

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 028988

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2018.01.31

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)

(21) Номер заявки

201590216

(22) Дата подачи заявки

2013.07.12

---

### (54) СПОСОБ IN VITRO АНАЛИЗА КУЛЬТУРЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

---

(31) 61/671,495

(56) US-A1-20060246548

(32) 2012.07.13

WO-A2-2003013598

(33) US

GONZALEZ et al. "Genetic engineering of cytolytic T lymphocytes for adoptive T-cell therapy of neuroblastoma". The Journal of Gene Medicine, 05 May 2004 (05.05.2004). Vol. 6, Pgs. 704-711, entire document

(43) 2015.04.30

(86) PCT/US2013/050287

(87) WO 2014/011996 2014.01.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:

Джун Карл Х., Левин Брюс Л., Кейлос  
Майкл Д. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

028988  
B1

(57) Изобретение относится к анализу супернатантов векторов пригодных для трансдукции Т-клеток, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком. Изобретение также относится к способам анализа трансдуктированных Т-клеток, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком. Изобретение относится к способу анализа генетически модифицированной Т-клетки для детекции загрязнения, где генетически модифицированная Т-клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления загрязнение представляет собой, по меньшей мере, загрязнение, выбранное из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компонента репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, HN-gag, остаточных гранул, покрытых антителами против CD3/CD28, антител мыши, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов среды для культивирования, компонентов упаковывающих вектор клеток или плазмиды, бактерии и грибов.

B1

028988

**Указание касательно финансируемого из федерального бюджета исследования или разработки**

Настоящее изобретение было выполнено при поддержке правительства в соответствии с номерами грантов K24 CA11787901, 1PN2-EY016586, 1R01CA105216, 1R01CA120409, R01AI057838 и R01113482, предоставленными Национальными институтами здравоохранения (NIH). Правительство обладает определенными правами на изобретение.

**Перекрестная ссылка на родственную заявку**

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/671495, зарегистрированной 13 июля 2012 года, содержание которой, таким образом, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

**Уровень техники, предшествующий изобретению**

Подавляющее большинство пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями, включая хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), умирают от своих заболеваний. Один из подходов лечения таких пациентов заключается в генетической модификации Т-клеток для направленного воздействия на антигены, экспрессируемые на опухолевых клетках, посредством экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR). CAR представляют собой антигенные рецепторы, которые конструируют для распознавания антигенов клеточной поверхности независящим от лейкоцитарного антигена человека образом. Попытки применения генетически модифицированных клеток, экспрессирующих CAR, для лечения таких типов пациентов увенчались лишь ограниченным успехом. См., например, Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668; Morgan et al., 2010, Molecular Therapy, published online February 23, 2010, pages 1-9; и Till et al., 2008, Blood, 112:2261-2271.

Несмотря на то, что CAR могут инициировать активацию Т-клеток способом, аналогичным эндогенному Т-клеточному рецептору, главное препятствие для клинического применения этой технологии до настоящего времени было ограничено экспансией *in vivo* CAR+ Т-клеток, быстрым исчезновением клеток после инфузии и не оправдывающей надежд клинической активностью (Jena et al., Blood, 2010, 116:1035-1044; Uckun et al., Blood, 1988, 71:13-29). Способы получения генетически модифицированных Т-клеток для введения людям ограничены вероятностью получения нежелательных загрязнений, которые могут отрицательно влиять на жизнестойкость и функцию генетически модифицированных Т-клеток после введения.

Таким образом, в данной области существует необходимость анализа трансдуцированных Т-клеток в отношении их пригодности для введения индивидууму, являющемуся человеком, посредством детекции загрязнений, которые могут отрицательно влиять на жизнестойкость и функцию генетически модифицированных клеток. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность.

**Сущность изобретения**

Изобретение относится к способу анализа генетически модифицированной Т-клетки для детекции загрязнения, где генетически модифицированная Т-клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную Т-клетку генетически модифицировали посредством трансдукции лентивирусным вектором.

В одном из вариантов осуществления загрязнение представляет собой, по меньшей мере, загрязнение, выбранное из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компонента репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, ВИЧ-gag, остаточных гранул, покрытых антителами против CD3/CD28, антител мыши, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, сыворотки крупного рогатого скота, компонентов среды для культивирования, компонентов клетки, упаковывающей вектор, или плазмида, бактерии и гриба.

В одном из вариантов осуществления бактерия представляет собой, по меньшей мере, бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes*, *faecalis* *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы А.

В одном из вариантов осуществления сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен связывается с опухолевым антигеном.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген ассоциирован с гематологическим злокачественным новообразованием.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген ассоциирован с солидной опухолью.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелина, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипида F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-

1 TCR, MAGE A3 TCR и любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления костимуляторная сигнальная область содержит внутриклеточный домен костимуляторной молекулы, выбранный из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированный антигена лимфоцита 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, который специфически связывается с CD83, и любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную Т-клетку не вводят являющемуся человеком индивидууму вследствие идентификации и количественного определения загрязнения.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную Т-клетку не вводят являющемуся человеком индивидууму, т.к. количество загрязнения является избыточным по сравнению с соответствующим контрольным уровнем.

#### Краткое описание чертежей

Следующее ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет более понятно при прочтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. С целью иллюстрации изобретения в чертежах продемонстрированы варианты осуществления, которые являются предпочтительными в настоящее время. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено точными условиями и средствами вариантов осуществления, продемонстрированных на чертежах.

Фиг. 1, содержащая фиг. 1A-1B, представляет собой серию изображений схематических представлений вектора для переноса генов и трансгена, получения генномодифицированных Т-клеток и план клинического протокола. На фиг. 1A проиллюстрированы лентивирусные векторы и трансген, показаны главные функциональные элементы. Получали лентивирусный вектор, псевдотипированный белком G вируса везикулярного стоматита, клинического применения (обозначаемый как pELPs 19BBZ), регулирующий экспрессию scFv против CD19, получаемого из моноклонального антитела мыши FMC63, шарнирного и трансмембранных домена CD8 $\alpha$  человека и сигнальных доменов 4-1BB и CD3-дзета человека. Конститутивную экспрессию трансгена регулировали включением EF-1 $\alpha$  (промотора фактора элонгации-1 $\alpha$ ); LTR, длинного концевого повтора; RRE, rev-чувствительного элемента, (CPPT) и центральной последовательности терминации (CTS). Фигура не масштабирована. На фиг. 1B проиллюстрировано получение Т-клеток. Аутологичные клетки получали аферезом и для исследования индивидуумов, не страдающих CLL, обогащали Т-клетки элютриацией мононуклеарных клеток. Для индивидуумов, страдающих CLL, остаточные лейкозные клетки удаляли добавлением парамагнитных гранул, покрытых антителами против CD3/CD28, для позитивного отбора и активации Т-клеток. Для индивидуумов, не страдающих CLL, для активации Т-клеток подвергнутые элютриации клетки промывали с последующим добавлением покрытых антителами против CD3/CD28 парамагнитных гранул. Лентивирусный вектор добавляли во время активации клеток и промывали на 3 сутки после начала культивирования. Через двое суток клетки подвергали экспансии на устройстве с качающейся платформой (WAVE Bioreactor System) дополнительно в течение 3-7 суток. На последние сутки культивирования гранулы удаляли пропусканием через магнитное поле и собирали Т-клетки с CART19, промывали и криоконсервировали в инфузионной среде. Пациентам проводили химиотерапию, направленную на снижение количества лимфоцитов, как описано, с последующей в/в капельной инфузией №1 CART19 в течение 15-20 мин. Инфузию проводили с использованием подхода дробных доз в течение 3 суток (10%, 30%, 60%), начиная с 1-5 суток после завершения химиотерапии. Анализы конечных точек проводили на 4 неделе исследования. По завершении активного мониторинга индивидуумов переводили на конечный протокол для последующего длительного наблюдения в соответствии с руководством FDA.

На фиг. 2 проиллюстрирован способ получения клеток CART-19.

Фиг. 3 представляет собой таблицу, в которой перечислены типы анализов, проводимых на трансдупцированных Т-клетках.

На фиг. 4 проиллюстрированы результаты анализов количественного определения нуклеиновой кислоты VSV-G во время периода культивирования ex vivo.

На фиг. 5 проиллюстрированы результаты анализов количественного определения нуклеиновой кислоты ВИЧ-gag во время периода культивирования ex vivo.

#### Подробное описание

Изобретение относится к способам получения векторов, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который является подходящим для трансдукции Т-клеток, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком. Изобретение также относится к способам трансдукции Т-клеток, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком, векторами, содержащими нуклеиновые кислоты, кодирующие химерный антигенный рецептор (CAR). В предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор. Настоящее изобретение относится к адоптивному переносу Т-клеток, трансдупцированных лентивирусным вектором, для экспрессии CAR. CAR представляют собой молекулы, в которых специфичность антитела для желаемого антигена-мишени (например, опухолевого антигена) объединяют с активирующую

щим Т-клеточный рецептор внутриклеточным доменом для получения химерного белка, который обладает специфической противоопухолевой клеточной иммунной активностью.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению относятся к способам анализа супернатантов векторов, пригодных для трансдукции Т-клеток, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком. В других вариантах осуществления способы по изобретению относятся к способам анализа трансдуктированных Т-клеток, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком. В различных вариантах осуществления способы анализа по изобретению включают способы анализа жизнеспособности Т-клеток, признака Т-клеток (например, экспрессии CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD45RA, CD57, CD62L, CD95, CD127, CD134, CD244, CCR7, CD40L, CTLA4, PD-1, HLA-DR, TIM3, Ki-67, перфорина и/или гранзима), эффективности трансдукции, а также способы детекции и количественного определения загрязнений, связанных со способом получения, таких как эндотоксин, микоплазма, компонент репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновая кислота VSV-G, ВИЧ-gag, остаточные гранулы, покрытие антителами против CD3/CD28, антитела мыши, смешанная сыворотка человека, бычий сывороточный альбумин, сыворотка крупного рогатого скота, компоненты среды для культивирования, компоненты упаковывающих вектор клеток или плазмид, бактерии (например, *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы А) и грибы. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным загрязнением. Предпочтительно изобретение включает способы анализов какого-либо загрязнения, которое влияет на безопасность или эффективность трансдуктированной Т-клетки.

Настоящее изобретение в основном относится к использованию векторов для генетической модификации Т-клеток для стабильной экспрессии желаемого CAR. В настоящем описании Т-клетки, экспрессирующие CAR, обозначают как Т-клетки с CAR или модифицированные Т-клетки с CAR. Предпочтительно клетку можно генетически модифицировать для стабильной экспрессии связывающего домена антитела на ее поверхности, обеспечивающего новую антигенную специфичность, которая не зависит от МНС. В некоторых случаях Т-клетку генетически модифицируют для стабильной экспрессии CAR, в котором объединяют антиген-распознающий домен конкретного антитела с внутриклеточным доменом цепи CD3-дзета или белка Fc<sub>γ</sub>RI в один химерный белок.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит внеклеточный домен, содержащий антиген-распознающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В другом варианте осуществления трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать заменой аминокислот для исключения связывания таких доменов с трансмембранными доменами одинаковых или различных белков поверхности мембраны для сведения к минимуму взаимодействий с другими компонентами рецепторного комплекса. Предпочтительно трансмембранный домен представляет собой шарнирный домен CD8α.

Касательно цитоплазматического домена CAR по изобретению можно конструировать так, чтобы он содержал сигнальный домен CD28 и/или 4-1BB сам по себе или был объединен с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(ами), пригодным по отношению к CAR по изобретению. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен CAR можно конструировать, чтобы он дополнительно содержал сигнальный домен CD3-дзета. Например, цитоплазматический домен CAR может содержать, но не ограничиваться ими, сигнальные модули CD3-дзета, 4-1BB и CD28 и их сочетания. Таким образом, изобретение относится к Т-клеткам CAR и способам их применения для адоптивной терапии.

Изобретение включает способы получения вектора, содержащего нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR против CD19, содержащий костимуляторный домен CD3-дзета и 4-1BB. В одном из вариантов осуществления вектор содержит желаемый CAR, например, CAR, содержащий антиген-распознающий домен против CD19, шарнирный и трансмембранный домен CD8α и сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека. Изобретение не ограничено CAR, содержащими антиген-распознающий домен против CD19, а также включает любой антигена связывающий фрагмент, слитый с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы из сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и любого их сочетания. В предпочтительных вариантах осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор.

#### Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит изобретение. Хотя в практическом осуществлении для тестирования настоящего изобретения можно использовать любые способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, которые описываются в настоящем описании, в настоящем описании описаны предпочтительные вещества и способы. В описании и формуле изобретения настоящего изобретения будет использована приведенная ниже терминология.

Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Формы единственного числа в настоящем описании применяют для обозначения одного или более одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

Как используют в настоящем описании, "приблизительно" при обозначении измеряемого значения, такого как количество, продолжительность времени и т.п., предназначено включать отклонения  $\pm 20\%$  или  $\pm 10\%$ , в некоторых случаях  $\pm 5\%$ , в некоторых случаях  $\pm 1\%$  и в некоторых случаях  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, т.к. такие отклонения подходят для проведения описываемых способов.

Как используют в настоящем описании, "активация" относится к состоянию Т-клетки, которую в достаточной степени стимулировали для индукции детектируемой пролиферации клеток. Активация также может быть ассоциирована с индуцируемой продукцией цитокинов и детектируемыми эффекторными функциями. В частности, термин "активированные Т-клетки" относится к Т-клеткам, которые претерпевают клеточное деление.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, получаемые из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные участки интактных иммуноглобулинов. Антитела, как правило, представляют собой тетramerы молекул иммуноглобулинов. Антитела в настоящем изобретении могут находиться в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)<sub>2</sub>, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, в Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела и относится к антиген-распознающим вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, линейные антитела, антитела scFv и полиспецифические антитела, состоящие из фрагментов антител.

Как используют в настоящем описании, "тяжелая цепь антитела" относится к большей из двух типов полипептидных цепей, содержащихся во всех молекулах антител в их природных конформациях.

Как используют в настоящем описании, "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, содержащейся во всех типах молекул антител в их природных конформациях. Легкие цепи  $\kappa$  и  $\lambda$  относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

Как используют в настоящем описании, под термином "синтетическое антитело" подразумевают антитело, которое получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как описано в настоящем описании. Термин также следует интерпретировать, как означающий антитело, которое получили синтезом молекулы ДНК, кодирующей антитело, и где на основании молекулы ДНК экспрессируется белок антитела, или аминокислотной последовательности, определяющей антитело, где ДНК или аминокислотную последовательность получали с использованием технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известна в данной области.

Как используют в настоящем описании, термин "антиген" или "Ag" определяют как молекулу, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать продукцию антител или активацию специфических иммунологически компетентных клеток, или и то и другое. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены можно получать из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или неполную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом, кодирует "антиген" в том виде, в котором термин используют в настоящем описании. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген необязательно кодирует только полноразмерная нуклеотидная последовательность гена. Легко понять, что настоящее изобретение относится, но не ограничивается этим, к использованию неполных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях для индукции желаемого иммунного ответа. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген совсем необязательно кодируется "геном". Легко понять, что антиген можно получать синтезом или можно выделять из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничиваться ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Как используют в настоящем описании, термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому действию, которое может проявляться уменьшением объема опухоли, уменьшением числа опухолевых клеток, уменьшением числа метастазов, увеличением продолжительности жизни или улучшени-

ем состояния различных физиологических симптомов, связанных со злокачественным состоянием. "Противоопухлевый эффект" также может проявляться в первую очередь в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению предотвращать развитие опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением, термин "автоантиген" означает любой собственный антиген, который ошибочно распознается иммунной системой как чужеродный. Автоантигены включают, но не ограничиваются ими, клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности.

Как используют в настоящем описании, термин "автоиммунное заболевание" определяют как нарушение, которое является результатом автоиммунного ответа. Автоиммунное заболевание является результатом неадекватного и избыточного ответа на собственный антиген. Примеры автоиммунных заболеваний включают наряду с другими, но не ограничиваются ими, болезнь Адисона, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (I типа), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, Синдром Гийена-Барра, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, тяжелую миастению, обыкновенную пузырчатку, псориаз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит.

Как используют в настоящем описании, термин "аутологичный" предназначен для обозначения любого вещества, получаемого у одного и того же индивидуума, которому в дальнейшем его повторно вводят.

"Аллогенный" относится к трансплантату, получаемому от другого животного того же вида.

"Ксеногенный" относится к трансплантату, получаемому от животного другого вида.

Как используют в настоящем описании, термин "злокачественная опухоль" определяют как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться местно или через кровоток и лимфатическую систему в другие отделы организма. Примеры различных злокачественных опухолей включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п.

Как используют в настоящем описании, термин "костимуляторный лиганд" включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (например, аAPC, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывается с родственной костимуляторной молекулой на Т-клетке, таким образом, обеспечивая сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, нагруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая, но не ограничиваясь ими, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимуляторный лиганд может включать, но не ограничиваться ими, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимуляторный лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывается с Toll-подобным рецептором, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3.

Костимуляторный лиганд в числе прочего также включает антитело, которое специфически связывается с костимуляторной молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, но не ограничиваясь ими, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированный антигена лимфоцита 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, и лиганд, который специфически связывается с CD83.

"Костимуляторная молекула" относится к родственному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимуляторным лигандом, таким образом, опосредуя костимуляторный ответ Т-клеткой, такой как, но не ограничиваясь им, пролиферация. Костимуляторные молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу МНС класса I, BTLA и Toll-подобный рецептор.

Как используют в настоящем описании, "костимуляторный сигнал" относится к сигналу, который в сочетании с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или активации или подавлению ключевых молекул.

"Заболевание" представляет собой состояние здоровья животного, где животное не может поддерживать гомеостаз, и где, если состояние заболевания не улучшается, здоровье животного продолжает ухудшаться. В противоположность этому, "нарушение" у животного представляет собой состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного является менее благоприятным, чем если бы оно было в отсутствие нарушения. При отсутствии лечения нарушение не обязательно вызывает дальнейшее ухудшение состояния здоровья животного.

Как используют в настоящем описании, "эффективное количество" означает количество, которое обеспечивает терапевтическую или профилактическую пользу.

"Кодирующий" относится к неотъемлемому свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК, или иРНК, служить в качестве матриц для синтеза других

полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и иРНК) или определенную последовательность аминокислот и в результате этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если в результате транскрипции и трансляции иРНК, соответствующей этому гену, в клетке или другой биологической системе продуцируется белок. Кодирующую цепь, нуклеотидная последовательность которой является идентичной последовательности иРНК, которую, как правило, предоставляют в списках последовательностей, и некодирующую цепь, используемую в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, можно обозначать как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Как используют в настоящем описании, "эндогенное" относится к любому веществу из организма, клетки, ткани или системы или продуцируемому внутри организма, клетки, ткани или системы.

Как используют в настоящем описании, термин "экзогенное" относится к любому веществу, вводимому в организм, клетку, ткань или систему или продуцируемому вне организма, клетки, ткани или системы.

Как используют в настоящем описании, термин "экспрессия" определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, регулируемой ее промотором.

"Экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий контролирующие экспрессию последовательности, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии.

Экспрессирующий вектор содержит соответствующие цис-действующие элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в экспрессирующем векторе *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все экспрессирующие векторы, известные в данной области, такие как космиды, плазмида (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, адено- и аденоассоциированные вирусы), которые содержат рекомбинантный полинуклеотид.

"Гомологичный" относится к сходству последовательностей или идентичности последовательностей двух полипептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Когда положение в двух сравниваемых последовательностях занято одинаковой мономерной субединицей основания или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы являются гомологичными в этом положении. Процент гомологии двух последовательностей зависит от числа совпадений или гомологичных положений в двух последовательностях, поделенного на число сравниваемых положений  $\times 100$ . Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или являются гомологичными, то две последовательности являются на 60% гомологичными. В качестве примера, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC обладают 50% гомологией. Как правило, для получения максимальной гомологии сравнение проводят при выравнивании двух последовательностей.

Как используют в настоящем описании, термин "иммуноглобулин" или "Ig" определяют как класс белков, который функционирует как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, в некоторых случаях обозначают как BCR (В-клеточный рецептор) или антигенный рецептор. Пять представителей, входящих в этот класс белков, представляют собой IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA представляет собой первичное антитело, которое присутствует в выделениях организма, таких как слюна, слезы, грудное молоко, желудочно-кишечные выделения и слизистые выделения дыхательных и мочеполовых путей. IgG является наиболее распространенным циркулирующим антителом. IgM является основным иммуноглобулином, продуцируемым при первичном иммунном ответе у большинства индивидуумов. Он является наиболее эффективным иммуноглобулином при агглютинации, фиксации комплемента и других ответах антитела, и является важным при защите от бактерий и вирусов. IgD представляет собой иммуноглобулин, который не обладает известной функцией антитела, но может служить в качестве антигенного рецептора. IgE представляет собой иммуноглобулин, который опосредует гиперчувствительность немедленного типа, вызывая выделение медиаторов из тучных клеток и базофилов при воздействии аллергена.

Как используют в настоящем описании, "инструкционный материал" включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое среду выражения, которую можно использовать для информирования о пригодности композиций и способов по изобретению. Инструкционный материал набора по изобретению, например, можно прикреплять к контейнеру, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию по изобретению или транспортировать совместно с контейнером, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. Альтернативно, инструкционный материал можно транспортировать отдельно от контейнера с целью совместного использования инструкционного материала и соединения получателем.

"Выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом содержащиеся у живого животного, не является "выделенной", но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенный от веществ, совместно присутствующих в естественном состоянии, является "выделенным". Выделенная нуклеиновая кислота или белок может существовать по существу в очищенной форме или может существовать в неприродном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

В контексте настоящего изобретения используют следующие ниже сокращенные обозначения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. "А" относится к аденоzinу, "С" относится к цитозину, "Г" относится к гуанозину, "Т" относится к тимидину и "У" относится к уридину.

Как используют в настоящем описании, "лентивирус" относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов, т.к. способны инфицировать неделяющиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они представляют собой один из наиболее эффективных способов реализации вектора для доставки генов. ВИЧ, SIV и FIV представляют собой примеры лентивирусов. Получаемые из лентивирусов векторы обеспечивают средства достижения значительных уровней переноса генов *in vivo*.

Как используют в настоящем описании, под термином "модулирующий" подразумевают опосредующий детектируемое увеличение или снижение уровня ответа у индивидуума по сравнению с уровнем ответа у индивидуума при отсутствии лечения или введения соединения и/или по сравнению с уровнем ответа у иным образом идентичного, но не получавшего лечения индивидуума. Термин включает отключение и/или влияние на нативный сигнал или ответ, таким образом, опосредующее благоприятный терапевтический ответ у индивидуума, предпочтительно у человека.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными вариантами друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК, могут содержать интроны.

Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нукleinовой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нукleinовой кислоты является функционально связанный со второй последовательностью нукleinовой кислоты, если первая последовательность нукleinовой кислоты находится в функциональной взаимосвязи со второй последовательностью нукleinовой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и находятся в одной рамка считывания, если необходимо соединять две области, кодирующие белок.

Термин "сверхэкспрессированный" опухолевый антиген или "сверхэкспрессия" опухолевого антигена предназначен для обозначения аномального уровня экспрессии опухолевого антигена в клетке из очага заболевания, такого как солидная опухоль в конкретной ткани или органе пациента, относительно уровня экспрессии в нормальной клетке из этой ткани или органа. Пациентов с солидными опухолями или гемобластозом, отличающимися сверхэкспрессией опухолевого антигена, можно определять стандартными известными в данной области анализами.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или интрастернальную инъекцию, или способы инфузии.

В настоящем описании термины "пациент", "субъект", "индивидуум" и т.п. используют взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному или его клеткам *in vitro* или *in situ*, к которым можно применять способы, описываемые в настоящем описании. В определенных неограничивающих вариантах осуществления пациент, субъект или индивидуум представляет собой человека.

Как используют в настоящем описании, термин "полинуклеотид" определяют как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты являются полимерами нуклеотидов. Таким образом, как используют в настоящем описании, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды являются взаимозаменяемыми. Специалист в данной области обладает общими знаниями о том, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые можно гидролизовать до мономерных "нуклеотидов". Мономерные нуклеотиды можно гидролизовать до нуклеозидов. Как используют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, все последовательности нукleinовой кислоты, которые получают любыми способами, доступными в данной области, включая без ограничения рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нукleinовой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки с использованием общепринятой технологии клонирования и ПЦР, и т.п., и способами синтеза.

Как используют в настоящем описании, термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и они относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не существует ограничения касательно максимального числа аминокислот, которые могут содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, соединенные друг с другом пептидными связями. Как используют в настоящем описании, термин относится к коротким цепям, которые также в данной области общепринято обозначают, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к более длинным цепям, которые в данной области, как правило, обозначают как белки, много типов которых существует. "Полипептиды" наряду с другими включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные

полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их сочетание.

Как используют в настоящем описании, термин "промотор" определяют как последовательность ДНК, распознаваемую аппаратом синтеза клетки или встраиваемую аппаратом синтеза, необходимую для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Как используют в настоящем описании, термин "промотор/регуляторная последовательность" означает последовательность нукleinовой кислоты, которая является необходимой для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промотором/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях такая последовательность может представлять собой коровую последовательность промотора, и в других случаях такая последовательность также может содержать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые являются необходимыми для экспрессии продукта гена. Промотор/регуляторная последовательность, например, может представлять собой последовательность, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим образом.

"Конститутивный" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда является функционально связанный с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке в большем числе или в любых физиологических условиях клетки.

"Индукциальный" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда функционально связана с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке по существу только в том случае, если в клетке присутствует индуктор, который соответствует промотору.

"Тканеспецифический" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда функционально связана с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке по существу только, если клетка представляет собой клетку типа ткани, соответствующую промотору.

Как используют в настоящем описании в отношении антитела, под термином "специфически связывается" подразумевают антитело, которое распознает конкретный антиген, но по существу не распознает или не связывается с другими молекулами в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном от одного вида, также может связываться с этим антигеном от другого одного или нескольких видов. Но такая межвидовая реактивность сама по себе не вносит изменений в классификацию антитела как специфического. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, также может связываться с различными аллельными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не вносит изменений в классификацию антитела как специфического. В некоторых случаях термины "специфическое связывание" или "специфически связывающееся" можно использовать по отношению к взаимодействию антитела, белка или пептида со второй химической молекулой, для обозначения того, что такое взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенные детерминанты или эпитопа) на химической молекуле; например, антитело распознает и связывается с конкретной структурой белка, а не с белком в общем смысле. Если антитело является специфическим к эпитопу "A", присутствие молекулы, содержащей эпитоп A (или свободный немеченный A), в реакции, включающей меченный "A" и антитело, будет приводить к снижению количества меченного A, связанного с антителом.

Под термином "стимуляция" подразумевают первичный ответ, индуцируемый связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) со своим родственным лигандом, таким образом, опосредуя передачу сигнала, такую как, но не ограничиваясь ею, передача сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как снижение экспрессии TGF- $\beta$  и/или реорганизация структур цитоскелета, и т.п.

Как используют в настоящем описании, термин "стимулирующая молекула" означает молекулу на Т-клетке, которая специфически связывается с родственным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигепрезентирующей клетке.

Как используют в настоящем описании, "стимулирующий лиганд" означает лиганд, который, когда присутствует на антигепрезентирующей клетке (например, аAPC, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), может специфически связываться с родственным партнером по связыванию (обозначаемым в настоящем описании как "стимулирующая молекула") на Т-клетке, таким образом, опосредуя первичный ответ Т-клеткой, включая, но не ограничиваясь ими, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области и включают, в числе прочего, молекулу МНС класса I, нагруженную пептидом, антитело против CD3, суперагонистическое антитело против CD2, и суперагонистическое антитело против CD2.

Термин "индивидуум" предназначен включать живые организмы, у которых можно вызывать иммунный ответ (например, млекопитающих). Примеры индивидуумов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды.

Как используют в настоящем описании, "по существу очищенная" клетка представляет собой клетку, которая в основном не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относит-

ся к клетке, которую отдалили от других типов клеток, с которыми она обычно ассоциирована в своем природном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин просто относится к клетке, которую отдалили от клеток, с которыми она в природе ассоциирована в своем природном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления клетки не культивируют *in vitro*.

Как используют в настоящем описании, термин "терапевтический" означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект получают подавлением, ремиссией или устранением состояния болезни.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству заявленного соединения, которое вызывает биологическую или важную с медицинской точки зрения реакцию ткани, системы или индивидуума, которой добивается исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Термин "терапевтически эффективное количество" включает такое количество соединения, которое при введении является достаточным для профилактики развития или ослабления до некоторой степени одного или нескольких признаков или симптомов нарушения или заболевания, подлежащего лечению. Терапевтически эффективное количество изменяется в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. индивидуума, для которого необходимо проводить лечение.

"Лечить" заболевание, как этот термин используют в настоящем описании, означает снижать частоту возникновения или тяжесть по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, которым страдает индивидуум.

Термин "трансфицированный" или "трансформированный" или "трансдуцированный", как используют в настоящем описании, относится к способу, которым экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная" или "трансформированная", или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которую трансфицировали, трансформировали или трансдуцировали экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную подвергаемую воздействию клетку и ее потомство.

Как используют в настоящем описании, фраза "под транскрипционным контролем" или "функционально связанный" означает, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к полинуклеотиду для контроля инициации транскрипции РНК-полимеразой и экспрессии полинуклеотида.

"Вектор" представляет собой целевую композицию, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Многие векторы известны в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфильтальными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также следует интерпретировать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, соединения полилизина, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, адено-вирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы и т.п.

Диапазоны: на всем протяжении этого описания различные аспекты изобретения могут быть предоставлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона служит только для удобства и краткости, и его не следует интерпретировать, как жесткое ограничение объема изобретения. Таким образом, описание диапазона следует интерпретировать как содержащее все возможные конкретно описываемые поддиапазоны, а также отдельные численные значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такое как от 1 до 6, следует интерпретировать как содержащее конкретно описываемые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные количества в этом диапазоне, например, 1, 2, 2, 7, 3, 4, 5, 5, 3 и 6. Это применяют независимо от ширины диапазона.

#### Описание

Настоящее изобретение относится к способам анализа супернатантов векторов, пригодных для трансдукции Т-клеток, предназначенных для введения являющемуся человеком индивидууму. Настоящее изобретение также относится к способам анализа трансдуцированных Т-клеток и их супернатантов, предназначенных для введения индивидууму, являющемуся человеком. В различных вариантах осуществления способы анализа по изобретению включают способы анализа жизнеспособности Т-клеток, признака Т-клеток (например, экспрессия CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD45RA, CD57, CD62L, CD95, CD127, CD134, CD244, CCR7, CD40L, CTLA4, PD-1, HLA-DR, TIM3, Ki-67, перфорина и/или гранзима), эффективности трансдукции, содержания и количества эндотоксина, содержания и количества микроплазмы, содержания и количества компонента репликации лентивируса (RCL), содержания и количества p24, содержания и количества нуклеиновой кислоты и/или белка, получаемого из каждой из плазмид, используемых для упаковки лентивирусной плазмиды, содержания и количества нуклеиновой кислоты и/или белка VSV-G, ВИЧ-gag, остаточных гранул, покрытых антителами против CD3/CD28, антител мыши, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, сыворотки крупного рогато-

го скота, компонентов среды для культивирования, компонентов упаковывающих вектор клеток или плазмид, содержания и количества бактерий (например, *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы А) или бактериальных продуктов, которые активируют и/или модулируют иммунную систему (например, LPS, нуклеиновой кислоты, РНК и т.д.), и содержания и количества грибов.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума, являющийся человеком, может страдать злокачественной опухолью. В различных вариантах осуществления злокачественная опухоль может представлять собой гемобластоз, солидную опухоль, первичную или метастазирующую опухоль. Предпочтительно злокачественная опухоль представляет собой гемобластоз, и более предпочтительно злокачественная опухоль представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). Другие заболевания, поддающиеся лечению композициями и способами по изобретению, включают вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, а также аутоиммунные заболевания.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующими CAR, где в случае, когда CAR экспрессируется Т-клеткой, Т-клетка с CAR проявляет противоопухолевое свойство. CAR можно конструировать так, чтобы он содержал внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, слитый с внеклеточным сигнальным доменом дзета-цепи комплекса Т-клеточного антигена (например, CD3-дзета). CAR, когда экспрессируется в Т-клетке, способен перенаправлять распознавание антигена в зависимости от специфичности связывания антигена. Иллюстративный антиген представляет собой CD19, т.к. этот антиген экспрессируется на злокачественных В-клетках. Однако изобретение не ограничено CAR, который распознает CD19. Наоборот, изобретение включает любой антигенсвязывающий фрагмент, который при связывании со своим родственным антигеном влияет на опухолевую клетку таким образом, что опухолевая клетка становится неспособной расти, индуцируется ее гибель, или на нее оказывают иное влияние, таким образом, что снижается или исчезает опухолевая нагрузка у пациента. Антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно является слитым с внутриклеточным доменом от одной или нескольких костимуляторных молекул и дзета-цепи. Предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент является слитым с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы из сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления вектор по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую сигнальный домен CD137 (4-1BB). Это обусловлено тем, что CAR-опосредованные Т-клеточные ответы можно дополнительно усиливать добавлением костимуляторных доменов. Например, включение сигнального домена CD137 (4-1BB) значительно увеличивает противоопухолевую активность и устойчивость *in vivo* Т-клеток с CAR по сравнению с иным образом идентичной Т-клеткой с CAR, не сконструированной для экспрессии CD137 (4-1BB). Способы генетической модификации Т-клеток посредством CAR описаны в PCT/US11/64191, полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки.

#### Композиция

Настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, где CAR содержит внеклеточный и внутриклеточный домен. Внеклеточный домен содержит специфичный к мишени связывающий элемент, иначе обозначаемый как антигенсвязывающий фрагмент. Внутриклеточный домен или иной цитоплазматический домен содержит костимуляторную сигнальную область и участок дзета-цепи. Костимуляторная сигнальная область относится к участку CAR, содержащему внутриклеточный домен костимуляторной молекулы. Костимуляторные молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые являются необходимыми для эффективного ответа лимфоцитов на антиген.

Между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR может вводить спейсерный домен. Как используют в настоящем описании, термин "спейсерный домен", как правило, означает любой олиго- или полипептид, который функционирует, связывая трансмембранный домен с внеклеточным доменом или цитоплазматическим доменом в полипептидной цепи. Спейсерный домен может содержать до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот.

#### Антигенсвязывающий фрагмент

В одном из вариантов осуществления вектор по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где CAR содержит специфичный к мишени связывающий элемент, иначе обозначаемый как антигенсвязывающий фрагмент. Выбор фрагмента зависит от типа и числа лигандов, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен можно выбирать для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишениях, ассоциированных с конкретным состоянием болезни. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды для домена антигенсвязывающей молекулы в CAR по изобретению, включают маркеры клеточной поверхности, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и злокачественными клетками.

В одном из вариантов осуществления вектор по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где CAR конструируют для воздействия на представляющий интерес опухолевый антиген посредством конструирования желаемого антигена связывающего фрагмента, который специфически связывается с антигеном на опухолевой клетке. В контексте настоящего изобретения "опухолевый антиген" или "антиген гиперпролиферативного нарушения" или "антиген, ассоциированный с гиперпролиферативным нарушением", относится к антигенам, которые являются типичными для конкретных гиперпролиферативных нарушений, таких как злокачественная опухоль. Описываемые в настоящем описании антигены приведены только в качестве примера. Предполагают, что перечисление не является ограничивающим, и дополнительные примеры будут очевидны специалистам в данной области.

Опухолевые антигены представляют собой белки, которые продуцируются опухолевыми клетками, которые вызывают иммунный ответ, в частности, опосредуемые Т-клетками иммунные ответы. Выбор антигена связывающего фрагмента по изобретению зависит от конкретного типа злокачественной опухоли, подлежащей лечению. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области и включают, например, глиома-ассоциированный антиген, раково-эмбриональный антиген (CEA),  $\beta$ -хорионический гонадотропин человека, альфа-фетопротеин (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, теломеразную обратную транскриптазу человека, RU1, RU2 (AS), кишечную карбоксилэстеразу, mut hsp70-2, M-CSF, простазу, специфический антиген простаты (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, простеин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломеразу, опухолевый антиген рака предстательной железы 1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, нейтрофильную эластазу, эфрин B2, CD22, инсулиноподобный фактор роста (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I и мезотелин.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген содержит один или несколько эпитопов опухолевых антигенов, ассоциированных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить в качестве антигенов-мишеней для иммунного ответа. Эти молекулы включают, но не ограничиваются ими, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназа и GP 100 при меланоме и простатическая кислая фосфатаза (PAP) и специфический антиген простаты (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени принадлежат к группе связанных с трансформацией молекул, таких как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одной другой группой антигенов-мишеней являются онкофетальные антигены, такие как раково-эмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме иммуноглобулин опухолеспецифичного идиотипа представляет собой истинный опухолеспецифичный иммуноглобулиновый антиген, который является уникальным для отдельной опухоли. Антигены В-клеточной дифференцировки, такие как CD19, CD20 и CD37, являются другими кандидатами антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме. Некоторые из этих антигенов (CEA, HER-2, CD19, CD20, идиотип) с ограниченным успехом использовали в качестве мишеней для пассивной иммутерапии моноклональными антителами.

Тип опухолевого антигена, описываемого в изобретение, также может представлять собой опухолеспецифичный антиген (TSA) или опухолеассоциированный антиген (TAA). TSA является уникальным для опухолевых клеток и не встречается в других клетках в организме. Ассоциированный антиген TAA не является уникальным для опухолевой клетки, а наоборот, также экспрессируется на нормальной клетке в условиях, препятствующих индукции состояния иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена на опухоли может возникать в условиях, которые обеспечивают ответ иммунной системы на антиген. TAA могут представлять собой антигены, которые экспрессируются на нормальных клетках при развитии плода, когда иммунная система является незрелой и неспособна реагировать, или они могут представлять собой антигены, которые в норме содержатся на крайне низких уровнях на нормальных клетках, но которые экспрессируются на гораздо более высоких уровнях на опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры антигенов TSA или TAA включают следующие: антигены дифференцировки, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифичные мультилинейные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутантные гены-супрессоры опухоли, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, возникающие в результате хромосомных транслокаций, такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены вируса Эпштейна-Барра EBVA и антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7. Другие большие антигены на основе белков включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, с-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p15, p16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеин, бета-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27,29/BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90/Mac-2 связывающий белок/циклофилин С-ассоциированный белок, TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

В предпочтительном варианте осуществления антигена связывающего фрагмента участок CAR направлен на антиген, который включает, но не ограничивается ими, CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, с-Met, PSMA, гликопротеин F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR и т.п.

В зависимости от желаемого антигена, на который необходимо оказывать направленное воздействие, CAR по изобретению можно конструировать так, чтобы он включал соответствующий антигенсвязывающий фрагмент, который является специфичным для желаемого антигена-мишени. Например, если CD19 представляет собой желаемый антиген, который необходимо направленно воздействовать, в качестве антигенсвязывающего фрагмента для встраивания в CAR по изобретению можно использовать антитело против CD19.

В одном из вариантов осуществления вектора по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где участок антигенсвязывающего фрагмента CAR по изобретению направлен на CD19.

#### Трансмембранный домен

Трансмембранный домен CAR можно конструировать так, чтобы он содержал трансмембранный домен, который является слитым с внеклеточным доменом CAR. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать заменой аминокислоты для устранения связывания таких доменов с трансмембранным доменом одинаковых или различных белков мембранный поверхности для сведения к минимуму взаимодействия с другими представителями рецепторного комплекса.

Трансмембранный домен можно получать из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен можно получать из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области для конкретного применения в настоящем изобретении можно получать (т.е. содержащими, по меньшей мере, трансмембранную область(и)) из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилона, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Альтернативно трансмембранный домен может являться синтетическим, в случае чего он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Предпочтительно на каждом конце синтетического трансмембранного домена будет встречаться триплет фенилаланин, триптофан и валин. Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно от 2 до 10 аминокислот может образовать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR. Дуплет глицин-серин представляет собой особенно подходящий линкер.

Предпочтительно трансмембранный домен в CAR вектора по изобретению представляет собой трансмембранный домен CD8. В некоторых случаях трансмембранный домен CAR по изобретению содержит шарнирный домен CD8 $\alpha$ .

#### Цитоплазматический домен

Цитоплазматический домен или иначе внеклеточный сигнальный домен CAR вектора по изобретению отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую поместили CAR. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин "внеклеточный сигнальный домен" относится к участку белка, который передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на осуществление специализированной функции. Несмотря на то, что, как правило, можно использовать весь внеклеточный сигнальный домен, во многих случаях необходимо использовать всю цепь. В тех случаях, когда используют усеченный участок внеклеточного сигнального домена, такой усеченный участок можно использовать вместо интактной цепи при условии, что он передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин внеклеточный сигнальный домен предназначен включать любой усеченный участок внеклеточного сигнального домена, достаточный для передачи сигнала эффекторной функции.

Предпочтительные примеры внеклеточных сигнальных доменов для применения в CAR вектора по изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые действуют совместно для инициации передачи сигнала после связывания антигенного рецептора, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, которая обладает аналогичной функциональной способностью.

Известно, что для полной активации Т-клетки недостаточно сигналов, генерируемых только через TCR, и что также необходим вторичный или костимуляторный сигнал. Таким образом, можно сказать, что активацию Т-клетки опосредуют два различных класса цитоплазматической сигнальной последовательности: последовательности, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и последовательности, которые действуют независящим от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимуляторный сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности).

Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом или ингибирующим образом. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM.

Примеры ITAM, содержащего первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, ко-

торые имеют конкретное применение в изобретении, включают такие, как получаемые из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Особенno предпочтительно цитоплазматическая сигнальная молекула в CAR по изобретению содержит цитоплазматическую сигнальную последовательность, получаемую из CD3-дзета.

В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR можно конструировать так, чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета сам по себе или в комбинации с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(ами), пригодным в отношении CAR по изобретению. Например, цитоплазматический домен CAR может содержать участок цепи CD3-дзета и костимуляторную сигнальную область. Костимуляторная сигнальная область относится к участку CAR, содержащему внутриклеточный домен костимуляторной молекулы. Костимуляторная молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от антигенного рецептора или его лигандов, которая является необходимой для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированный антиген лимфоцита 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т.п. Таким образом, несмотря на то, что изобретение проиллюстрировано преимущественно с 4-1BB в качестве костимуляторного сигнального элемента, в объем изобретения входят другие костимуляторные элементы.

Цитоплазматические сигнальные последовательности в цитоплазматическом сигнальном участке CAR по изобретению можно связывать друг с другом в случайном или специальном порядке. Необходимо короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь. Дублет глицин-серин представляет собой особенно подходящий линкер.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен конструируют так, чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В другом варианте осуществления цитоплазматический домен конструируют так, чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен конструируют так, чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28 и 4-1BB.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен в CAR по изобретению конструируют так, чтобы он содержал сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

#### Векторы

Настоящее изобретение относится к способам получения вектора, содержащего последовательности CAR, где последовательность содержит последовательность нукleinовой кислоты антигена связывающего фрагмента, функционально связанную с последовательностью нукleinовой кислоты внутриклеточного домена. Иллюстративный внутриклеточный домен, который можно использовать в CAR вектора по изобретению включает, но не ограничивается ими, внутриклеточный домен CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п. В некоторых случаях CAR может содержать любое сочетание CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR вектора по изобретению содержит scFv против CD19, шарнирный и трансмембранный домен CD8 человека и сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека.

Последовательности нукleinовой кислоты, кодирующие желаемые молекулы, можно получать известными в данной области рекомбинантными способами, такими как, например, скринингом библиотеки из клеток, экспрессирующих ген, выделением гена из вектора, для которого известно, что он содержит его, или выделением непосредственно из клеток и тканей, содержащих его, стандартными способами. Альтернативно, представляющий интерес ген можно получать синтетически, а не клонировать.

Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые встроена ДНК по настоящему изобретению. Векторы, получаемые из ретровирусов, такие как лентивирус, представляют собой подходящие средства достижения длительной передачи гена, т.к. они обеспечивают длительную, стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с другими векторами, получаемыми из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкоза мыши, которое заключает в том, что они могут трансдуктировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

В кратком изложении, экспрессию природных или синтетических нукleinовых кислот, кодирующих CAR, как правило, получают функциональным связыванием нукleinовой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его участки, с промотором, и встраиванием конструкции в экспрессирующий вектор. Векторы могут быть подходящими для репликации и интеграции у эукариот. Характерные клонирующие векторы содержат терминалы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нукleinовой кислоты.

Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации нукleinовой кислотой и генотерапии с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области. См., например, патенты США № 5399346, 5580859, 5589466, полностью включенные посредством ссылки в настоящее описание. В другом варианте осуществления изобретение относится к генотерапевтическому вектору.

Нукleinовую кислоту можно клонировать во многие типы векторов. Например, нукleinовую ки-

слоту можно клонировать в вектор, включая, но не ограничиваясь ими, плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животного и космиду. Представляющие особый интерес векторы включают экспрессирующие векторы, реплицирующиеся векторы, векторы для получения зондов и векторы для секвенирования.

Кроме того, экспрессирующий вектор можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технологии вирусных векторов хорошо известны в данной области и описаны, например, у Sambrook et al., (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), и в других учебниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые являются пригодными в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, адено-вирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит участок начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или несколько селектируемых маркеров, (например, WO 01/96584, WO 01/29058 и патент США № 6326193).

Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд систем на основе вирусов. Например, ретровирусы представляют собой подходящую платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно встраивать в вектор и упаковывать в ретровирусные частицы с применением известных в данной области способов. Затем можно выделять рекомбинантный вирус и доставлять в клетки индивидуума *in vivo* или *ex vivo*. В данной области известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют адено-вирусные векторы. В данной области известен ряд адено-вирусных векторов. В одном из вариантов осуществления используют лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они локализованы в области 30-110 п.н. выше стартового участка, хотя недавно было продемонстрировано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже стартового участка. Часто расстояние между промоторными элементами не является строгим, таким образом, что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертированы или смешены относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами можно увеличивать до 50 п.н. до начала снижения активности. По-видимому, в зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо для активации транскрипции.

Один из примеров подходящего промотора представляет собой промоторную последовательность предраннего цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную запускать высокие уровни экспрессии любой функционально с ней связанный полинуклеотидной последовательности. Другой пример подходящего промотора представляет собой фактор элонгации-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Однако также можно использовать другие конститутивные промоторные последовательности, включая, но не ограничиваясь ими, ранний промотор вируса обезьяны 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, но не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, изобретение не следует ограничивать использованием конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также предусмотрены как часть изобретения. Использование индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный запускать экспрессию полинуклеотидной последовательности, которая является функционально связанный с ним, когда такая экспрессия является желательной, или прекращать экспрессию, когда экспрессия является нежелательной. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклический промотор.

Для оценки экспрессии полипептида CAR или его участков экспрессирующий вектор, подлежащий введению в клетку, также может содержать ген селективного маркера или репортерный ген, или тот и другой для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо трансфицировать или инфицировать посредством вирусных векторов. В других аспектах селектируемый маркер может находиться на отдельном фрагменте ДНК, и его можно использовать в способе котрансфекции. Селектируемые маркеры и репортерные гены можно фланкировать подходящими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Пригодные селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие какneo и т.п.

Для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей используют репортерные гены. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в организме или ткани реципиента и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется некоторым легко детектируемым свойством, например, ферментативной активностью. Экспрессию репортерного гена оценивают в подходящий момент времени после встраивания ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секрецию щелочной фосфатазы, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие экспрессирующие системы хорошо известны, и их можно

получать с использованием известных техник или получать из коммерческого источника. В основном, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, для которой демонстрируют наиболее высокий уровень экспрессии репортерного гена, определяют как промотор. Такие промоторные области можно связывать с репортерным геном и использовать для оценки средств на способность модулировать запускаемую промотором транскрипцию.

Способы введения и экспрессии генов в клетку известны в данной области. Касательно экспрессирующего вектора, вектор можно легко вводить в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого любым способом в данной области. Например, экспрессирующий вектор можно трансфицировать в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими средствами.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, лиофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительный способ введения полинуклеотида в клетку-хозяина представляет собой трансфекцию с использованием фосфата кальция.

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом встраивания генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы можно получать из лентивируса, поксвируса, вируса простого герпеса I, аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, патенты США № 5350674 и 5585362.

Химические средства введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают системы коллоидных дисперсий, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросфера, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративная коллоидная система для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* представляет собой липосому (например, искусственную мембранный везикулу).

В случае, когда используют невирусную систему доставки, иллюстративное средство доставки представляет собой липосому. Для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предусмотрено использование липидных составов. В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновую кислоту, связанную с липидом, можно инкапсулировать в водной внутренней среде липосомы, распределять внутри липидного бислоя липосомы, присоединять к липосоме посредством связывающей молекулы, которая соединена с липосомой и олигонуклеотидом, заключать в липосому, получать комплексное соединение с липосомой, диспергировать в растворе, содержащем липид, смешивать с липидом, объединять с липидом, она может содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплексное соединение с мицеллой, или иным образом связывать с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором, не являются ограниченными какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут содержаться в бислойной структуре в виде мицелл или с "разрушенной" структурой. Они также могут просто распределиться в растворе, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жировые вещества, которые могут являться природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жировые капли, которые встречаются в природе в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

Пригодные для использования липиды можно получать из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидхолин ("DMPC") можно получать от Sigma, St. Louis, MO; дицетилфосфат ("DCP") можно получать от K&K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") можно получать от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получать от Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при -20°C. Хлороформ используют в качестве единственного растворителя, т.к. он легче испаряется, чем метанол. "Липосома" представляет собой общий термин, включающий различные однослойные и многослойные липидные носители, получаемые посредством образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат много липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды супензируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислойми (Ghosh et al., 1991, Glycobiology 5: 505-10). Однако также предусмотрены композиции, которые имеют структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусмотрены комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергание клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как саузерн- и "нозерн"-блоттинг, ПЦР с обратной транскрипцией и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как детекция наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ELISA и вестерн-блоттинг) или анализами, описываемыми в настоящем описании для идентификации средств, входящих в объем изобретения.

#### Источники Т-клеток

До экспансии и генетической модификации Т-клеток по изобретению у индивидуума получают источник Т-клеток. Т-клетки можно получать из различных источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфоузлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткани селезенки и опухоли. В определенных вариантах настоящего изобретения можно использовать любое число линий Т-клеток, доступных в данной области. В определенных вариантах настоящего изобретения Т-клетки можно получать из единицы крови, собираемой у индивидуума любым из ряда способов, известных специалисту в данной области, таких как разделение с использованием Ficoll™. В одном из предпочтительных вариантов осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном из вариантов осуществления клетки, собираемых аферезом, можно промывать для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В одном из вариантов осуществления изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления раствора для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы. Кроме того, неожиданно начальные этапы активации при отсутствии кальция приводят к усиленной активации. Как будет понятно специалистам в данной области, этап промывания можно проводить способами, известными специалистам в данной области, такими как с использованием стандартной центрифуги, полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Собе 2991, Baxter Cytomate или Haemonetics Cell Saver 5) по инструкциям производителя. После промывания клетки можно ресусцидировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий  $Ca^{2+}$ , не содержащий  $Mg^{2+}$  PBS, PlasmaLyte A, 5% декстроза в 0,45% хлориде натрия или другой физиологический раствор с любым сочетанием буферов или без них. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца после афереза и непосредственно ресусцидировать клетки в среде для культивирования.

В другом варианте осуществления Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови лизом эритроцитов и удалением моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLL™ или противоточной центрифужной элютриацией или Miltenyi CliniMACS, или магнитными гранулами, или магнитными гранулами, связанными с антителами. Конкретную субпопуляцию Т-клеток, таких как Т-клетки  $CD3^+$ ,  $CD28^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD45RA^+$ ,  $CD45RO^+$ ,  $CD62L^+$ ,  $CD127^+$ , можно дополнительно выделять или удалять способами позитивного или негативного отбора. Например, в одном из вариантов осуществления Т-клетки выделяют посредством инкубации с гранулами, коньюгированными с антителами против  $CD3/CD28$  (т.е. 3×28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28T, в течение периода времени, достаточного для позитивного отбора желаемых Т-клеток. В одном из вариантов осуществления периода времени составляет приблизительно 30 мин. В дополнительном варианте осуществления периода времени находится в диапазоне от 30 мин до 36 ч или более и всех целочисленных значений между ними. В дополнительном варианте осуществления периода времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч. В еще одном другом предпочтительном варианте осуществления периода времени составляет от 10 до 24 ч. В одном из предпочтительных вариантов осуществления времени инкубации составляет 24 ч. Для выделения Т-клеток у пациентов с лейкозом использование большего времени инкубации, такого как 24 ч, может повышать выход клеток. Большое время инкубации можно использовать для выделения Т-клетки в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, такой как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у иммунологически компрометированных индивидуумов. Кроме того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата  $CD8^+$  Т-клеток. Таким образом, простым уменьшением или увеличением времени можно обеспечивать связывание Т-клеток с гранулами  $CD3/CD28$ , и/или увеличением или уменьшением отношения гранул к Т-клеткам (как описано ниже в настоящем описании) предпочтительно можно проводить позитивный или отрицательный отбор субпопуляции Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени во время проведения способа. Кроме того, повышая или понижая отношение антител против  $CD3$  и/или против  $CD28$  на гранулах или другой поверхности, предпочтительно можно проводить позитивный или отрицательный отбор субпопуляции Т-клеток в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области будет понятно, что в контексте на-

стоящего изобретения также можно использовать многочисленные этапы отбора. В определенных вариантах осуществления желательным может являться проведение процедуры отбора и использование "неотобранных" клеток в способе активации и экспансии. "Неотобранные" клетки также можно подвергать дополнительным этапам отбора.

Обогащение популяции Т-клеток посредством негативного отбора можно проводить с использованием комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для негативно отбираемых клеток. Один из способов представляет собой клеточный сортинг и/или отбор посредством негативной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых негативному отбору. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup>-клетками посредством негативного отбора смесь моноклональных антител, как правило, содержит антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных вариантах осуществления желательным может являться обогащение или позитивный отбор регуляторных Т-клеток, которые, как правило, экспрессируют CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, GITR<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup>. Альтернативно, в определенных вариантах осуществления регуляторные Т-клетки удаляют посредством гранул, конъюгированных с антителом против CD25, или другим аналогичным способом отбора.

Для выделения желаемой популяции клеток посредством позитивного или негативного отбора можно изменять концентрацию клеток и поверхность (например, частиц, таких как гранулы). В определенных вариантах осуществления желательным может являться существенное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (т.е. увеличение концентрации клеток) для обеспечения максимального контактирования клеток и гранул. Например, в одном из вариантов осуществления используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном из вариантов осуществления используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где содержится много опухолевых клеток (т.е. кровь больного лейкозом, опухолевая ткань и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые в норме слабо экспрессируют CD28.

В родственном варианте осуществления желательным может являться использование более низких концентраций клеток. Значительным разбавлением смеси Т-клеток и уменьшение поверхности (например, частиц, таких как гранулы) сводят к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет проводить отбор клеток, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-клетками в разведенных концентрациях. В одном из вариантов осуществления концентрация используемых клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В других вариантах осуществления используемая концентрация может составлять приблизительно от  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл и любое целочисленное значение в этом диапазоне.

В других вариантах осуществления клетки можно инкубировать на ротационном шейкере в течение периодов времени различной продолжительности при различных скоростях при 2-37°C.

Т-клетки для стимуляции после этапа промывания также можно замораживать. Не желая быть связанными теорией, замораживание и последующий этап размораживания обеспечивает более однородный продукт в результате удаления гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывания, на котором удаляют плазму и тромбоциты, клетки можно сuspendировать в охлаждающем растворе. Несмотря на то, что многие охлаждающие растворы и параметры известны в данной области и будут являться пригодными в этом контексте, один из способов включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или среды для культивирования, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hespan или пентакрахмал, и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до -80°C при скорости 1° в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при -20°C или в жидком азоте.

В определенных вариантах осуществления криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем описании, и оставляют отстаиваться в течение одного часа при ком-

натной температуре до активации способами по настоящему изобретению.

В контексте изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у индивидуума в течение периода времени, когда могут потребоваться клетки, подвергаемые экспансии, как описано в настоящем описании. В связи с этим, источник клеток, подлежащих экспансии, можно собирать в любой необходимый момент времени и желаемые клетки, такие как Т-клетки, можно выделять и замораживать для дальнейшего использования в Т-клеточной терапии для любого числа заболеваний или состояний, для которых Т-клеточная терапия будет эффективной, таких как заболевания, описываемые в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового индивидуума. В определенных вариантах осуществления образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового индивидуума, который подвергается риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно подвергать экспансии, замораживать и использовать позже. В определенных вариантах осуществления образцы собирают у пациента сразу же после диагностики конкретного заболевания, как описано в настоящем описании, но до начала какого-либо лечения. В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у индивидуума до начала проведения любого числа подходящих способов лечения, включая, но не ограничиваясь ими, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусными средствами, химиотерапию, облучение, иммуносупрессирующие средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, миофенолат и FK506, антитела или другие иммуносупрессивные средства, такие как CAMPATH, антитела против CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, миофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая является важной для индуцируемой фактором роста передачи сигналов (рапамицин) (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321, 1991; Bicer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют у пациента и замораживают для дальнейшего использования в сочетании (например, до, одновременно или после) с трансплантацией костного мозга или стволовых клеток, подавляющей Т-клетки терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как, флударабин, наружной дистанционной лучевой терапии (XRT), циклофосфамидом или антителами, такими как ОКТ3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления клетки выделяют и их можно замораживать для дальнейшего использования до проведения лечения после терапии, подавляющей В-клетки, такой как средства, которые взаимодействуют с CD20, например, ритуксан.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента непосредственно после лечения. В связи с этим наблюдали, что после определенных видов лечения злокачественных опухолей, в частности видов лечения с использованием лекарственных средств, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты в норме восстанавливаются после лечения, качество получаемых Т-клеток может являться оптимальным или улучшенным в отношении их способности к экспансии *ex vivo*. Аналогично, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описываемых в настоящем описании, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного энgraftmenta и экспансии *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гематопоэтического роста во время этой фазы восстановления. Кроме того, в определенных вариантах осуществления можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию GM-CSF) и схемы симптоматического лечения для создания состояния у индивидуума, где благоприятной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или экспансия конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

#### Активация и экспансия Т-клеток

До проведения генетической модификации Т-клеток для экспрессии желаемого CAR или после нее Т-клетки можно активировать и подвергать экспансии, как правило, способами, как описано, например, в патентах США 6352694, 6534055, 6905680; 6692964; 5858358, 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566, 7175843; 5883223; 6905874; 6797514, 6867041 и в публикации патентной заявки США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки по изобретению подвергают экспансии приведением контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней средство, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал и лиганд, который стимулирует костимуляторную молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в настоящем описании, таким образом, как приведением в контакт с антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или приведение в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции дополнительной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывается с дополнительной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом про-

тив CD3 и антителом против CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток или CD8<sup>+</sup> Т-клеток можно использовать антитело против CD3 и антитело против CD28. Можно использовать примеры антитела против CD28, включающие 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France), как используют в других общезвестных в данной области способах (Berg et al., Transplant Proc, 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med., 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth., 227 (1-2):53-63, 1999).

В определенных вариантах осуществления первичный стимулирующий сигнал и костимуляторный сигнал для Т-клетки можно получать с использованием различных протоколов. Например, средства, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или быть связанными с поверхностью. В случае связывания с поверхностью средства могут быть связаны с одной и той же поверхностью (т.е. в "цис"-положении) или с отдельными поверхностями (т.е. в "транс"-положении). Альтернативно, одно средство может быть связано с поверхностью, а другое средство может находиться в растворе. В одном из вариантов осуществления средства, обеспечивающее костимуляторный сигнал, связано с клеточной поверхностью, и средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, находится в растворе или связано с поверхностью. В определенных вариантах осуществления оба средства могут находиться в растворе. В другом варианте осуществления средства могут находиться в растворимой форме, а затем их можно перекрестно шивать с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело, или другое связывающее средство, которое будет связываться со средствами. В отношении этого см., например, публикацию патентной заявки США № 20040101519 и 20060034810 касательно искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC), которые предусмотрены в настоящем изобретении для применения для активации и экспансии Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления два средства являются иммобилизованными на гранулах, на одной и той же грануле, т.е. "цис", или на отдельных гранулах, т.е. "транс". В качестве примера, средство, обеспечивающее первичный сигнал активации представляет собой антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, и средство, обеспечивающее костимуляторный сигнал, представляет собой антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент; и оба средства являются совместно иммобилизованными на одной и той же грануле в эквивалентных молекулярных количествах. В одном из вариантов осуществления используют отношение 1:1 каждого антитела, связанного с гранулами, для экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток и роста Т-клеток. В определенных аспектах по настоящему изобретению используют отношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, таким образом, что наблюдают увеличение экспансии Т-клеток по сравнению с экспансией, наблюдаемой при использовании отношения 1:1. В одном конкретном варианте осуществления наблюдают увеличение приблизительно от 1 приблизительно до 3 раз по сравнению с экспансией, наблюдаемой при использовании отношения 1:1. В одном из вариантов осуществления отношение антител против CD3:CD28, связанного с гранулами, находится в диапазоне от 100:1 до 1:100 и всех целочисленных значений между ними. В одном из аспектов настоящего изобретения с частицами связывается больше антител против CD28 по сравнению с антителом против CD3, т.е. отношение CD3:CD28 составляет менее одного. В определенных вариантах осуществления отношение антитела против CD28 к антителу против CD3, связанному с гранулами, составляет более 2:1. В одном конкретном варианте осуществления используют отношение 1:100 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами. В другом варианте осуществления используют отношение 1:75 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами. В дополнительном варианте осуществления используют отношение 1:50 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами. В другом варианте осуществления используют отношение 1:30 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами. В одном из предпочтительных вариантов осуществления используют отношение 1:10 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами. В другом варианте осуществления используют отношение 1:3 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами. В еще одном варианте осуществления используют отношение 3:1 антител против CD3:CD28, связанных с гранулами.

Для стимуляции Т-клеток или других клеток-мишеней можно использовать отношения частиц к клеткам от 1:500 до 500:1 и любые целочисленные значения в этом диапазоне. Как будет понятно специалистам в данной области, отношение частиц к клеткам может зависеть от размера частицы относительно клетки-мишени. Например, гранулы небольшого размера могут связывать несколько клеток, тогда как большие гранулы могут связывать много. В определенных вариантах осуществления для стимуляции Т-клеток также можно использовать отношение клеток к частицам в диапазоне от 1:100 до 100:1 и любое целочисленное значение в этом диапазоне, и в дополнительных вариантах осуществления отношение составляет от 1:9 до 9:1 и любое целочисленное значение в этом диапазоне. Отношение частиц, связанных с антителом против CD3 и антителом против CD28, к Т-клеткам, которое приводит к стимуляции Т-клеток, может изменяться, как указано выше, однако определенные предпочтительные значения включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 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 и 15:1, где одно из предпочтительных отношений составляет по меньшей мере 1:1 частиц на Т-клетку. В одном из вариантов осуществления используют отношение частиц к клеткам 1:1 или менее. В одном конкретном варианте осуществления предпочтительное отношение частицы:клетки составляет 1:5. В дополнительных вариантах осуществления отношения частиц к клеткам можно изменять в зависи-

мости от суток стимуляции. Например, в одном из вариантов осуществления отношение частиц к клеткам составляет от 1:1 до 10:1 на первые сутки и к клеткам добавляют дополнительные частицы каждые сутки или через сутки в дальнейшем в течение периода до 10 суток, при конечных отношениях от 1:1 до 1:10 (в зависимости от количества клеток на сутки добавления). В одном конкретном варианте осуществления отношение частиц к клеткам составляет 1:1 на первые сутки стимуляции, и его доводят до 1:5 на третьи и пятые сутки стимуляции. В другом варианте осуществления частицы добавляют ежесуточно или через сутки до конечного отношения 1:1 на первые сутки, и 1:5 на третьи и пятые сутки стимуляции. В другом варианте осуществления отношение частиц к клеткам составляет 2:1 на первые сутки стимуляции, и его доводят до 1:10 на третьи и пятые сутки стимуляции. В другом варианте осуществления частицы добавляют ежесуточно или через сутки до конечного отношения 1:1 на первые сутки и 1:10 на третьи и пятые сутки стимуляции. Специалисту в данной области понятно, что различные другие отношения могут являться пригодными для использования в настоящем изобретении. В частности, отношения изменяются в зависимости от размера частиц и размера и типа клеток.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, такие как Т-клетки, объединяют с покрытыми средством гранулами, затем гранулы и клетки разделяют, а затем культивируют клетки. В альтернативном варианте осуществления перед культивированием покрытые средством гранулы и клетки не разделяют, а культивируют совместно. В дополнительном варианте осуществления гранулы и клетки сначала концентрируют путем приложения силы, такой как сила магнитного поля, что приводит к увеличенному лигированию маркеров клеточной поверхности, таким образом, индуцируя стимуляцию клеток.

В качестве примера, белки клеточной поверхности можно соединять с лигандами, обеспечивая возможность контактирования парамагнитных гранул, к которым присоединены антитело против CD3 и антитело против CD28 (3×28 гранул), с Т-клетками. В одном из вариантов осуществления объединяют клетки (например, от  $10^4$  до  $10^9$  Т-клеток) и гранулы (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T парамагнитные гранулы в отношении 1:1) в буфере, предпочтительно PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетка-мишень может являться очень немногочисленной в образце и составлять только 0,01% образца, или весь образец (т.е. 100%) может состоять из представляющей интерес клетки-мишени. Таким образом, в контекст настоящего изобретения входит любое количество клеток. В определенных вариантах осуществления желательным может являться значительное уменьшение объема, в котором частицы и клетки смешивают друг с другом (т.е. повышение концентрации клеток) для обеспечения максимального контактирования клеток и частиц. Например, в одном из вариантов осуществления используют концентрацию приблизительно 2 миллиарда клеток/мл. В другом варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-негативные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и в определенных вариантах осуществления может являться желательным их получение. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8+ Т-клеток, которые в норме слабо экспрессируют CD28.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения смесь можно культивировать в течение от нескольких часов (приблизительно 3 ч) приблизительно до 14 суток или любого целочисленного значения часов в этом диапазоне. В другом варианте осуществления смесь можно культивировать в течение 21 суток. В одном из вариантов осуществления изобретения гранулы и Т-клетки совместно культивируют в течение приблизительно восьми суток. В другом варианте осуществления гранулы и Т-клетки совместно культивируют в течение 2-3 суток. Также желательными могут являться несколько циклов стимуляции, таким образом, что время культивирования Т-клеток может составлять 60 суток или более. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают соответствующие среды (например, минимальные поддерживающие среды или среды RPMI 1640, или X-vivo 15, (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную бычью сыворотку или сыворотку человека), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ и TNF-α или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среды могут включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, не содержащие сыворотку, или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или

определенного набора гормонов, и/или количества цитокина(ов), достаточного для роста и экспансии Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, вводят только в экспериментальные культуры, не в культуры клеток, которые предназначены для инфузии индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% CO<sub>2</sub>).

Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных периодов времени, могут обладать различными характеристиками. Например, характерные мононуклеарные клетки крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (T<sub>H</sub>, CD4<sup>+</sup>), которая является больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (T<sub>C</sub>, CD8<sup>+</sup>). Экспансия Т-клеток *ex vivo* посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к получению популяции Т-клеток, которая до приблизительно 8-9 суток состоит преимущественно из T<sub>H</sub>-клеток, тогда как приблизительно через 8-9 суток популяция Т-клеток содержит возрастающую популяцию T<sub>C</sub>-клеток. Таким образом, в зависимости от цели лечения предпочтительной может являться инфузия индивидууму популяции Т-клеток, содержащей преимущественно T<sub>H</sub>-клетки. Аналогично, если выделяли антиген-специфичную субпопуляцию T<sub>C</sub>-клеток, эффективной может являться экспансия этой субпопуляции до большего количества.

Кроме того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 во время экспансии клеток значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо. Таким образом, такая воспроизводимость обеспечивает возможность адаптации продукта активированных Т-клеток к конкретным целям.

#### Терапевтическое применение

Настоящее изобретение относится к клетке (например, Т-клетке), трансдуцированной вектором (например, лентивирусным вектором (LV)). Например, LV кодирует CAR, в котором объединяют антиген-распознающий домен конкретного антитела с внутриклеточным доменом CD3-дзета, CD28, 4-1BB или любого их сочетания. Таким образом, в некоторых случаях трансдуцированная Т-клетка может вызывать CAR-опосредованный Т-клеточный ответ.

Изобретение относится к использованию CAR для перенаправления специфичности первичной Т-клетки на опухолевый антиген. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу стимуляции опосредованной Т-клетками иммунной реакции на популяцию клетки-мишени или ткань у млекопитающего, включающему этап введения млекопитающему Т-клетки, которая экспрессирует CAR, где CAR содержит связывающий фрагмент, который специфически взаимодействует с предопределенной мишенью, участком дзета-цепи, содержащим, например, внутриклеточный домен CD3-дзета человека и костимуляторную сигнальную область.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к типу клеточной терапии, где Т-клетки являются генетически модифицированными для экспрессии CAR, и проводят инфузию Т-клеток с CAR нуждающемуся в этом реципиенту. Клетка после инфузии способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от видов терапии антителами Т-клетки с CAR способны реплицировать *in vivo*, что приводит к длительному поддержанию, которое может приводить к длительному подавлению опухоли.

В одном из вариантов осуществления Т-клетки с CAR по изобретению можно подвергать устойчивой экспансии Т-клеток *in vivo* и их можно поддерживать в течение продолжительного периода времени. В другом варианте осуществления Т-клетки с CAR по изобретению развиваются в специфичные Т-клетки памяти, которые можно повторно активировать для ингибиции или роста любой дополнительной опухоли. Например, не ожидали, что клетки CART19 по изобретению можно подвергать устойчивой экспансии Т-клеток *in vivo*, и они сохраняются на высоких уровнях в течение продолжительного периода времени в крови и костном мозге и образуют специфичные Т-клетки памяти. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, Т-клетки с CAR могут дифференцироваться *in vivo* в подобное центральной памяти состояние после контактирования с клетками-мишениями, экспрессирующими суррогатный антиген, и последующей их элиминацией.

Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый CAR-модифицированными Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ. Кроме того, опосредуемый CAR иммунный ответ может являться частью подхода адоптивной иммунотерапии, при которой CAR-модифицированные Т-клетки индуцируют иммунный ответ, специфичный для антигенсвязывающего фрагмента в CAR. Например, клетки CART19 вызывают иммунный ответ, специфичный против клеток, экспрессирующих CD19.

Несмотря на то, что в данных, описываемых в настоящем описании, конкретно описывают лентивирусный вектор, содержащий scFv против CD19, получаемый из моноклонального антитела FMC63 мыши, шарнирного и трансмембранных домена CD8α человека и сигнальных доменов 4-1BB и CD3-дзета человека, изобретение следует интерпретировать как включающее любое число вариантов каждого из компонентов конструкции, как описано где-либо в настоящем описании. Другими словами, изобретение включает использование любого антигенсвязывающего фрагмента в CAR для получения опосредованного CAR Т-клеточного ответа, специфичного к антигенсвязывающему фрагменту. Например, в це-

лях лечения злокачественной опухоли антигенсвязывающий фрагмент в CAR по изобретению может быть направлен на опухолевый антиген.

Злокачественные опухоли, которые можно лечить, включают опухоли, которые не являются васкуляризованными или по существу не васкуляризованными, а также васкуляризованные опухоли. Злокачественные опухоли могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Типы злокачественных опухолей, подлежащих лечению CAR по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, карциному, бластому и саркому, и определенные лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены опухоли/злокачественные опухоли взрослых и опухоли/злокачественные опухоли детей.

Гематологические злокачественные опухоли представляют собой злокачественные опухоли крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоцитарный, моноцитарный и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (медленно растущую и высококачественные формы), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию.

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые, как правило, не содержат кисты или области жидкости. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей называют по типу образующих их клеток (такие как саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие типы саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфоидное злокачественное новообразование, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак предстательной железы, печеночноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хриодарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такие как глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитома, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома, краинифарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, неврома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиомы, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге).

В одном из вариантов осуществления участок антигенсвязывающего фрагмента CAR по изобретению конструируют для лечения конкретной злокачественной опухоли. Например, CAR, сконструированный для направленного воздействия на CD19, можно использовать для лечения злокачественных опухолей и нарушений, включая, но не ограничиваясь ими, пре-В ALL (применение в педиатрии), ALL взрослых, лимфомы мантийных клеток, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, спасительную терапию после аллогенной трансплантации костного мозга и т.п.

В другом варианте осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на CD22 для лечения диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы.

В одном из вариантов осуществления злокачественные опухоли и нарушения, включая, но не ограничиваясь ими, пре-В ALL (применение в педиатрии), ALL взрослых, лимфому мантийных клеток, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, спасительную терапию после аллогенной трансплантации костного мозга и т.п., можно лечить с использованием комбинации CAR, который направлен на CD19, CD20, CD22 и ROR1.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на мезотелин для лечения мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака яичника и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на CD33/IL3Ra для лечения острого миелогенного лейкоза и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на с-Met для лечения тройного негативного рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на PSMA для лечения рака предстательной железы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на гликолипид F77 для лечения рака предстательной железы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия

на EGFRvIII для лечения глиобластомы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на GD-2 для лечения нейробластомы, меланомы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на NY-ESO-1 TCR для лечения миеломы, саркомы, меланомы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать для направленного воздействия на MAGE A3 TCR для лечения миеломы, саркомы, меланомы и т.п.

Однако не следует интерпретировать, что изобретение ограничено только антигенами-мишеньями и заболеваниями, описываемыми в настоящем описании. Наоборот, следует интерпретировать, что изобретение включает любую антигennую мишень, которая ассоциирована с заболеванием, где CAR можно использовать для лечения заболевания.

CAR-модифицированные Т-клетки по изобретению также могут служить в качестве типа вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. Предпочтительно млекопитающее является человеком.

Касательно иммунизации *ex vivo*, по меньшей мере один из следующих этапов происходит *in vitro* до введения клетки млекопитающему: i) экспансия клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующющей CAR, в клетки и/или iii) криоконсервация клеток.

Способы *ex vivo* хорошо известны в данной области и более подробно описаны ниже. В кратком изложении, клетки выделяют у млекопитающего (предпочтительно человека) и генетически модифицируют (т.е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) вектором, экспрессирующим CAR, описываемый в настоящем описании. CAR-модифицированную клетку можно вводить являющемуся млекопитающим реципиенту для получения благоприятного терапевтического эффекта. Реципиент, являющийся млекопитающим, может представлять собой человека, и CAR-модифицированная клетка может являться аутологичной для реципиента. Альтернативно, клетки могут являться аллогенными, изогенными или ксеногенными для реципиента.

К клеткам по настоящему изобретению можно применять способ экспансии *ex vivo* гематопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, описанный в патенте США № 5199942, включенном в настоящее описание посредством ссылки. Другие подходящие способы являются известными в данной области, таким образом, настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным способом экспансии клеток *ex vivo*. В кратком изложении, культивирование и экспансия *ex vivo* Т-клеток включает: (1) получение CD34+ гематопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников у млекопитающего из образца периферической крови или эксплантатов костного мозга и (2) экспансию таких клеток *ex vivo*. В дополнение к факторам роста клеток, описанным в патенте США № 5199942, для культивирования и экспансии клеток можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

В дополнение к использованию вакцины на основе клеток для иммунизации *ex vivo* настоящее изобретение также относится к композициям и способам иммунизации *in vivo* для вызывания у пациента иммунного ответа, направленного против антигена.

Как правило, активированные и подвергнуты экспансии клетки, как описано в настоящем описании, можно использовать для лечения и профилактики заболеваний, которые возникают у индивидуумов, которые являются иммунологически скомпрометированными. В частности, CAR-модифицированные Т-клетки по изобретению используют для лечения CLL. В определенных вариантах осуществления клетки по изобретению используют для лечения пациентов, подвергающихся риску развития CLL. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики CLL, включающим введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных Т-клеток по изобретению.

CAR-модифицированные Т-клетки по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции в сочетании с разбавителями и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. В кратком изложении, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать популяцию клеток-мишней, как описано в настоящем описании, в комбинации с один или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буфера, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстрыны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно формулируют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для заболевания, в отношении которого необходимо проводить лечение (или профилактику). Количество и частоту введения определяют в зависимости от таких факторов, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозирования можно определять посредством клинических испытаний.

Если указывают "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное

количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", то точное количество композиций по настоящему изобретению, которое необходимо вводить, может определять врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния пациента (индивидуума). Как правило, предусмотрено, что фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описываемые в настоящем описании, можно вводить в дозе от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целочисленные значения, находящиеся в этом диапазоне. Композиции Т-клеток в этих дозах также можно вводить много раз. Клетки можно вводить способами инфузии, которые являются общезвестными в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med., 319:1676, 1988). Специалист в данной области медицины может легко определять оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента путем наблюдения за признаками заболевания у пациента и, таким образом, корректировать лечение.

В определенных вариантах осуществления желательным может являться введение активированных Т-клеток индивидууму, а затем повторный забор крови (или проведение афереза), активация Т-клеток по настоящему изобретению в ней и повторная инфузия пациенту этих активированных и подвергнутых экспансии Т-клеток. Этот способ можно проводить много раз в течение нескольких недель. В определенных вариантах осуществления можно активировать Т-клетки из образцов крови от  $10 \text{ см}^3$  до  $400 \text{ см}^3$ . В определенных вариантах осуществления активируют Т-клетки из образцов крови  $20 \text{ см}^3$ ,  $30 \text{ см}^3$ ,  $40 \text{ см}^3$ ,  $50 \text{ см}^3$ ,  $60 \text{ см}^3$ ,  $70 \text{ см}^3$ ,  $80 \text{ см}^3$ ,  $90 \text{ см}^3$  или  $100 \text{ см}^3$ . Без желания быть связанными теорией, использование протокола многочисленных заборов крови/многочисленных повторных инфузий можно использовать для исключения определенных популяций Т-клеток.

Введение индивидуума композиций можно проводить любым подходящим способом, включая ингаляцию аэрозоля, инъекцию, пероральное введение, переливание, имплантацию или трансплантацию. Описываемые в настоящем описании композиции можно вводить пациенту подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (в/в) инъекции или интраперитонеально. В одном из вариантов осуществления композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту посредством внутрикожной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления композиции

Т-клеток по настоящему изобретению предпочтительно вводят посредством в/в или и/п инъекции. Композиции Т-клеток можно инъецировать непосредственно в опухоль, лимфоузел или очаг инфекции.

В определенных вариантах настоящего изобретения клетки, которые активировали и экспандировали способами, описываемыми в настоящем описании, или другими известными в данной области способами, где Т-клетки экспандируют до терапевтических уровней, вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) с любым числом подходящих способов лечения, включая, но не ограничиваясь ими, лечение средствами, такими как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином-2, цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом для пациентов с MS или лечение эфализумабом для пациентов с псориазом или другие виды лечения для пациентов с PML. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по изобретению можно использовать в сочетании с химиотерапией, облучением, иммуносупрессирующими средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, миофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как CAMPATH, антитела против CD3, или другими видами терапии, предусматривающей введение антител, цитоксином, флурадибином, циклоспорином, FK506, рапамицином, миофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая является важной для индуцируемой фактором роста передачи сигналов (рапамицин) (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) с трансплантацией костного мозга, терапией, подавляющей Т-клетки, с использованием химиотерапевтических средств, таких как флуадиабин, наружной дистанционной лучевой терапии (XRT), циклофосфамида или антител, таких как ОКТ3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят после терапии, подавляющей В-клетки, такой как средства, которые взаимодействуют с CD20, например, ритуксан. Например, в одном из вариантов осуществления индивидуумы могут получать стандартное лечение химиотерапией с высокими дозами с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации индивидуумам проводят инфузию экспандированных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления экспандированные клетки вводят до хирургической операции или после нее.

Дозирование указанных выше терапевтических средств, которые необходимо вводить пациенту, изменяется в зависимости от точной природы подлежащего лечению состояния и реципиента лечения. Изменение доз для введения человеку можно проводить в соответствии с общепринятой в данной области практикой. Доза CAMPATH, например, как правило, находится в диапазоне от 1 приблизительно до 100 мг для взрослого пациента, как правило, ее вводят ежесуточно в течение периода от 1 до 30 суток.

Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг в сутки, хотя в некоторых случаях можно использовать большие дозы до 40 мг в сутки (описанные в патенте США № 6120766).

#### Экспериментальные примеры

Изобретение дополнительно подробно описано со ссылкой на следующие ниже экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации, и их не следует интерпретировать как ограничивающие, если не указано иное. Таким образом, изобретение ни в коем случае не следует интерпретировать как ограниченное следующими ниже примерами, а наоборот, следует интерпретировать, что оно включает любые и все изменения, которые станут очевидны из указаний, предоставленных в настоящем описании.

Без дополнительного описания, полагают, что с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров специалист в данной области может получать и использовать соединения по настоящему изобретению и осуществлять на практике заявленные способы. Таким образом, следующие ниже демонстрационные примеры конкретно указывают предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом остальную часть описания.

#### Пример. Анализ загрязнений

Для детекции и количественного определения возможных загрязнений, вводимых в ходе способа трансдукции, анализируют лимфоциты, трансдупцированные для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), предназначенные для введения индивидууму, являющемуся человеком.

#### Общий лабораторный отчет

Обработку исследуемого образца, замораживание и лабораторные анализы проводили в соответствии с принципами Good Manufacturing Practices или Good Laboratory Practices, установленными SOP, и/или протоколами получения, обработки, замораживания и анализа образца.

#### Получение вектора

Трансген CD19-BB-Z (GeMCRIS 0607-793) разрабатывали и конструировали, как описано (Milone et al., 2009, Mol Ther., 17:1453-1464). Лентивирусный вектор получали в соответствии с текущими рекомендациями Good manufacturing practices с использованием трехплазмидного подхода получения в Lentigen Corporation, как описано (Zufferey et al., 1997, Nature Biotechnol., 15:871-875). Конструировали самоинактивирующийся лентивирусный вектор (GeMCRIS 0607-793), который подвергали доклиническому тестированию безопасности, как опубликовано ранее (Milone et al., 2009, Mol. Ther., 17: 1453-64). Способы получения Т-клеток также были описаны ранее (Porter et al, 2006, Blood, 107:1325-31).

#### Получение Т-клеток CART-19

Аутологичные Т-клетки конструируют так, чтобы они экспрессировали внеклеточное одноцепочечное антитело (scFv) со специфичностью к CD19. Внеклеточный scFv может перенаправлять специфичность трансдупцированных Т-клеток на клетки, которые экспрессируют CD19, молекулу, которая ограниченно экспрессируется на поверхности злокачественных клеток и на нормальных В-клетках. В дополнение к CD19 scFv клетки трансдупцируют для экспрессии внутриклеточной сигнальной молекулы, содержащей цепь TCR $\zeta$  или тандемный сигнальный домен, состоящий из сигнальных модулей 4-1BB и TCR $\zeta$ . scFv получают из моноклонального антитела мыши, и, таким образом, оно содержит последовательности мыши, и сигнальные домены представляют собой полностью нативные последовательности человека. Т-клетки CART-19 получают путем выделением Т-клеток аферезом и с использованием технологии лентивирусного вектора (Dropulic et al., 2006, Human Gene Therapy, 17: 577-88; Naldini et al., 1996, Science, 272: 263-7; Dull et al., 1998, J. Virol., 72: 8463-71) для введения scFv:TCR $\zeta$ :4-1BB в CD4- и CD8-Т-клетки. У некоторых пациентов в часть клеток вводят контроль scFv:TCR $\zeta$ : для эксперимента конкурентной репопуляции. Эти рецепторы являются "универсальными" в том, что они связывают антиген MHC-независимым образом, таким образом, одну конструкцию рецептора можно использовать для лечения популяции пациентов с опухолями, позитивными по антигену CD19.

Конструкции CAR разрабатывали в Университете Пенсильвании, и получали вектор для клинического применения от Lentigen Corporation. Клетки CART-19 получают в клинической лаборатории получения клеток и вакцин Университета Пенсильвании способом, представленным на фиг. 2. В конце культивирования клеток клетки криоконсервировали в инфузионной среде для криоконсервирования.

#### Жизнеспособность Т-клеток

Жизнеспособность Т-клеток после трансдукции определяли с использованием анализа с освобождением трипанового синего (с использованием 0,4% красителя трипанового синего (Gibco BRL каталоговый номер 15250-061 плюс среда или разбавитель и гемоцитометра Bright-Line (Hausser Scientific Company)) или 7-AAD для определения процента жизнеспособных клеток (с использованием BD ViaProbe (каталожный номер 555815, BD Biosciences Pharmingen) и проточного цитометра.

#### Характерный признак Т-клеток

Процент трансдупцированных клеток, экспрессирующих или не экспрессирующих конкретные маркеры Т-клеток, описанные где-либо в настоящем описании, определяли с использованием окрашивания клеток и проточной цитометрии.

### Эффективность трансдукции

Эффективность трансдукции Т-клеток определяли с использованием проточной цитометрии, количественной ПЦР или проточной цитометрии и количественной ПЦР.

### Содержание и количество эндотоксина

Содержание эндотоксина в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали с использованием теста гель-тромб.

3.1.1 Ридер Endosafe PTS-Kinetic, Charles River Laboratories

3.1.2 Регистрирующее программное обеспечение PTS

3.1.3 Одноразовый картридж для ингибирования/усиления, Charles River/кат. № PTS220

3.1.4 Одноразовый картридж LAL, тестовые картриджи (0,01-1,0/мл) и С из А для каждой серии, Charles River/кат. № PTS2001F

3.1.5 Одноразовый картридж LAL, тестовые картриджи (0,005-0,5 ед. энд./мл) и С из А для каждой партии, Charles River/кат. № PTS20005F

Хромогенные анализы конечных точек - регистрация на спектрофотометре

3.1.6 Блокирующий реагент: 20% мас./об. ледяной уксусной кислоты, каталожный № BP2401-212, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, Tel: 1-800-766-7000

3.1.7 Набор Limulus Amebocyte Lysate Test, кат. № 50-648U (300 тестов) или 50-647U (120 тестов), Cambrex, 8830 Biggs Ford Road, Walkersville, MD 21793, Tel: 800-654-4452, ext. 7822, Fax: 301-845-2924

3.1.7.1 Эндотоксин E. coli

3.1.7.2 Хромогенный субстрат

3.1.7.3 Хромогенный лизат амебоцитов мечехвоста (LAL)

3.1.7.4 Реагент вода для LAL (набор только на 120 тестов)

3.1.8 Реагент вода для LAL, каталожный № W50-640, Cambrex, 8830 Biggs Ford Road, Walkersville, MD 21793, Tel: 800-654-4452, Fax: 301-845-2924

Хромогенный анализ кинетики - регистрация на спектрофотометре

3.1.9 Блокирующий реагент: 20% мас./об. ледяной уксусной кислоты, каталожный № BP2401-212, Fisher Scientific

3.1.10 Набор Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL Endotoxin Assay, кат. № 50-650U (192 теста), Lonza/Cambrex

3.1.10.1 Эндотоксин E. coli

3.1.10.2 Реагент Kinetic-QCL (смесь LAL/хромогенный субстрат)

Реагент вода для LAL Тест гель-тромб

4.1.1 Мультитест лизат амебоцитов мечехвоста, PYROGENT® Plus 200 тестов, чувствительность 0,125 Ед. энд., каталожный № N294-125, Lonza

4.1.1.1 лизат амебоцитов мечехвоста (LAL) чувствительность 0,125 Ед. энд.

4.1.1.1.1 4×50 тестовые флаконы (5,2 мл/флакон)

4.1.1.2 Эндотоксин E. coli 055:B5, 10 нг/флакон, лиофилизированный, эндотоксин контрольный стандарт (CSE)

4.1.1.2.1 Примечание: активность CSE в Ед. энд./мл указана на сертификате анализа. СОА больше не предоставляют с набором.

4.1.1.2.2 Для доступа к сертификату анализа необходимо перейти по <http://www.lonzabio.com/2506.html>, ввести каталожный номер и номер партии, указанные на этикетке продукта на передней стороне коробки набора.

4.1.2 Реагент LAL, чувствительность лизата 0,125 Ед. энд./мл (Charles River Laboratories, каталожный № R11012)

4.1.2.1 Упаковка 12

4.1.3 Эндотоксин контрольного стандарта 10 нг/флакон (Charles River Laboratories, каталожный № E120)

4.1.3.1 Упаковка 6

4.1.4 Реагент вода для LAL (LRW), 30 мл/флакон, каталожный № W130, Charles River Laboratories

Содержание и количество микоплазмы

Содержание микоплазмы в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали с использованием анализа MycoAlert.

3.1.11 Набор MycoAlert Mycoplasma Detection (Lonza, каталожный № LT07-318), 100 тестов

3.1.12 Набор MycoAlert Assay Control (Lonza, каталожный № LT07-518)

3.1.13 96-луночные непрозрачные микропланшеты с белым дном (Corning Incorporated каталожный № 3912), Corning Incorporated Life Sciences 45 Nagog Park, Acton MA 01720, Tel: 1-978-635-2200, Fax: 1-978-635-2476

Регистрация на люминометре.

Набор ELISA MycoProbe Mycoplasma: <http://www.rndsystems.com/pdf/CUL001B.pdf>

Содержание и количество компонента репликации лентивируса (RCL)

Содержание RCL в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали с использованием анализа ПЦР, оценивающего VSV-G и ВИЧ-gag, и ELISA для p24.

Содержание и количество p24

Содержание p24 в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали с использованием анализа ELISA.

5.1.1 Набор PerkinElmer HIV-1 p24 ELISA

Каталожный номер NEK050 (1×96-луночный планшет),

NEK050A (2×96-луночные планшеты),

NEK050B (5×96-луночный планшет)

PerkinElmer, Inc, 940 Winter Street, Waltham,

Massachusetts 02451, Tel: 800-762-4000

Содержание и количество нуклеиновой кислоты VSV-G

Содержание нуклеиновой кислоты VSV-G в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали с использованием анализа количественной ПЦР с использованием комбинации праймер/зонд, которая специфически амплифицирует и обеспечивает детекцию последовательностей VSV-G в стандартных условиях амплификации ABI. Разрабатывали соответствующий требованиям анализ QPCR для количественного определения ДНК VSV-G с использованием указанных выше праймеров. В соответствующем требованием анализе используют стандартную кривую, получаемую из геномной ДНК, выделяемой из PBMC, с известным количеством pC1-VSV-G плазмида, который содержит последовательность гена VSV-G; стандартная кривая находится в диапазоне 1×106-10 копий VSV-G/100 нг PBMC. Для каждого конечного продукта оценивают содержание остаточной ДНК VSV-G в реакциях в трех повторениях с использованием приблизительно 200 нг геномной ДНК, выделяемой из продукта. Количество остаточной плазмида VSV-G определяют из стандартных кривых и описывают в виде копий плазмида VSV-G/микрограмм геномной ДНК после коррекции и нормализации количества вводимой ДНК. Содержание нукleinовой кислоты, загрязняющей плазмиду, для каждой из дополнительных пакующих плазмид (LIST), таким образом, можно определять с использованием комбинаций праймер/зонд, специфических для каждой плазмиды, используемой на этапе упаковки (VSVG, Gag pol, P24, pRSV.rev).

Содержание и количество бактерий

Содержание бактерий в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали, пытаясь культивировать бактерии с использованием вещества из культур трансдуцированных Т-клеток. Для тестирования бактериального загрязнения используют анализ BACTEC. Флаконы для культивирования BACTEC поддерживают рост широко распространенных аэробных микроорганизмов, и их инокулируют стерильным шприцом, содержащим 1-3 мл среды для культивирования. Детекцию роста проводят с использованием устройства BACTEC 9050, которым измеряют повышение концентрации CO<sub>2</sub> в течение определенного периода времени. Этот анализ проводят в CVPF в соответствии с SOP 0361, который предоставлен в другом месте в настоящем описании. Чувствительность этого теста в лаборатории CVPF не подтверждены, но опубликованные исследования указывают на то, что BACTEC является более чувствительным, более быстрым в отношении времени детектирования, менее подверженным ложноположительным результатам по сравнению со способом CFR (Khuri et al., 2004 и 2006).

Содержание и количество грибов

Содержание грибов в культурах трансдуцированных Т-клеток оценивали, пытаясь культивировать бактерии с использованием вещества из культур трансдуцированных Т-клеток. Тестирование на загрязнение грибами проводят в лабораториях клинической микробиологии HUP с использованием агара с сердечно-мозговым экстрактом Сабуро на основе состава Gorman, 1967. Среду оптимизируют для улучшенного выделения грибов, а также она содержит различные противомикробные средства для препятствия роста бактерий, которые могут конкурировать за рост с грибами. Среду для культивирования инокулируют посредством штриховой разводки. За посевами наблюдают в течение 14 суток для определения отрицательных результатов. В лаборатории клинической микробиологии не определяли чувствительность этого анализа. Положительные контроли для этого анализа включают три гриба: *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans* и *Trichophyton mentagrophytes*, которые должны расти, что указывает на пригодную для жизнедеятельности среду. Для мониторинга активности противомикробных средств контрольные чашки инокулируют *Escherichia coli* и должны наблюдать от частичного до полного ингибирования.

Хранение

Мешки (емкостью от 10 до 100 мл), содержащие трансдуцированные Т-клетки CART-19, хранят в условиях банка крови в морозильнике при -135°C под наблюдением. Инфузионные мешки хранят в морозильнике до тех пор, пока они не потребуются.

Размораживание клеток

После регистрации клеток в исследовательской аптеке, замороженные клетки транспортировали в сухом льду к индивидууму в стационар. Клетки размораживают у постели пациента - один мешок за один раз с использованием водяной бани, поддерживаемой при 36-38°C. Мешок аккуратно разминают до

тех пор, пока клетки точно разморозятся. В контейнере не должно оставаться замороженных агрегатов.

#### Введение/инфузия

Инфузии начинают через 1-2 суток после завершения химиотерапии. На сутки первых инфузий пациентам СВС (проводят общий анализ крови) с подсчетом лейкоцитарной формулы и оценку количества CD3, CD4 и CD8, т.к. химиотерапию проводили частично для индукции лимфоцитопении. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, полагают, что начальная в/в доза  $2,5-5 \times 10^9$  клеток CART-19 является оптимальной для этого протокола. Вследствие того, что у здорового взрослого человека содержится приблизительно  $1 \times 10^{12}$  Т-клеток, предлагаемая суммарная доза Т-клеток является эквивалентной приблизительно 0,5% общей массы тела (Roederer, 1995, Nat. Med., 1: 621-7; Macallan et al., 2003, Eur. J. Immunol., 33: 2316-26). Первую дозу вводят с использованием дробных доз на сутки 0 (10%), 1 (30%) и 2 (60%). Индивидуумам проводят инфузию в отдельной комнате. Клетки размораживают у постели пациента, как описано в настоящем описании. Размороженные клетки вводят при скорости инфузии так быстро, как это переносит пациент, таким образом, что продолжительность инфузии составляет приблизительно 10-15 мин. Трансдуцированные Т-клетки вводят быстрой внутривенной инфузией при скорости потока приблизительно от 10 до 20 мл в минуту через систему для переливания крови калибра 18 без латекса Y-типа с 3-ходовым краном. Продолжительность инфузии составляет приблизительно 15 мин. Один или два мешка модифицированных клеток CART-19 доставляют на льду и вводят клетки индивидууму холодными. У индивидуумов, получающих смеси клеток CART-19, для облегчения перемешивания клетки вводят одновременно с использованием Y-образного адаптера.

Индивидуумам проводят инфузию и премедикацию, как описано где-либо в настоящем описании. Оценивают основные показатели жизнедеятельности индивидуумов и проводят пульсовую оксиметрию перед дозированием, в конце инфузии и каждые 15 мин в дальнейшем в течение 1 ч, и до тех пор, пока они не станут стабильными и удовлетворительными. Образец крови для определения фонового уровня CART-19 получают перед инфузией и через 20 мин после инфузии. Пациентам, у которых наблюдали токсичность при предшествующей цитостатической химиотерапии, задерживали проведение инфузии до разрешения этих токсических явлений. Конкретные токсические явления, требующие задержки инфузии Т-клеток, включают: 1) легочные: потребность в дополнительном кислороде для сохранения насыщенности более 95% или наличие аномалий по данным рентгенографического исследования грудной клетки, которые прогрессируют; 2) сердечные: возникшая аритмия сердца, не контролируемая с использованием лекарственных средств. 3) Гипотензия, требующая введения лекарственных средств, повышающих кровяное давление. 4) Активная инфекция: положительные посевы крови на бактерии, грибы или вирус в течение 48 ч после инфузии Т-клеток. Образец сыворотки на калий и мочевую кислоту забирают перед первой инфузией, а также через два часа после каждой последующей инфузии.

Описания каждого и любого патента, патентной заявки и публикации, цитируемых в настоящем описании, таким образом, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие специалисты в данной области могут разрабатывать другие варианты осуществления и варианты настоящего изобретения, не выходя за рамки сущности и объема изобретения. Прилагаемая формула изобретения предназначена включать все такие варианты осуществления и эквивалентные варианты.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ *in vitro* анализа культуры генетически модифицированных Т-клеток для детекции по меньшей мере одного загрязнения, где указанное по меньшей мере одно загрязнение выбрано из группы, состоящей из компонента репликации лентивируса (RCL), p24, вируса везикулярного стоматита-G (VSV-G), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)-gag;

где указанный способ включает выполнение анализа ПЦР с оценкой VSV-G и ВИЧ-gag и ELISA для p24 для обнаружения компонента репликации лентивируса (RCL);

выполнение ELISA для обнаружения p24; или

проведения количественной ПЦР для обнаружения нуклеиновой кислоты VSV-G;

где генетически модифицированная Т-клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен.

2. Способ по п.1, где Т-клетка генетически модифицирована трансдукцией лентивирусным вектором.

3. Способ по п.1, где загрязнение дополнительно может представлять собой по меньшей мере одно загрязнение, выбранное из группы, состоящей из эндотоксина, где указанный эндотоксин детектируется проведением теста гель-тромб, микоплазмы, где указанная микоплазма детектируется проведением анализа *puscoalert*, остаточных гранул, покрытых антителами против CD3/CD28, антител мыши, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, сыворотки крупного рогатого скота, компонентов среды для культивирования, компонентов упаковывающих вектор клеток или плазмид, бактерий, где

указанные бактерии детектируются проведением анализа ВАСТЕС, и грибов, где указанные грибы детектируются путем проведения культивирования.

4. Способ по п.3, где бактерия представляет собой, по меньшей мере, бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы A, и где грибом является *Candida Albicans*.

5. Способ по п.1, где сигнальный домен представляет собой сигнальный домен CD3-дзета.

6. Способ по п.1, где антигенсвязывающий домен представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

7. Способ по п.6, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент (Fab) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

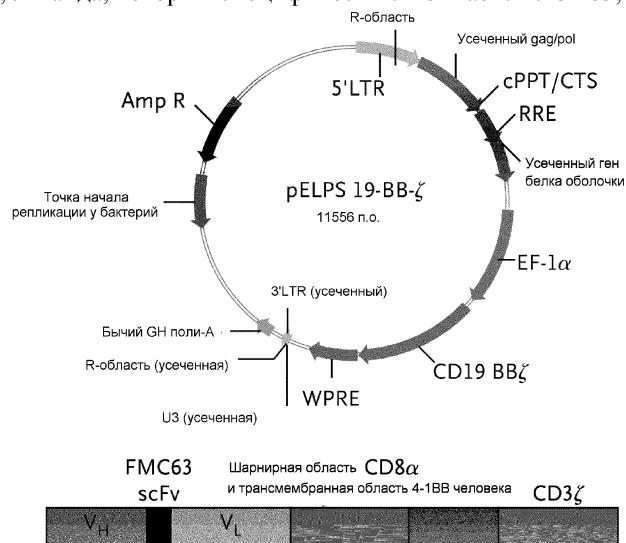
8. Способ по п.1, где антигенсвязывающий домен связывается с опухолевым антигеном.

9. Способ по п.8, где опухолевый антиген ассоциирован с гематологическим злокачественным новообразованием.

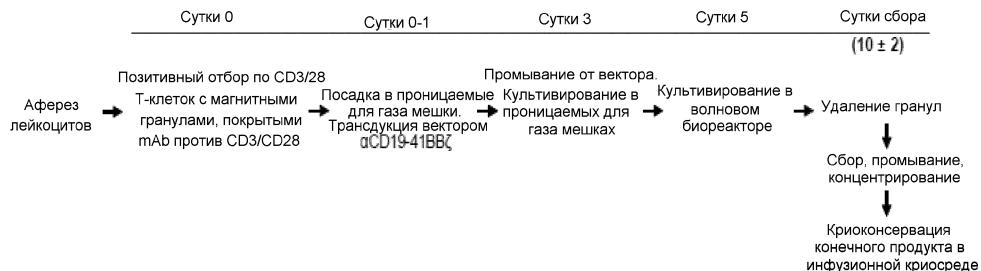
10. Способ по п.8, где опухолевый антиген ассоциирован с солидной опухолью.

11. Способ по п.8, где опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, сиротского рецептора тирозинкиназы 1 (ROR1), мезотелина, CD33/альфа рецептора интерлейкина-3 (IL3Ra), с-Met, простатического специфического мембранных антигена (PSMA), гликопептида F77, варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), GD-2, NY-ESO-1 Т-клеточный рецептор (TCR), антигена меланомы семейства A3 (MAGE A3) TCR и любого их сочетания.

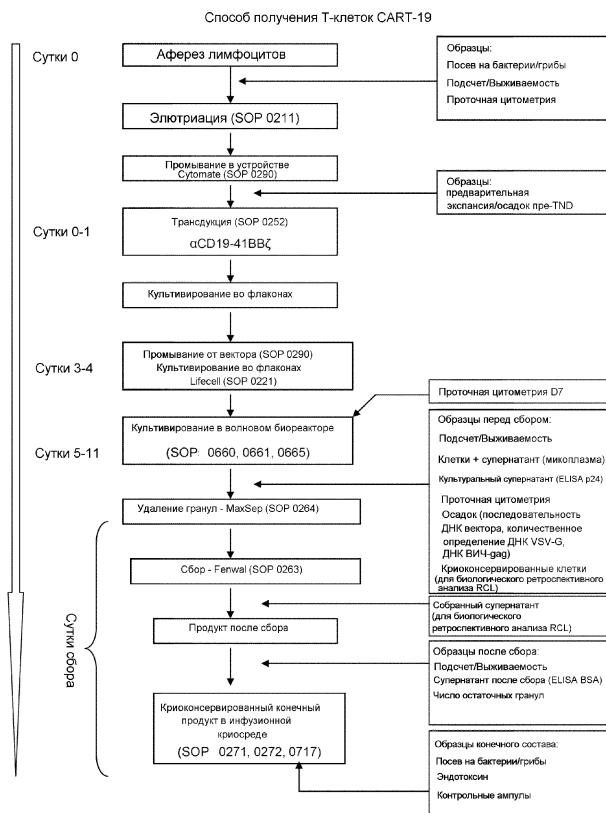
12. Способ по п.1, где костимуляторная сигнальная область содержит внутриклеточный домен костимуляторной молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, белка запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1), индуцируемого Т-клетками костимулятора (ICOS), функционально-ассоциированного антигена лимфоцита 1 (LFA-1), CD2, CD7, гомологичного лимфотоксину, проявляющего индуцируемую экспрессию и конкурирующего с гликопротеином D ВПГ за связывание с медиатором проникновения вируса герпеса, рецептора, экспрессируемого на Т-лимфоцитах (LIGHT), NKG2C, B7-H3, лиганды, который специфически связывается с CD83, и любого их сочетания.



Фиг. 1А



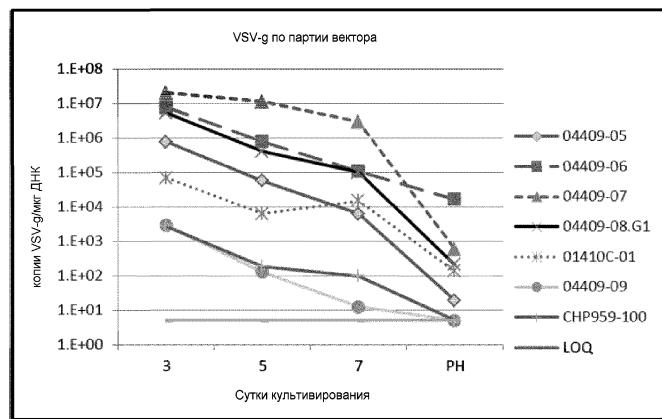
Фиг. 1В



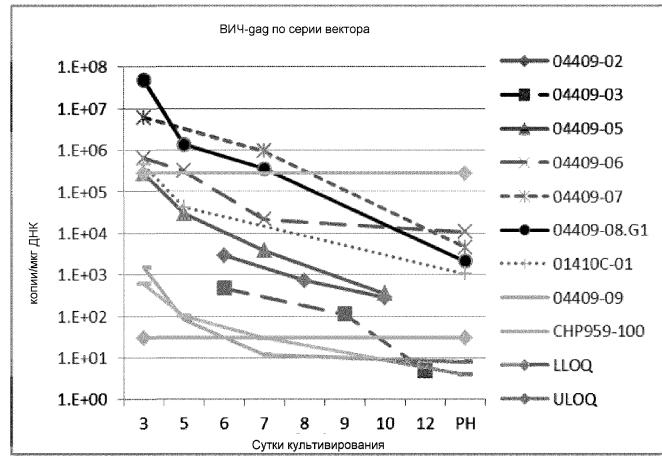
Фиг. 2

Тест	Способ	Критерии	Чувствительность	Специфичность
Выживаемость клеток в контрольной пробирке	Освобождение трипанового синего	≥70%	нет данных	нет данных
% CD3-позитивных клеток	Проточная цитометрия	≥80%	1 в 20000 клеток	CD3+ клетки
Остаточное количество гранул	Визуальный	≤100 гранул/36 клеток	1 гранула/36 клеток	Не применима
Эндотоксин	гель-тромб	≤ 3,5 Ед. энд./мл	0,125 Ед. энд./мл	Эндотоксин грамотрицательных бактерий
Микоплазма	Анализ MycoAlert	Отрицательный	<50 КОЕ/мл	Микоплазма
RCL (вич <sub>п24</sub> )	ПЦР	Отрицательный	≥30 копий/мкг геномной ДНК	ВИЧ-1 gag 1299-1377 (область, отсутствующая в лентивирусном векторе)
Эффективность трансдукции (экспрессия scFv)	Проточная цитометрия	≥20% усредненных копий на клетку	1 в 20000 клетках	Фрагмент вариабельной области одноцепочечного антитела мыши
ELISA антиген ВИЧ-1 P24	ELISA	< 10 пг/мл	0-4000 пг/мл	Коровий антиген ВИЧ-1 p24 в сыворотке, плазме, супернатанте культуры клеток человека
Эффективность трансдукции (число копий)	количественная ПЦР	≥0,2 усредненных копий на клетку	10 копий/мкг геномной ДНК	Специфическая область вектора CART-19 внутриклеточного сигнального домена CAR
ДНК VSV-G	количественная ПЦР	Отрицательный	25 копий/мкг геномной ДНК	белок G VSV
BSA	ELISA	≤1 мкг/мл	250 пг/мл	BSA
Посев бактерий	Посев	Отсутствие роста	TBD	- <i>Alcaligenes faecalis</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Neisseria meningitidis</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>S. pyogenes group A</i>
Посев грибов	Посев	Отсутствие роста	TBD	Следует определять

Фиг. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5

