKPKVDSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCNSLSAALS	Cynomolgus BCMA; GenBank No. EHH60172.1

	VTEIEKSISAR	
148	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A пептид (aa)
149	GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A пептид (aa)
150	ctttttcgcaacgggtttgc	Промотор EF1a/HTLV прямой праймер
151	ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccac agtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaaccggtgcctagag aaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttt ttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgtt ctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcg catctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggt tgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccg tctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcctttgtccggcgctcccctt ggagcctacctagactcagccggctctccacgctttgcctgaccctgcttgctc aactctacgtctttgtttcgttttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgacc ggcgcctac	промотор EF1альфа с HTLV1 энхансером
152	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A пептид (aa)
153	GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A пептид (aa)
154	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	сигнальный пептид цепи альфа GMCSFR
155	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcct cctgatccca	сигнальная последовательность цепи альфа GMCSFR
156	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-C_H2-C_H3 спейсер (aa)
157	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK	Шарнир-C_H3 спейсер (aa)
158	LLHACIPCQLR	эпитоп BCMA человека (остатки 17-27)
159	CIPCQLR	эпитоп BCMA человека (остатки 21-27)
160	SNTPPLTCQR	эпитоп BCMA человека (остатки 30-39)
161	SVTNSVK	эпитоп BCMA человека (остатки 44-50)
162	CSQNEYF	эпитоп BCMA человека (остатки 8-15)
163	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPP LTCQRYCNARSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILPRG LEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEG ATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR	Человеческий BCMA Вариант; GenBank No. ABN42510,1
164	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPP LTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLA VFVLMFLLRKISSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDL EKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDS	Человеческий BCMA; GenBank No. BAB60895.1

	DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSA TEIEKSISAR	
165	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPP LTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLA VFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDL EKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDS DHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSA TEIEKSISAR	Человеческий BCMA; NCBI No. NP_001183.2
166	MVLQTQVFISLLLWISGAYG	сигнальный пептид IgG -каппа человека (aa)
167	atggtgctgcagacccaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctccggagc atacgga	сигнальная последовательность IgG -каппа человека (nt)
168	atggtgctgcagacacaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctccggagc atacgga	Сигнальная последовательность IgG -каппа человека (nt)
169	atggtgctgcagacccaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctctggcgcc tacggc	Сигнальная последовательность IgG -каппа человека (nt)
170	atggtgctgcagacccaggtgttcatcagcctgctgctgtggatctctggcgcc tatgga	сигнальная последовательность IgG -каппа человека (nt)
171	atggtgctgcagacacaggtgttcatctccctgctgctgtggatctctggagcat acgga	сигнальная последовательность IgG -каппа человека (nt)
172	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCC VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Человеческий IgG2 Fc (Uniprot P01859)
173	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Человеческий IgG4 Fc (Uniprot P01861)
174	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4/IgG2 шарнир-IgG2/IgG4 C_H2- IgG4 C_H3 спейсер (aa)

175	gaatctaagtacggaccgccctgccctccctgccctgctcctcctgtggctgga ccaagcgtgttcctgtttccacctaagcctaaagataccctgatgatttcccgca cacctgaagtgacttgcgtggtcgtggacgtgagccaggaggatccagaagt gcagttcaactggtacgtggacggcgtggaagtccacaatgctaagactaaac cccgagaggaacagtttcagtcaacttaccgggtcgtgagcgtgctgaccgtc ctgcatcaggattggctgaacgggaaggagtataagtgcaaagtgtctaataa gggactgcctagctccatcgagaaaacaattagtaaggcaaaagggcagcct cgagaaccacaggtgtataccctgcccctagccaggaggaaatgaccaag aaccaggtgtccctgacatgtctggtcaaaggcttctatccaagtgacatcgcc gtggagtgggaatcaaatgggcagcccgagaacaattacaagaccacacca cccgtgctggactctgatggaagtttctttctgtattccaggctgaccgtggataa atctcgctggcaggagggcaacgtgttctcttgcagtgtcatgcacgaagccct gcacaatcattatacacagaagtcactgagcctgtccctgggcaaa	IgG4/IgG2 шарнир-IgG2/IgG4 C_H2- IgG4 C_H3 спейсер (nt)
176	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер (aa)
177	tttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagaccccacctgtaggtttgg caagctaggatcaaggttaggaacagagagacagcagaatatgggccaaac aggatatctgtggtaagcagttcctgccccggctcagggccaagaacagttgg aacagcagaatatgggccaaacaggatatctgtggtaagcagttcctgccccg gctcagggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtt tctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaaggacctgaaatgaccct gtgccttatttgaactaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctg ctccccgagctcaataaaagagccca	MND промотор
178	ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccac agtccccgagaagttgggggggagggggtcggcaattgaaccggtgcctagag aaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttt ttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgtt ctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcg catctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggt tgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccg tctaggtaagtttaaagctcaggtcgagaccgggcctttgtccggcgctcccctt ggagcctacctagactcagccggctctccacgctttgcctgaccctgcttgctc aactctacgtctttgtttcgttttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgacc ggcgcctacggctagcgcc	модифицированный EF1 альфа промотор
179	MAQQCFHSEYFDSLLHACKPCHLRCSNPPATCQP YCDPSVTSSVKGTYTVLWIFLGLTLVLSLALFTISF LLRKMNPEALKDEPQSPGQLDGSAQLDKADTELT RIRAGDDRIFPRSLEYTVEECTCEDCVKSKPKGDS DHFFPLPAMEEGATILVTTKTGDYGKSSVPTALQS VMGMEKPTHTR	Мышиный BCMA; NCBI No. NP_035738.1
180	cagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaa	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
181	gggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgc	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
182	cggagtgctggcctgttacagcctgctggttaccgtggcct	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
183	gctgagagtgaagttcagcagatccgccgacgctccagcct	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
184	acacctccactggatccccaagagctggatatcctgaaaac	Оптимизированный

		акцепторный сайт сплайсинга
185	accggattcctcctgatccaagcctggccagagaacagaac	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
186	acggccagtttagcctggctgtggtgtctctgaacatcacc	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
187	aagtttctttctgtattccagactgaccgtggataaatctc	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
188	cgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggacct	Оптимизированный акцепторный сайт сплайсинга
189	agtctaaatacggac	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
190	tcaactggtatgtgg	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
191	accatctccaaggcc	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
192	gccccaggtttacac	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
193	tcagcagatccgccg	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
194	ctcctgtgtgaactc	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
195	tcggaaagtgtgcaa	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
196	cagcacggccagttt	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
197	aaccggggcgagaac	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
198	ctggaaggcgagccc	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
199	tgttcatgtgagcgg	Оптимизированный донорный сайт сплайсинга
200	gagtctaaatacggaccgccttgtcctccttgtcccgctcctcctgttgccggac cttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggacaccctgatgatcagcaggac ccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccaagaggatcccgaggtg cagttcaactggtatgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagc ctagagaggaacagttccagagcacctacagagtggtgtccgtgctgacagt	оптимизированный SSE IgG4/IgG2 шарнир-IgG2/IgG4 C_H2- IgG4 C_H3 спейсер (nt)

	gctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaac aagggcctgcctagcagcatcgagaaaaccatctccaaggccaagggccag ccaagagagccccaggtttacacactgcctccaagccaagaggaaatgacca agaatcaggtgtccctgacatgcctggtcaagggcttctacccctccgatatcg ccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagaccacac ctcctgtgctggacagcgacggcagtttcttcctgtatagtagactcaccgtgg ataaatcaagatggcaagagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacacccagaaaagcctgagcctgtctctgggcaag	
201	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A пептид (aa)
202	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A пептид (aa)
203	cgccttgtcctccttgtccagctcctcctgttgccggacct	предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
204	cagtttcttcctgtatagtagactcaccgtggataaatcaa	предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
205	accggattcctcctgattcaggcctggccagagaacagaac	предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
206	cgtctaggtaagttt	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
207	gaccaaggtgaccgt	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
208	tgcactggtaccagc	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
209	taaactggtaccagc	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
210	atctcctgtaagggt	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
211	ggtcaaggtactctg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
212	gaggacagtaagcgg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
213	ggtcaaggtactctg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
214	tgcctccgtgtctgc	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
215	caccaaggtgaccgt	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
216	tgaactggtatcagc	Предсказанный донорный сайт сплайсинга

217	atctcttgaaatggt	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
218	ggccagggcacactg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
219	gaggacagcaagagg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
220	ggccagggaaccctg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
221	tgccagcgttagtgc	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
222	aatctaagtacggac	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
223	tcaactggtacgtgg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
224	acaattagtaaggca	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
225	accacaggtgtatac	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
226	tttccaggtccgccg	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
227	ctgctctgtgagtta	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
228	acgcaaagtgtgtaa	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
229	caacatggtcagttt	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
230	aacagaggtgaaaac	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
231	ctggagggtgagcca	Предсказанный донорный сайт сплайсинга
232	tggctccgccttttttcccgagggtgggggagaaccgtatat	Промотор предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
233	tgaactgcgtccgccgtctaggtaagtttaaagctcaggtc	Промотор предсказанный акцепторный сайт

		сплайсинга
234	ttctgttctgcgccgttacagatccaagctgtgaccggcgc	Промотор предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
235	gatatcgaattcctgcagcc	Обратный праймер 5′ WPRE
236	GAGTCTAAATACGGACCGCCTTGTCCTCCTTGT CCAGCTCCTCCTGTTGCCGGACCTTCCGTGTTCC TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGG TGGATGTGTCCCAAGAGGATCCCGAGGTGCAGT TCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTT CCAGAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGAC AGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG CCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGC CAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCCCAGGTTTACA CACTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGACCAAG AATCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGAC CACACCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGTTT CTTCCTGTATAGTAGACTCACCGTGGATAAATC AAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAAAGCCTGAGCCTGTCTCTGGGCAA A	Спейсер - кодон-оптимизированная (nt)
237	ESKYGPPCPPCP	Спейсер (IgG4шарнир) (aa)
238	gaatctaagtacggaccgccctgccccccttgccct	Спейсер (IgG4шарнир) (nt)
239	aagtttctttctgtattccaggctgaccgtggataaatctc	Спейсер предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
240	gggcaacgtgttctcttgcagtgtcatgcacgaagccctgc	Спейсер предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
241	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A пептид (aa)
242	GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A пептид (aa)
243	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A пептид (aa)
244	ctcgagggcggcggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtg gaggagaatcccggccctagg	T2A пептид (nt)
245	cttgaaggtggtggcgaaggcagaggcagcctgcttacatgcggagatgtgg aagagaaccccggacctaga	T2A пептид (nt)
246	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKD SLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHA FENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKE	последовательность усеченного EGFR (tEGFR) (aa)

	ISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKII SNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVS CRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHP ECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVA LGIGLFM	
247	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcct cctgatcccacgcaaagtgtgtaacggaataggtattggtgaatttaaagactc actctccataaatgctacgaatattaaacacttcaaaaactgcacctccatcagt ggcgatctccacatcctgccggtggcatttaggggtgactccttcacacatact cctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaggaaatcaca gggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacggacctccatgcctttg agaacctagaaatcatacgcggcaggaccaagcaacatggtcagttttctcttg cagtcgtcagcctgaacataacatccttgggattacgctccctcaaggagataa gtgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatttgtgctatgcaaatacaat aaactggaaaaaactgtttgggacctccggtcagaaaaccaaaattataagca acagaggtgaaaacagctgcaaggccacaggccaggtctgccatgccttgtg ctcccccgagggctgctggggcccggagcccagggactgcgtctcttgccg gaatgtcagccgaggcagggaatgcgtggacaagtgcaaccttctggagggt gagccaagggagtttgtggagaactctgagtgcatacagtgccacccagagt gcctgcctcaggccatgaacatcacctgcacaggacggggaccagacaact gtatccagtgtgcccactacattgacggcccccactgcgtcaagacctgcccg gcaggagtcatgggagaaaacaacaccctggtctggaagtacgcagacgcc ggccatgtgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcactgggcc aggtcttgaaggctgtccaacgaatgggcctaagatcccgtccatcgccactg ggatggtgggggccctcctcttgctgctggtggtggccctggggatcggcctc ttcatgtga	последовательность усеченного EGFR (tEGFR) (nt)
248	atgctgctcctcgtgacaagcctgctcctgtgtgaactccctcatccagcttttct gctcattcctcggaaagtgtgcaacggcatcggcatcggagagttcaaggac agcctgagcatcaatgccaccaacatcaagcacttcaagaattgcaccagcat cagcggcgacctgcacattctgcctgtggcctttagaggcgacagcttcaccc acacacctccactggatccccaagagctggatatcctgaaaaccgtgaaaga gattaccggattcctcctgatccaagcctggccagagaacagaaccgatctgc acgccttcgagaacctcgagatcatcagaggccggaccaaacagcacggcc agtttagcctggctgtggtgtctctgaacatcaccagtctgggcctgagaagcc tgaaagaaatctccgacggcgacgtgatcatctccggaaacaagaacctgtg ctacgccaacaccatcaactggaagaagctgttcggcacctccggccagaaa acaaagatcatctctaaccggggcgagaacagctgcaaggccaccggacaa gtttgtcacgccctgtgtagccctgaaggctgttggggacccgaacctagaga ctgtgtgtcctgccggaatgtgtcccggggcagagaatgtgtggataagtgca acctgctggaaggcgagccccgcgagtttgtggaaaacagcgagtgcatcca gtgtcaccccgagtgtctgccccaggccatgaacattacatgcaccggcaga ggccccgacaactgtattcagtgcgcccactacatcgacggccctcactgcgt gaaaacatgtccagctggcgtgatgggagagaacaacaccctcgtgtggaag tatgccgacgccggacatgtgtgccacctgtgtcaccctaattgcacctacggc tgtaccggacctggcctggaaggatgccctacaaacggccctaagatcccca gcattgccaccggaatggttggagccctgctgcttctgttggtggtggccctcg gaatcggcctgttcatgtga	последовательность усеченного EGFR (tEGFR) (nt) (O/SSE)
249	actcctcctctggatccacaggaactggatattctgaaaac	усеченный маркер предсказанный акцепторный сайт

		сплайсинга
250	acagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggac	усеченный маркер предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
251	atggtcagttttctcttgcagtcgtcagcctgaacataaca	усеченный маркер предсказанный акцепторный сайт сплайсинга
252	tcttcatgtgagcgg	усеченный маркер предсказанный донорный сайт сплайсинга
253	aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgtt gctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttc ccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgagg agttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacg caacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactt tcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgccc gctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcg ggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcg cgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcc cgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcag acgagtcggatctccctttgggccgcctccccgc	Посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WHP) (WPRE)
254	tcaattggtacgtgg	предсказанный сайт сплайсинга
255	SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA	Линкер (aa)
256	MRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVA GYLQGPNVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCL SCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENRKQDKRFAFIR SDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNM PDEGVMVTKFYFQEDE	Анакинра
257	RASESVTILGSHLIH	CDR-L1 (Kabat) (aa)
258	LASNVQT	CDR-L2 (Kabat) (aa)
259	LQSRTIPRT	CDR-L3 (Kabat) (aa)
260	DYSIN	CDR-H1 (Kabat) (aa)
261	WINTETREPAYAYDFRG	CDR-H2 (Kabat) (aa)
262	DYSYAMDY	CDR-H3 (Kabat) (aa)
263	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPT LLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEED DVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKP GSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASG YTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPA YAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTAT YFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAATTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD	Анти-BCMA CAR (aa)

	TYDALHMQALPPR	
264	ATGGCACTCCCCGTCACCGCCCTTCTCTTGCCCC TCGCCCTGCTGCTGCATGCTGCCAGGCCCGACA TTGTGCTCACTCAGTCACCTCCCAGCCTGGCCA TGAGCCTGGGAAAAAGGGCCACCATCTCCTGTA GAGCCAGTGAGTCCGTCACAATCTTGGGGAGCC ATCTTATTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGGC AGCCTCCAACCCTTCTTATTCAGCTCGCGTCAA ACGTCCAGACGGGTGTACCTGCCAGATTTTCTG GTAGCGGGTCCCGCACTGATTTTACACTGACCA TAGATCCAGTGGAAGAAGACGATGTGGCCGTG TATTATTGTCTGCAGAGCAGAACGATTCCTCGC ACATTTGGTGGGGGTACTAAGCTGGAGATTAAG GGAAGCACGTCCGGCTCAGGGAAGCCGGGCTC CGGCGAGGGAAGCACGAAGGGGCAAATTCAGC TGGTCCAGAGCGGACCTGAGCTGAAAAAACCC GGCGAGACTGTTAAGATCAGTTGTAAAGCATCT GGCTATACCTTCACCGACTACAGCATAAATTGG GTGAAACGGGCCCCTGGAAAGGGCCTCAAATG GATGGGTTGGATCAATACCGAAACTAGGGAGC CTGCTTATGCATATGACTTCCGCGGGAGATTCG CCTTTTCACTCGAGACATCTGCCTCTACTGCTTA CCTCCAAATAAACAACCTCAAGTATGAAGATAC AGCCACTTACTTTTGCGCCCTCGACTATAGTTA CGCCATGGACTACTGGGGACAGGGAACCTCCG TTACCGTCAGTTCCGCGGCCGCAACCACAACAC CTGCTCCAAGGCCCCCCACACCCGCTCCAACTA TAGCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGACCTGAAG CTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGCGCCGTCCAT ACGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGTGATATTTAT ATTTGGGCCCCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTG TTGCTTCTCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGTA AGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTC AAGCAGCCTTTTATGCGACCTGTGCAAACCACT CAGGAAGAAGATGGGTGTTCATGCCGCTTCCCC GAGGAGGAAGAAGGAGGGTGTGAACTGAGGGT GAAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATA TCAGCAGGGTCAGAATCAGCTCTACAATGAATT GAATCTCGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGTTC TGGACAAGAGACGGGGCAGGGATCCCGAGATG GGGGGAAAGCCCCGGAGAAAAAATCCTCAGGA GGGGTTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGA TGGCTGAAGCCTATAGCGAGATCGGAATGAAA GGCGAAAGACGCAGAGGCAAGGGGCATGACGG TCTGTACCAGGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGA CACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGCCTTGCC ACCCCGCTAATGA	Анти-BCMA CAR (nt)
265	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCEASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREG VICISRSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQ MISLKPEDTAAYYCAAGADCSGYLRDYEFRGQG TQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	EASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVICISRSDGS TYYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMISLKPEDT AAYYCAAGADCSGYLRDYEFRGQGTQVTVSSTS TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	
266	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCEASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREG VICISRSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQ MISLKPEDTAAYYCAAGADCSGYLRDYEFRGQG TQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC EASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVICISRSDGS TYYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMISLKPEDT AAYYCAAGADCSGYLRDYEFRGQGTQVTVSSGG GGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTLDY YAIGWFRQAPGKEREGVICISRSDGSTYYADSVK GRFTISRDNAKKTVYLQMISLKPEDTAAYYCAAG ADCSGYLRDYEFRGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
267	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGRTFTMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYYA ESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYY CAADRKSVMSIRPDYWGQGTQVTVSSTSTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKL LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
268	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVA AISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQM NSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	VTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
269	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQ APGKEREFVAAISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDN AKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIR PDYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQP LSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
270	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVA AISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQM NSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSQVKLEESGGGLVQAGRSL RLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIG WRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSL KPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSS TSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
271	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVA AISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQM NSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
272	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVA AISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQM NSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLEESG GGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAP GKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAK KTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSW GQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
273	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSGGGGSAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCT ASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGG STAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSED TAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSTSTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
274	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSAVQLVESGGGLVQ AGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREF VAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQ VTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
275	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVQ LVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAW	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	FRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTI SRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCASRGIEV EEFGAWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	
276	MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQ AGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREF VAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSQVKLEESGGGLVQAGRSL RLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIG WRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSL KPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSS TSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
277	MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQ AGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREF VAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLEESGGGLVQ AGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERES VAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQ VTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
278	MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQ AGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREF VAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLEESG GGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAP GKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAK KTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSW GQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
279	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGMV QAGDSLRLSCVQSTYTVNSDVMGWFRQAPGKER EFVGAIMWNDGITYLQDSVKGRFTIFRDNAKNTV YLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEYEYWGQ GTQVTVSSGGGGSQVKLEESGGRLVQPRGSLRLS CAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREFVASKASM NYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNMVFLQMNN LKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQIIDYWGK GTLVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
280	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGMV QAGDSLRLSCVQSTYTVNSDVMGWFRQAPGKER EFVGAIMWNDGITYLQDSVKGRFTIFRDNAKNTV YLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEYEYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLEESGGR LVQPRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKE REFVASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNA KNMVFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCF DAQIIDYWGKGTLVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
281	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGMV QAGDSLRLSCVQSTYTVNSDVMGWFRQAPGKER EFVGAIMWNDGITYLQDSVKGRFTIFRDNAKNTV YLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEYEYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS QVKLEESGGRLVQPRGSLRLSCAGSGRTFSTYGM AWFRQAPGKEREFVASKASMNYSGRTYYADSVK GRFTIARDNAKNMVFLQMNNLKPEDTAVYYCAA GTGCSTYGCFDAQIIDYWGKGTLVTVSSTSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
282	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGMV QAGDSLRLSCVQSTYTVNSDVMGWFRQAPGKER	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	EFVGAIMWNDGITYLQDSVKGRFTIFRDNAKNTV YLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEYEYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSQVKLEESGGRLVQPR GSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREFVA SKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNMVF LQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQIID YWGKGTLVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
283	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGMV QAGDSLRLSCVQSTYTVNSDVMGWFRQAPGKER EFVGAIMWNDGITYLQDSVKGRFTIFRDNAKNTV YLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEYEYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLEESGGR LVQPRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKE REFVASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNA KNMVFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCF DAQIIDYWGKGTLVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
284	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGMV QAGDSLRLSCVQSTYTVNSDVMGWFRQAPGKER EFVGAIMWNDGITYLQDSVKGRFTIFRDNAKNTV YLQMNSLKLEDTAVYYCAASKGRYSEYEYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVKLE ESGGRLVQPRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQ APGKEREFVASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIA RDNAKNMVFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCS TYGCFDAQIIDYWGKGTLVTVSSTSTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
285	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGRLVQ PRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREF VASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNM VFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQ IIDYWGKGTLVTVSSGGGGSQVKLEESGGGLVQA GGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERGF VTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
286	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGRLVQ PRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREF VASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNM VFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQ IIDYWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVK LEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAW VRQAPGKERGFVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPIN RNNAENLVVLQMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIM SIQPDYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
287	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGRLVQ PRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREF VASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNM VFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQ IIDYWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSQVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASG GTLSKNTVAWVRQAPGKERGFVTSITCDGRTTYY ANSVNGRFPINRNNAENLVVLQMNSLKPDDTAL YYCAAYRKSIMSIQPDYWGQGTQVTVSSTSTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
288	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGRLVQ PRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREF VASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNM VFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQ IIDYWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVKLEESGG GLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPG KERGFVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAE NLVVLQMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDY WGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
289	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGRLVQ PRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREF VASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNM VFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQ IIDYWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVK LEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAW VRQAPGKERGFVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPIN RNNAENLVVLQMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIM SIQPDYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIAS QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
290	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGRLVQ PRGSLRLSCAGSGRTFSTYGMAWFRQAPGKEREF VASKASMNYSGRTYYADSVKGRFTIARDNAKNM VFLQMNNLKPEDTAVYYCAAGTGCSTYGCFDAQ IIDYWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSQVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKN TVAWVRQAPGKERGFVTSITCDGRTTYYANSVN GRFPINRNNAENLVVLQMNSLKPDDTALYYCAA YRKSIMSIQPDYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
291	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERG FVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSGGGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERGFVASITWDG RTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYCADLGKWPAGPADYWGQGTQVTVSST STTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
292	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERG	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	FVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGL VQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKE RGFVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLKPEDTAVYVCADLGKWPAGPADYW GQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
293	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERG FVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTV AWFRQAPGKERGFVASITWDGRTTYYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYVCADLG KWPAGPADYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
294	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERG FVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQAGG SLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERGFVAS ITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYVCADLGKWPAGPADYWGQGTQ VTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
295	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERG FVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGL VQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKE RGFVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNSLKPEDTAVYVCADLGKWPAGPADYW	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	GQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
296	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERG FVTSITCDGRTTYYANSVNGRFPINRNNAENLVVL QMNSLKPDDTALYYCAAYRKSIMSIQPDYWGQG TQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVE SGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQ APGKERGFVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYVCADLGKWPAG PADYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
297	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERG FVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYVCADLGKWPAGPADYWGQ GTQVTVSSGGGGSDVQLVESGGGLVQAGGSLRL SCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERGFVTSITCD GRTTYYANSVKGRFPISRDNAENTVYLQMNSLKP EDTAGYVCADLGKWPAGSADYWGQGTHVTVSS TSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
298	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERG FVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYVCADLGKWPAGPADYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGG LVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGK ERGFVTSITCDGRTTYYANSVKGRFPISRDNAENT VYLQMNSLKPEDTAGYVCADLGKWPAGSADYW GQGTHVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
299	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERG FVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCADLGKWPAGPADYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNT VAWVRQAPGKERGFVTSITCDGRTTYYANSVKG RFPISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAGYVCADLG KWPAGSADYWGQGTHVTVSSTSTTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSR SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
300	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERG FVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCADLGKWPAGPADYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSDVQLVESGGGLVQAG GSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGKERGFV TSITCDGRTTYYANSVKGRFPISRDNAENTVYLQ MNSLKPEDTAGYVCADLGKWPAGSADYWGQGT HVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
301	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERG FVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCADLGKWPAGPADYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLVESGGG LVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVRQAPGK ERGFVTSITCDGRTTYYANSVKGRFPISRDNAENT VYLQMNSLKPEDTAGYVCADLGKWPAGSADYW GQGTHVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)
302	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQ AGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWFRQAPGKERG FVASITWDGRTTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCADLGKWPAGPADYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVQLV	Мультивалентный анти-BCMA CAR (aa)

	ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSKNTVAWVR QAPGKERGFVTSITCDGRTTYYANSVKGRFPISRD NAENTVYLQMNSLKPEDTAGYVCADLGKWPAG SADYWGQGTHVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR	
303	MLQMAGQCSQ	BCMA эпитоп
304	CSQNEYFDSLLHAC	BCMA эпитоп
305	NEYFDSLLHACIP	BCMA эпитоп
306	ACIPCQLRCSS	BCMA эпитоп
307	CQLRCSSNTPPLTCQRYCN	BCMA эпитоп
308	LTCQRYCNAS	BCMA эпитоп
309	ASVTNSVKGTNA	BCMA эпитоп
310	MALPVTALLLPLALLLHAARPMLPAPKNLVVSRI TEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWL DVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVVITGVKGGRFSSP LVASFTTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Анти-BCMA Центирин CAR (aa)
311	MALPVTALLLPLALLLHAARP	Сигнальная последовательность
312	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLI HWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELK KPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLK WMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAY LQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSV TVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	Анти-BCMA CAR (aa)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включающий введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

2. Способ лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включающий:

введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и

введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток.

3. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере двух доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и по меньшей мере одну дозу IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

4. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, которому была введена по меньшей мере одна доза антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток; и введение по меньшей мере одной дозы IL-1Ra, которую вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую

до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 21, 18, 15 или 12 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере одна доза IL-Ra, вводимая до введения дозы сконструированных Т-клеток, включает по меньшей мере две дозы IL-1Ra, вводимые до введения дозы сконструированных Т-клеток.

7. Способ по п. 6, где одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra, вводимых до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 6, 5, 4, 3 или 2 часов до введения дозы сконструированных Т-клеток.

8. Способ по п. 6 или 7, где одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra, вводимых до введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

9. Способ по любому из пп. 6-8, где одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток и одну дозу из по меньшей мере двух доз IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает 3, 4, 5, 6 или 7 доз IL-1Ra, вводимых после введения дозы сконструированных Т-клеток.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, включает 4 дозы IL-1Ra, вводимые после введения дозы сконструированных Т-клеток.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где по меньшей мере одну дозу IL-1Ra, вводимую после введения дозы сконструированных Т-клеток, вводят каждый день в течение нескольких дней подряд.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где по меньшей мере одна доза IL-1Ra, вводимая после введения дозы сконструированных Т-клеток, представляет собой 4 дозы, где одну из четырех доз вводят каждый день в течение 4 дней подряд после введения дозы сконструированных Т-клеток.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где дозу IL-1Ra вводят через каждые 24 часа (q24h) в Дни 2-5.

16. Способ уменьшения тяжести, облегчения и/или предотвращения появления токсичности у субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), подлежащее лечению клеточной терапией, при этом способ включает введение субъекту по меньшей мере 6 доз антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra) и клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, где клеточную терапию

вводят в День 1 и:

(a) одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 24 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток, необязательно за ночь до введения дозы сконструированных Т-клеток;

(b) одну дозу IL-1Ra вводят в пределах или примерно за 3 часа до введения дозы сконструированных Т-клеток в День 1;

(c) четыре дозы IL-1Ra вводят после введения дозы сконструированных Т-клеток, при этом одну дозу из четырех доз вводят каждый день в Дни 2, 3, 4 и 5.

17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий введение по меньшей мере одной дополнительной дозы IL-1Ra после введения дозы сконструированных Т-клеток, если субъект демонстрирует симптомы или признаки синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

18. Способ по п. 17, где по меньшей мере одна дополнительная доза IL-1Ra включает введение по меньшей мере одной дополнительной дозы IL-1Ra каждый день в течение нескольких дней подряд вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

19. Способ по п. 18, где по меньшей мере одна дополнительная доза IL-1Ra представляет собой одну дополнительную дозу, которую вводят каждый день в течение нескольких дней подряд вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

20. Способ по любому из пп. 13-19, где, если субъект демонстрирует симптомы или признаки синдрома высвобождения цитокинов (CRS), дозу IL-1Ra вводят через каждые 12 часов (q12h) вплоть до исчезновения симптомов или признаков CRS.

21. Способ по любому из пп. 13-20, где введение IL-1Ra каждый день осуществляют в одно и тоже или примерно в одно и тоже время каждый день.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где IL-1Ra представляет собой рекомбинантный IL-1Ra.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где IL-1Ra включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:256, или последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокую идентичность последовательности с SEQ ID NO:256, которая сохраняет функцию как у IL-1Ra.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где IL-1Ra представляет собой анакинру.

25. Способ по любому из пп. 1-24, где каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 500 мг, на уровне или около 400 мг, на уровне или около 300 мг, на уровне или около 200 мг, на уровне или около 100 мг или на уровне или около 50 мг, или в пределах, определяемых любыми из вышеуказанных, необязательно где каждая доза рекомбинантного IL-1Ra составляет от или от около 50 мг до или до около 200 мг.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где каждая доза IL-1Ra находится на уровне или около 100 мг.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где IL-1Ra вводят подкожно.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где способ уменьшает тяжесть, облегчает и/или предотвращает возникновение токсичности, связанной с введением клеточной терапии.

29. Способ по любому из пп. 3-28, где токсичность представляет собой синдром высвобождения цитокинов (CRS).

30. Способ по п. 29, где CRS представляет собой тяжелый CRS или CRS 3 или более высокой степени.

31. Способ по любому из пп. 3-28, где токсичность представляет собой нейротоксичность (NT).

32. Способ по п. 31, где NT представляет собой тяжелую NT, или NT 2 или более высокой степени, или NT 3 или более высокой степени.

33. Способ по любому из пп. 3-28, где токсичность представляет собой синдром активации макрофагов (MAS) или гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH).

34. Способ по любому из пп. 1-33, где на момент или до введения дозы сконструированных Т-клеток субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из:

предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR, специфический в отношении BCMA;

предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и

предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

35. Способ лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включающий введение субъекту клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, при этом на момент или до введения дозы сконструированных Т-клеток, субъект получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из:

предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR, специфический в отношении BCMA;

предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и

предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

36. Способ лечения субъекта, который имеет или у которого подозревается заболевание или расстройство, связанное с экспрессией В-клеточного антигена созревания (BCMA), включающий введение субъекту клеточной терапии, включающей дозу сконструированных Т-клеток, включающих первый химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении BCMA, субъекту, который предварительно получил одну или более предшествующих BCMA-направленных терапий, выбранных из:

предшествующей дозы сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR, специфический в отношении BCMA;

предшествующего введения BCMA-направленного рекрутера Т-клеток (TCE); и

предшествующего введения BCMA-направленного конъюгата антитело-

лекарственное средство (ADC).

37. Способ по любому из пп. 34-36, где субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий.

38. Способ по любому из пп. 34-37, где субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 1 год до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

39. Способ по любому из пп. 34-38, где субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 6 месяцев до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

40. Способ по любому из пп. 34-39, где субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более предшествующих BCMA-направленных терапий в пределах или примерно за 3 месяца до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR.

41. Способ по любому из пп. 34-40, где BCMA-направленный TCE представляет собой или включает биспецифическое антитело или биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE).

42. Способ по любому из пп. 34-41, где BCMA-направленный TCE выбран из одного или более из AMG 420/BI 836909, AMG 701, CC-93269, JNJ-64007957, PF-06863135 и REGN5458.

43. Способ по любому из пп. 34-42, где BCMA-направленный ADC выбран из одного или более из Белантамаба мафодотина (GSK2857916), MEDI2228, CC-99712 и AMG 224.

44. Способ по любому из пп. 1-43, где первый CAR включает внеклеточный антигенсвязывающий домен, включающий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 116, и вариабельную область легкой цепи(V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 119;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:97, 101 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и 108, соответственно;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:96, 100 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO:105, 107 и

108, соответственно;

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:95, 99 и 103, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 105, 107 и 108, соответственно; и/или

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO:94, 98 и 102, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 104, 106 и 108, соответственно.

45. Способ по п. 44, где V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119.

46. Способ по п. 44 или п. 45, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114.

47. Способ по любому из пп. 44-46, где нуклеиновая кислота, кодирующая внеклеточный антигенсвязывающий домен, включает (a) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:113; (b) последовательность нуклеотидов, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с вышеуказанной последовательностью; (c) вырожденную последовательность (a) или (b); и/или (d) последовательность нуклеотидов SEQ ID NO:115.

48. Способ по любому из пп. 1-47, где первый CAR включает:

(a) спейсер, включающий химерный шарнир IgG4/2 или модифицированный шарнир IgG4; химерную C_H2 область IgG2/4; и C_H3 область IgG4, который необязательно имеет длину около 228 аминокислот; или спейсер, представленный в SEQ ID NO: 174;

(b) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен из человеческого CD28; и

(c) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток или его сигнальную часть.

49. Способ по любому из пп. 44-48, где трансмембранный домен представляет собой или включает трансмембранный домен из человеческого CD28.

50. Способ по любому из пп. 44-49, где трансмембранный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:138, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:138.

51. Способ по любому из пп. 1-43, где первый CAR включает внеклеточный

антигенсвязывающий домен, включающий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 125, и вариабельную область легкой цепи(V_L), включающую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащиеся в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 127; и/или

V_H, включающую последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, представленные в SEQ ID NO: 260, 261 и 262, соответственно, и V_L, включающую последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в SEQ ID NO: 257, 258 и 259, соответственно.

52. Способ по п. 51, где V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125; и V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127.

53. Способ по любому из пп. 51 или п. 52, где внеклеточный антигенсвязывающий домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 128.

54. Способ по любому из пп. 1-43 и 51-53, где первый CAR включает

(a) спейсер, включающий шарнирную область CD8;

(b) трансмембранный домен, необязательно трансмембранный домен из человеческого CD8; и

(c) внутриклеточную сигнальную область, включающую цитоплазматический сигнальный домен CD3-зета (CD3ζ) цепи, и костимулирующую сигнальную область, включающую внутриклеточный сигнальный домен костимулирующей молекулы Т-клеток или его сигнальную часть.

55. Способ по любому из пп. 44-54, где цитоплазматический сигнальный домен представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:143, или последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с SEQ ID NO:143.

56. Способ по любому из пп. 44-59, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен CD28, 4-1BB или ICOS, или его сигнальную часть.

57. Способ по любому из пп. 44-56, где костимулирующая сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB, необязательно человеческого 4-1BB.

58. Способ по любому из пп. 44-57, где костимулирующая сигнальная область представляет собой или включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, или

последовательность аминокислот, которая имеет идентичность последовательности по меньшей мере 90% с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4.

59. Способ по любому из пп. 44-58, где костимулирующая сигнальная область находится между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CD3-зета (CD3ζ) цепи.

60. Способ по любому из пп. 1-50 и 55-59, где первый CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:19.

61. Способ по любому из пп. 1-43 и 51-59, где первый CAR включает последовательность, представленную в SEQ ID NO:312.

62. Способ по любому из пп. 34-61, где первый CAR и второй CAR связываются с одним и тем же эпитопом BCMA.

63. Способ по любому из пп. 34-61, где первый CAR и второй CAR связываются с разными эпитопами BCMA.

64. Способ по любому из пп. 34-63, где первый CAR и второй CAR являются разными.

65. Способ по любому из пп. 34-62, где первый CAR и второй CAR являются одинаковыми.

66. Способ по любому из пп. 34-65, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, получена из образца, включающего Т-клетки, полученные от того же субъекта, который ранее получил предварительную дозу сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR.

67. Способ по любому из пп. 34-66, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, получена из образца, включающего Т-клетки, полученные от субъекта после того, как субъект уже получил предварительную дозу сконструированных Т-клеток, включающих второй CAR.

68. Способ по любому из пп. 44-67, где связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена и/или первого CAR, или показатель, указывающий на функцию или активность первого CAR после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется или по существу не снижается или не блокируется в присутстви растворимой или слущенной формы BCMA.

69. Способ по любому из пп. 1-68, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает от или от около 1×10^7 CAR+ Т-клеток до или до около 1×10^9 CAR+ Т-клеток.

70. Способ по любому из пп. 1-69, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает от или от около 1×10^8 CAR+ Т-клеток до или до около 8×10^8 CAR+ Т-клеток.

71. Способ по любому из пп. 1-70, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает количество равное или около $1{,}5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток.

72. Способ по любому из пп. 1-70, где доза сконструированных Т-клеток,

включающих первый CAR, включает количество равное или около 3×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток.

73. Способ по любому из пп. 1-70, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает количество равное или около $4,5\times10^8$ клеток или CAR+ Т-клеток.

74. Способ по любому из пп. 1-70, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает количество равное или около 6×10^8 клеток или CAR+ Т-клеток.

75. Способ по любому из пп. 1-74, где доза сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, включает комбинацию $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток, необязательно $CD4^+$ CAR+ Т-клеток и $CD8^+$ CAR+ Т-клеток.

76. Способ по любому из пп. 1-75, где до введения дозы сконструированных Т-клеток, включающих первый CAR, субъект получил лимфодеплеционную терапию, включающую введение флударабина при или примерно при 20-40 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно при или примерно при 30 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней, и/или циклофосфамида при или примерно при 200-400 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, необязательно при или примерно при 300 мг/м^2, ежедневно в течение 2-4 дней.

77. Способ по п. 76, где лимфодеплеционная терапия включает введение флударабина при или примерно при 30 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта и циклофосфамида при или примерно при 300 мг/м^2 площади поверхности тела субъекта, с введением каждого ежедневно в течение 3 дней.

78. Способ по любому из пп. 1-77, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA, представляет собой аутоиммунное заболевание или расстройство.

79. Способ по любому из пп. 1-78, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией BCMA, представляет собой рак, необязательно BCMA-экспрессирующий рак.

80. Способ по п. 79, где рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

81. Способ по п. 79 или п. 80, где рак представляет собой лимфому, лейкоз или злокачественное новообразование из плазматических клеток.

82. Способ по любому из пп. 79-81, где рак представляет собой лимфому, и лимфома представляет собой лимфому Беркита, неходжкинскую лимфому (NHL), лимфому Ходжкина, макроглобулинемию Вальденстрема, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфому с нерассеченными ядрами, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому маргинальной зоны, лимфому селезенки, узловую моноцитоидную В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, крупноклеточную лимфому, диффузную смешанно-клеточную лимфому, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому (LPL) или лимфому из клеток мантийной зоны (MCL).

83. Способ по любому из пп. 79-81, где рак представляет собой лейкоз, и лейкоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лейкоз плазматических клеток или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

84. Способ по любому из пп. 79-81, где рак представляет собой злокачественное новообразование из плазматических клеток, и злокачественное новообразование из плазматических клеток представляет собой множественную миелому (MM) или плазмоцитому.

85. Способ по любому из пп. 79-81 и 84, где рак представляет собой множественную миелому (MM), необязательно рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому (R/R MM).

86. Способ по любому из пп. 1-85, где субъект получил три или более предшествующих терапий для лечения заболевания или расстройства, необязательно четыре или более предшествующих терапий, необязательно выбранных из:

аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT);

иммуномодулирующего средства;

ингибитора протеасом; и

анти-CD38 антитела.

87. Способ по п. 86, где иммуномодулирующее средство выбрано из талидомида, леналидомида и помалидомида.

88. Способ по п. 86 или п. 87, где ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба.

89. Способ по любому из пп. 86-88, где анти-CD38 антитело представляет собой или включает даратумумаб.

90. Способ по любому из пп. 1-89, где субъект получил от 3 до 15 или от 4 до 15 предшествующих терапий или около 10 предшествующих терапий.

91. Способ по любому из пп. 86-90, субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более из 3 или более предшествующих терапий.

92. Способ по любому из пп. 86-91, где субъект имел рецидив после или был невосприимчив к одной или более 3 или по меньшей мере 4 из 3 или более предшествующих терапий.

93. Способ по п. 91 или п. 92, где субъект был невосприимчив или не отвечал на бортезомиб, карфилзомиб, леналидомид, помалидомид и/или анти-CD38 моноклональное антитело.

94. Способ по любому из пп. 1-93, где субъект имел предшествующую аутологичную трансплантацию стволовых клеток.

95. Способ по любому из пп. 1-93, где субъект не имел предшествующую аутологичную трансплантацию стволовых клеток.

96. Способ по любому из пп. 1-95, где субъект не имеет активный, или не имеет в анамнезе, лейкоз плазматических клеток (PCL).

97. Способ по любому из пп. 1-96, где у субъекта развился вторичный лейкоз

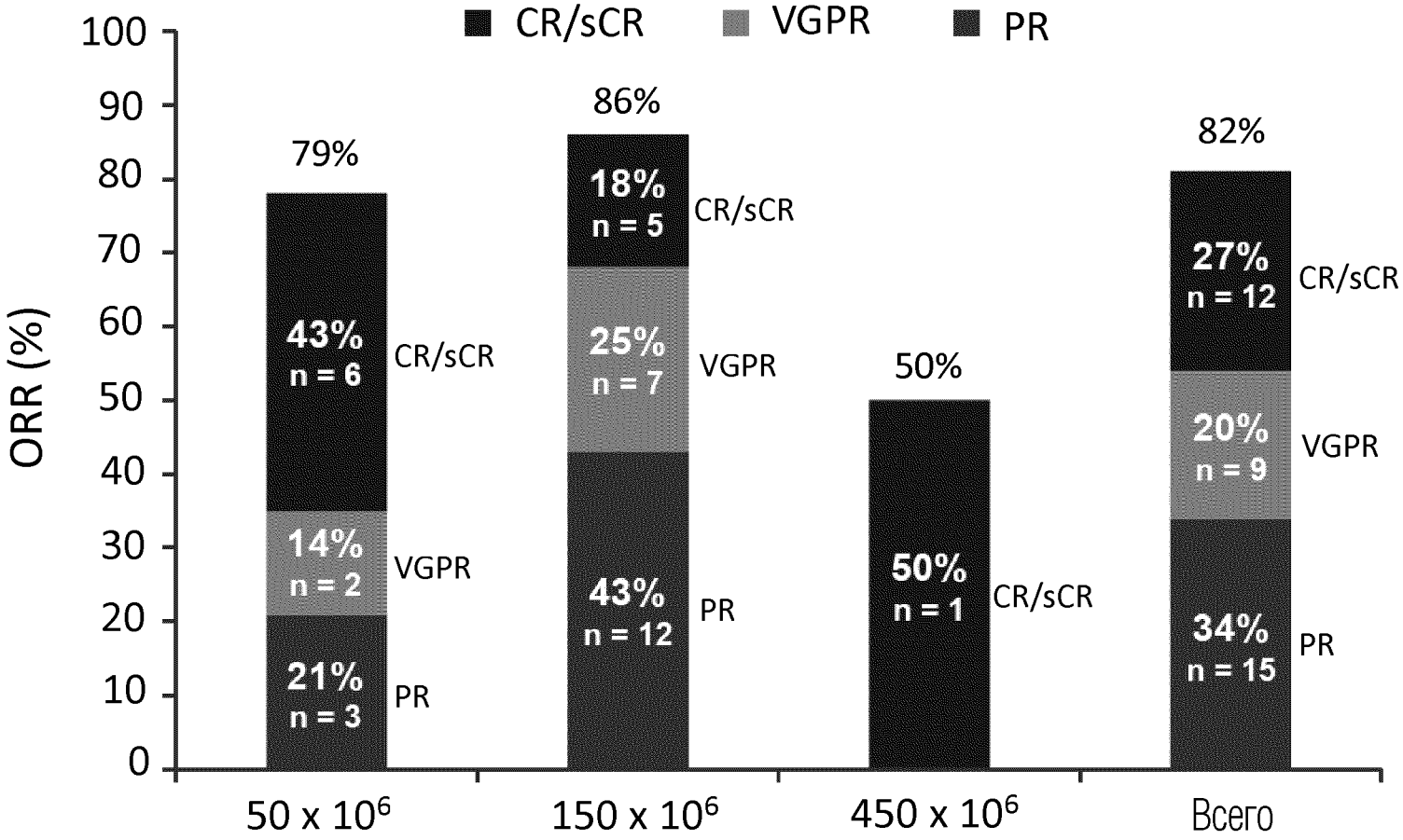
плазматических клеток (PCL).

98. Способ по любому из пп. 1-97, где субъект представляет собой взрослого субъекта или субъекта возраста 25 или 35 лет или старше.

99. Способ по любому из пп. 1-98, где после диагностирования заболевания или расстройства у субъекта прошло приблизительно 4 года, или от 2 и 15 лет, или от 2 до 12 лет.

100. Способ по любому из пп. 1-99, где субъект имеет высокий цитогенетический риск согласно IMWG.

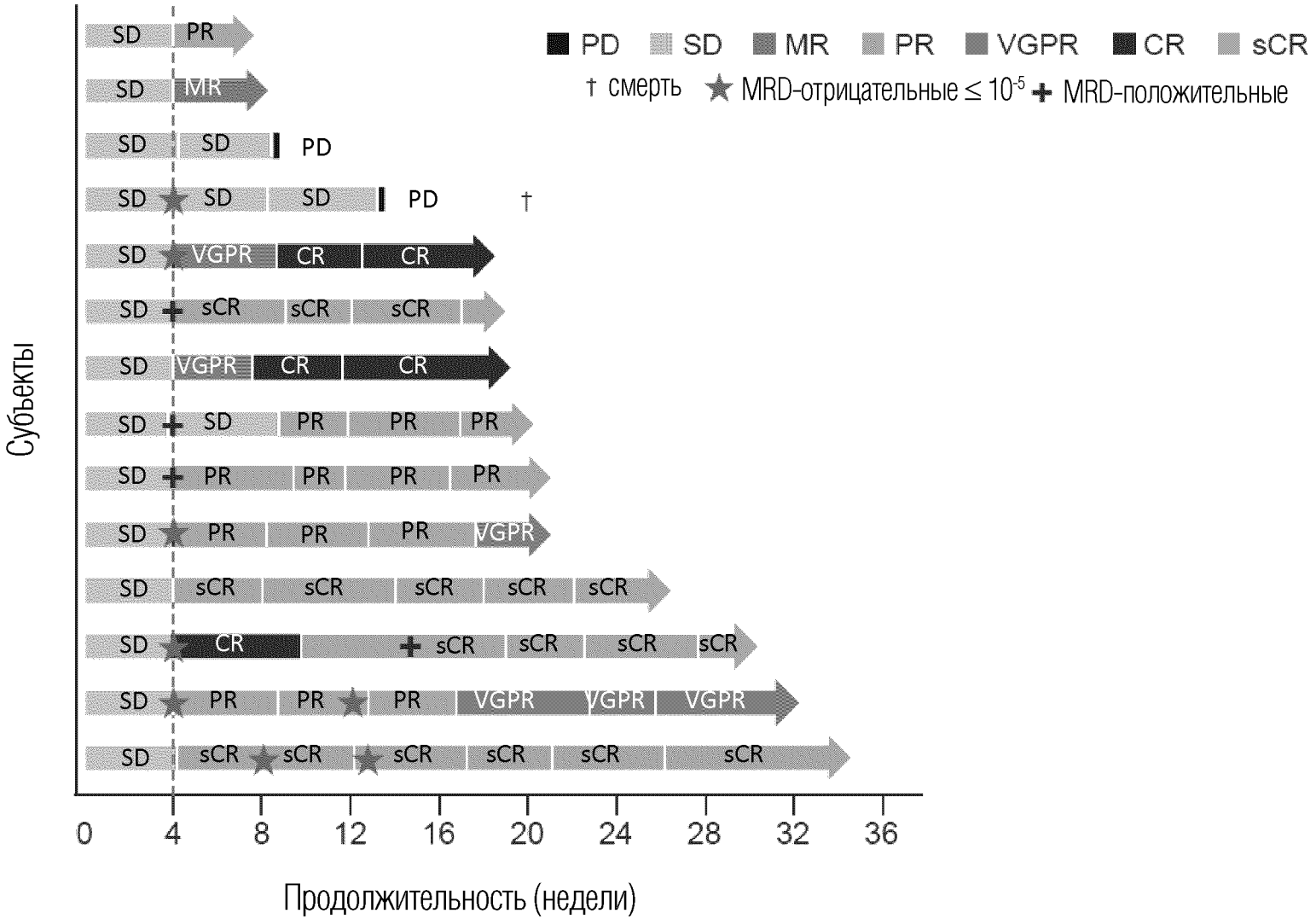
ФИГ. 1



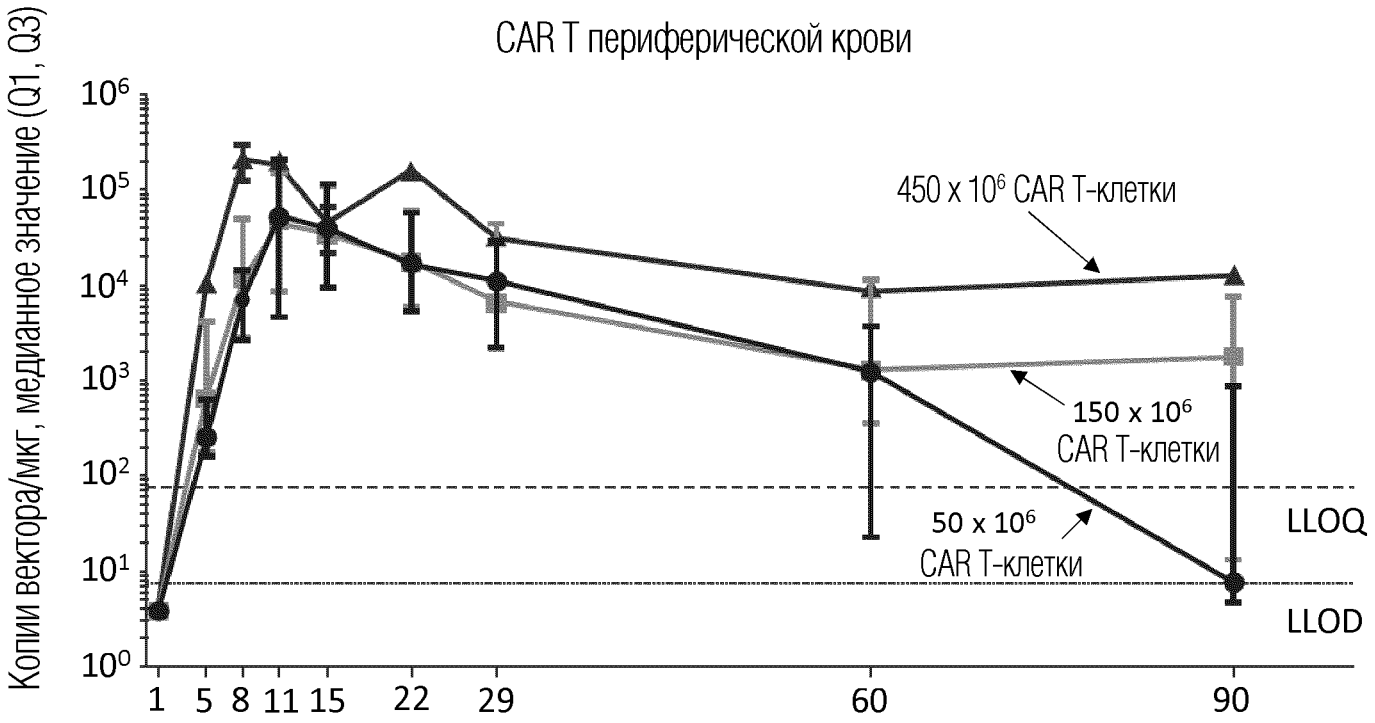
Последующее наблюдение (медиана; недели)	17	9	7	11
субъекты (n)	14	29	2[b]	44

5761157

ФИГ. 2

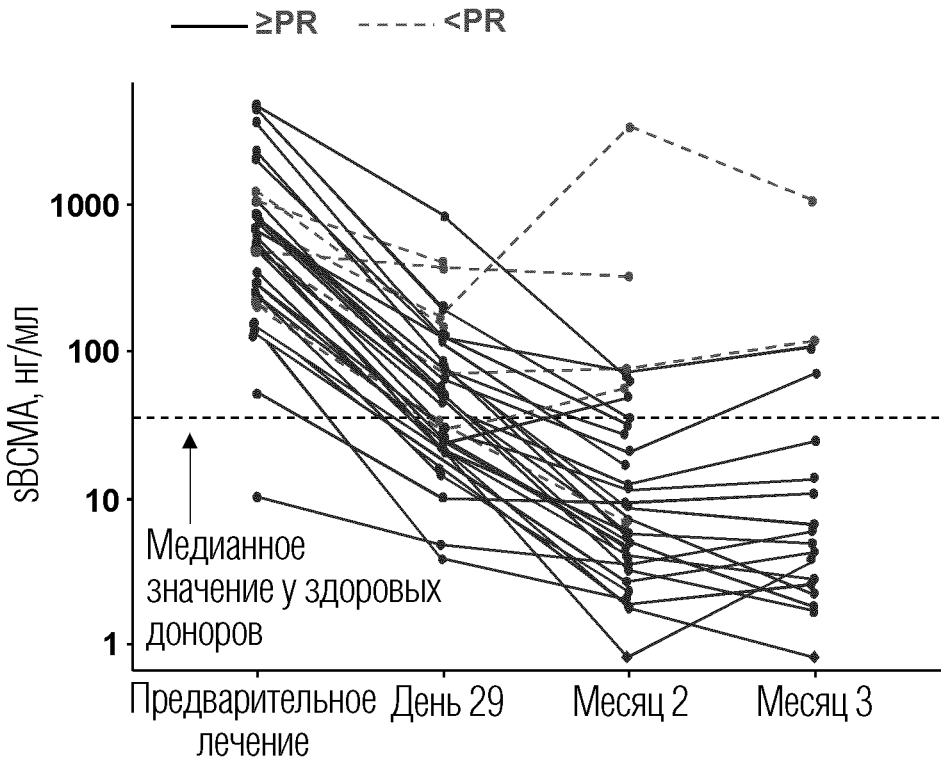

PD
SD
MR
PR
VGPR
CR
sCR
† смерть
MRD-отрицательные ≤ 10-5
MRD-положительные
Субъекты
Продолжительность (недели)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36

ФИГ. 3

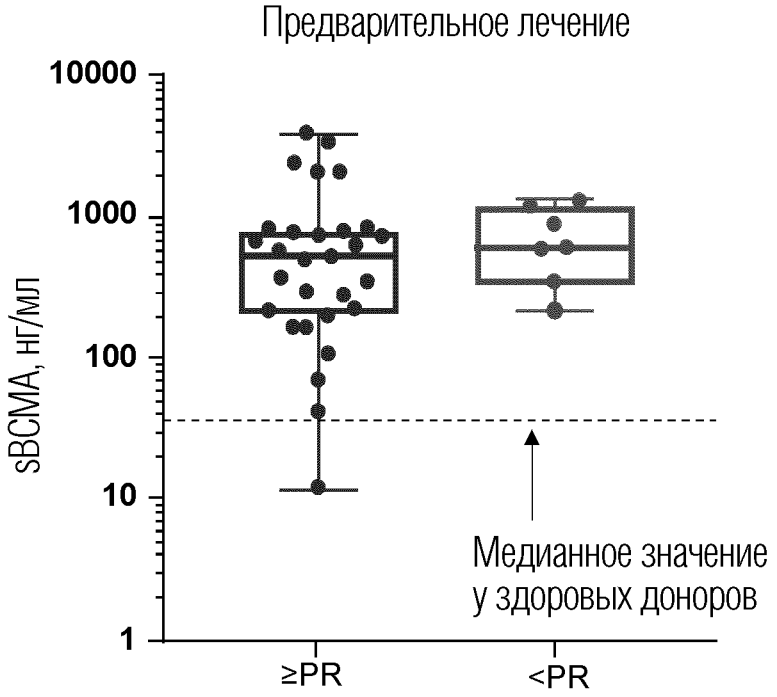


Количество образцов									
50 x 10^6 CAR T-клетки	14	12	14	14	13	14	14	12	11
150 x 10^6 CAR T-клетки	28	24	26	26	28	28	27	19	9
450 x 10^6 CAR T-клетки	2	1	2	1	2	1	1	1	1

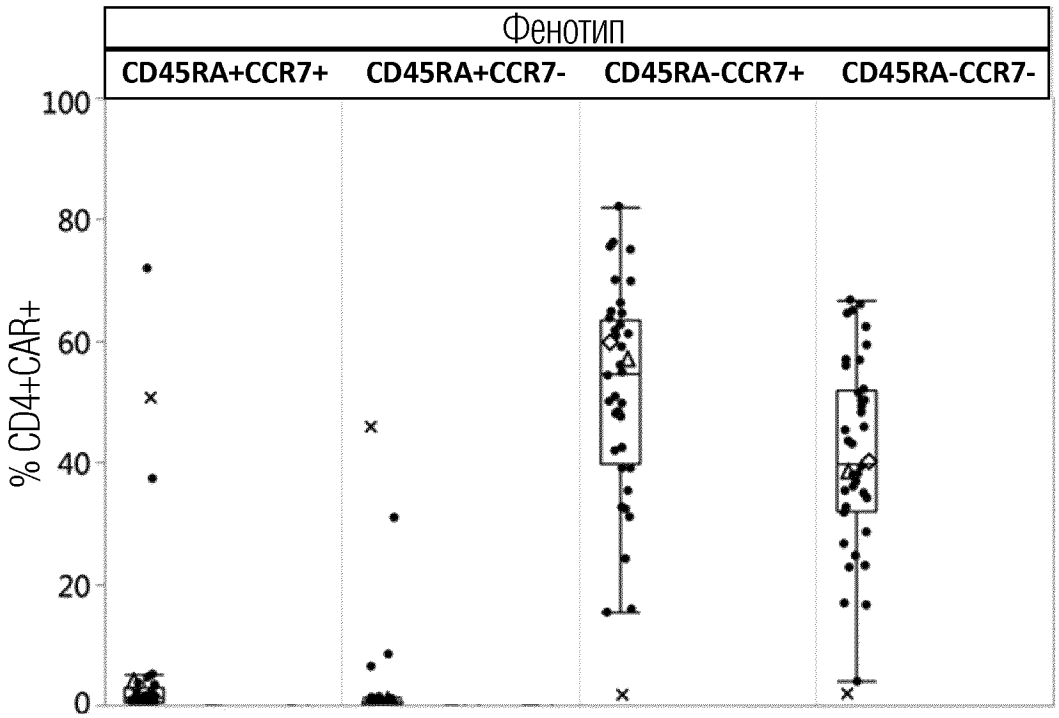
ФИГ. 4А


≥PR
<PR
sBCMA, нг/мл
1000
100
10
1
Медианное значение у здоровых доноров
Предварительное лечение
День 29
Месяц 2
Месяц 3

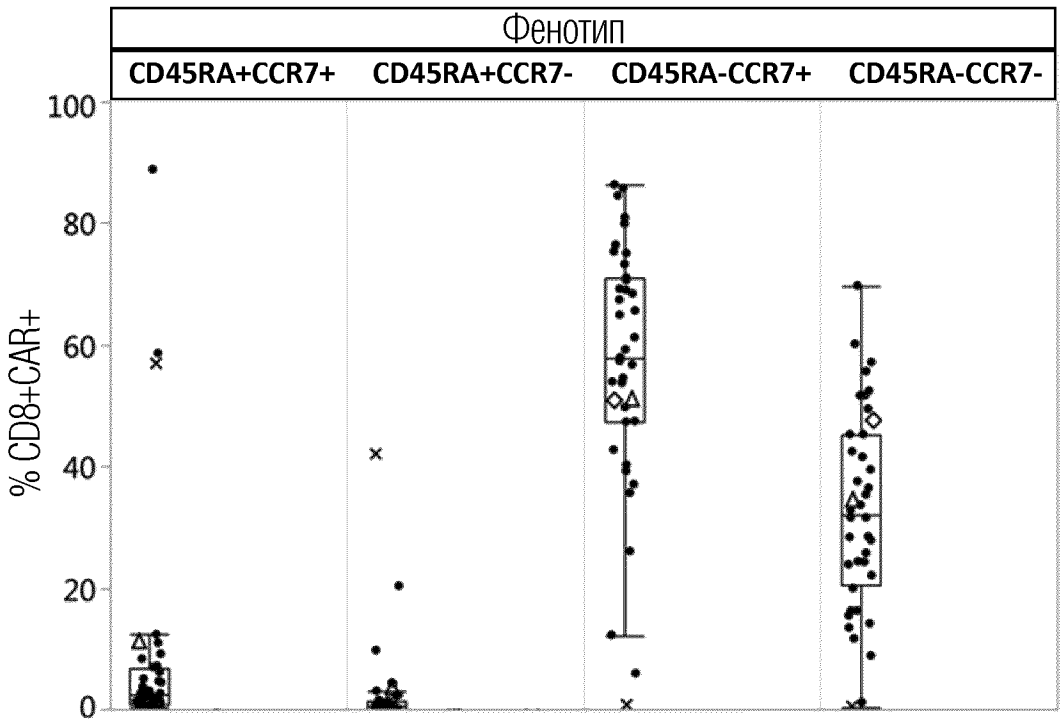
ФИГ. 4В


Предварительное лечение
sBCMA, нг/мл
10000
1000
100
10
1
Медианное значение у здоровых доноров
≥PR
<PR

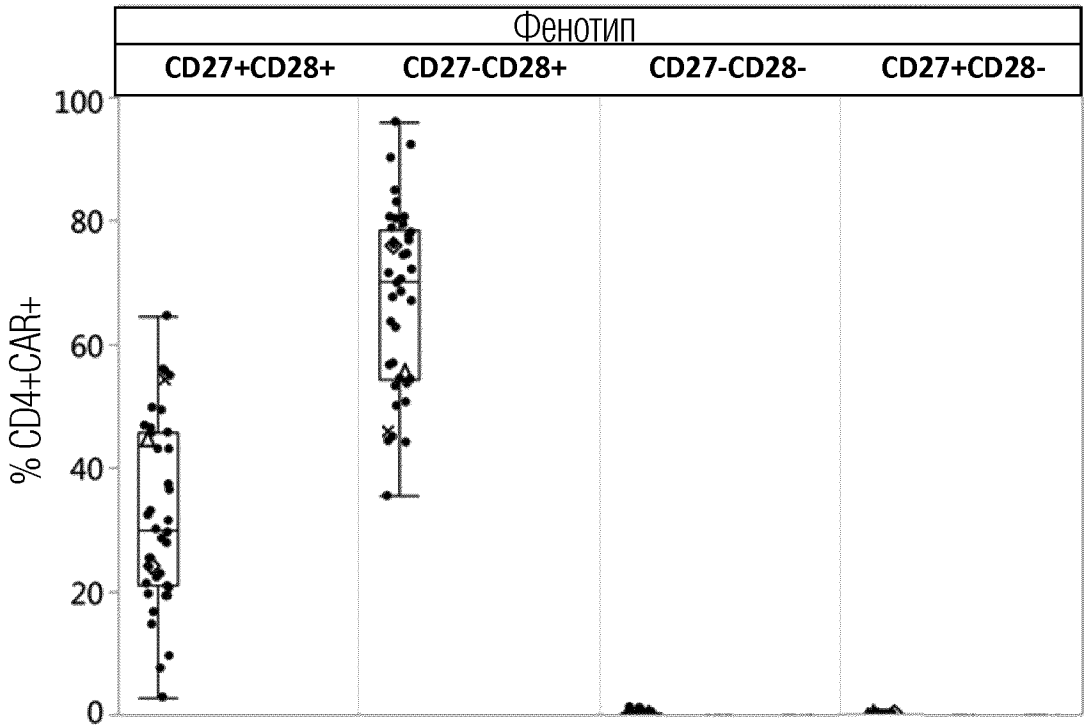
ФИГ. 5A


Фенотип
CD45RA+CCR7+
CD45RA+CCR7-
CD45RA-CCR7+
CD45RA-CCR7-
% CD4+CAR+
100
80
60
40
20
0

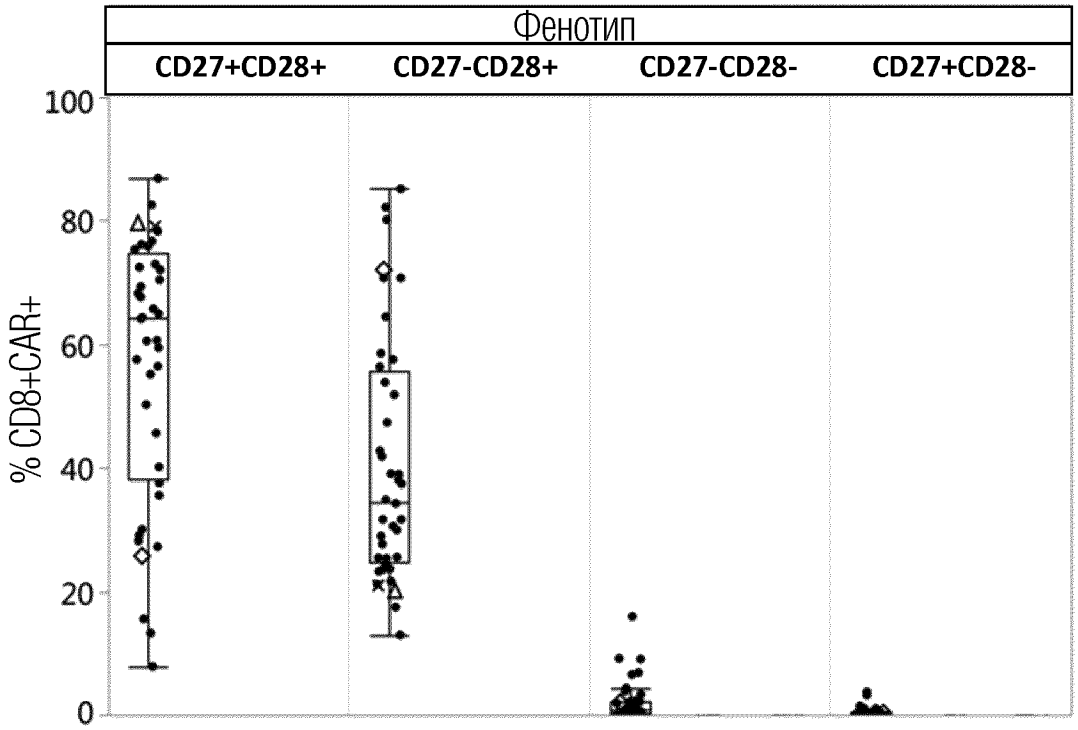
ФИГ. 5B


Фенотип
CD45RA+CCR7+
CD45RA+CCR7-
CD45RA-CCR7+
CD45RA-CCR7-
% CD8+CAR+
100
80
60
40
20
0

ФИГ. 5C


Фенотип
CD27+CD28+
CD27-CD28+
CD27-CD28-
CD27+CD28-
% CD4+CAR+
100
80
60
40
20
0

ФИГ. 5D


Фенотип
CD27+CD28+
CD27-CD28+
CD27-CD28-
CD27+CD28-
% CD8+CAR+
100
80
60
40
20
0