

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 035484

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.06.23

(51) Int. Cl. A61K 35/17 (2015.01)  
A61K 39/39 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
C07K 14/725 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201790175

(22) Дата подачи заявки  
2011.12.09

---

(54) ПРИМЕНЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ Т-КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМИ  
АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ  
НОВООБРАЗОВАНИЙ

---

(31) 61/421,470; 61/502,649

(56) WO-A2-2002/077029  
US-A1-20040043401  
WO-A2-2008045437

(32) 2010.12.09; 2011.06.29

(33) US

(43) 2017.09.29

(62) 201390847; 2011.12.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:

Джун Карл Х., Портер Дэвид Л.,  
Кейлос Майкл Д., Майлон Майкл С.  
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

035484

B1

---

(57) Изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественных новообразований у человека. Изобретение относится к введению генетически модифицированной Т-клетки для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета.

B1

035484

По данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 61/421470, зарегистрированной 9 декабря 2010 г., и предварительной заявке США № 61/502649, зарегистрированной 29 июня 2011 г., таким образом, включенным в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

#### Предпосылки изобретения

Подавляющее большинство пациентов, имеющих В-клеточные злокачественные новообразования, включая хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), будут умирать от этих заболеваний. Одним из подходов для лечения этих пациентов является генетическая модификация Т-клеток для воздействия на антигены-мишени, экспрессируемых на опухолевых клетках, посредством экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR). CAR являются антигенными рецепторами, сконструированными для распознавания поверхностных антигенов клетки независимо от лейкоцитарного антигена человека. Попытки использования генетически модифицированных клеток, экспрессирующих CAR, для лечения этих типов пациентов имели лишь ограниченный успех. См., например, Brentjens et al., 2010, Molecular Therapy, 18:4, 666-668; Morgan et. al., 2010, Molecular Therapy, опубликованную онлайн 23 февраля 2010 г., стр. 1-9; и Till et al., 2008, Blood, 112: 2261-2271.

В случае большинства злокачественных новообразований опухолеспецифичные антигены еще не определены, но в случае В-клеточных злокачественных новообразованиях CD19 является привлекательной опухолевой мишенью. Экспрессия CD19 ограничена нормальными и злокачественными В-клетками (Uckun, et al. Blood, 1988, 71: 13-29), таким образом, CD19 является общепризнанной мишенью для безопасного тестирования CAR. Хотя CAR могут запускать активацию Т-клеток способом, аналогичным эндогенному Т-клеточному рецептору, главное препятствие для клинического применения этой технологии на сегодняшний день заключается в экспансии CAR+ Т-клеток *in vivo*, быстрым исчезновении клеток после введения и разочаровывающей клинической активности (Jena, et al., Blood, 2010, 116: 1035-1044; Uckun, et al. Blood, 1988, 71: 13-29).

Таким образом, в этой области существует острая потребность в композициях и способах лечения злокачественных новообразований с использованием CAR, которые можно подвергать экспансии *in vivo*. Настоящее изобретение направлено на решение этой задачи.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, где сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует CAR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен CAR является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с опухолевым антигеном. В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген ассоциирован с гематологическим злокачественным новообразованием. В другом варианте осуществления опухолевый антиген ассоциирован с солидной опухолью. В еще одном варианте осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелина, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликопептида F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления костимуляторная сигнальная область CAR содержит внутриклеточный домен костимуляторной молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена лимфоцитов-1 (LFA 1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, специфически связывающегося с CD83, и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления сигнальный домен CD3-дзета CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 18.

Изобретение также относится к выделенному CAR, содержащему антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, где сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Изобретение также относится к клетке, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления клетка, содержащая CAR, выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, естественных киллеров (NK-клеток), цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и регуляторных Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления клетка, содержащая CAR, проявляет противоопухолевый им-

мунитет, когда антигенсвязывающий домен CAR связывается с соответствующим антигеном.

Изобретение также относится к вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, где сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Изобретение также относится к способу стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань млекопитающего. В одном из вариантов осуществления способа включает введение млекопитающему эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, где антигенсвязывающий домен выбран для специфического распознавания популяции клеток-мишеней или ткани.

Изобретение также относится к способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего. В одном из вариантов осуществления способа включает введение млекопитающему эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, таким образом, обеспечивают противоопухолевый иммунитет у млекопитающего.

Также изобретение относится к способу лечения млекопитающего с заболеванием, нарушением или состоянием, ассоциированным с повышенной экспрессией опухолевого антигена. В одном из вариантов осуществления способа включает введение млекопитающему эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, таким образом, млекопитающее подвергают лечению.

В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелина, CD33/IL3Ra, с-Met, PSMA, гликолипида F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR и любой их комбинации.

Изобретение также относится к способу лечения человека с хроническим лимфоцитарным лейкозом. В одном из вариантов осуществления способа включает введение человеку Т-клеток, генетически сконструированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления человек является резистентным по меньшей мере к одному химиотерапевтическому средству.

В одном из вариантов осуществления хронический лимфоцитарный лейкоз является рефрактерным CD19+ лейкозом и лимфомой.

Также изобретение относится к способу получения персистирующей популяции генетически сконструированных Т-клеток у человека с диагнозом злокачественного новообразования. В одном из вариантов осуществления способа включает введение человеку Т-клеток, генетически сконструированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, где персистирующая популяция генетически сконструированных Т-клеток сохраняется у человека в течение по меньшей мере одного месяца после введения.

В одном из вариантов осуществления персистирующая популяция генетически сконструированных Т-клеток содержит по меньшей мере одну клетку, выбранную из группы, состоящей из Т-клеток, которые вводили человеку, потомства Т-клеток, которые вводили человеку, и их комбинации.

В одном из вариантов осуществления персистирующая популяция генетически сконструированных Т-клеток включает Т-клетки памяти.

В одном из вариантов осуществления персистирующая популяция генетически сконструированных Т-клеток сохраняется у человека в течение по меньшей мере трех месяцев после введения. В другом варианте осуществления персистирующая популяция генетически сконструированных Т-клеток сохраняется у человека в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, двух или трех лет после введения.

В одном из вариантов осуществления подвергают лечению хронический лимфоцитарный лейкоз.

Изобретение также относится к способу экспансии популяции генетически сконструированных Т-клеток у человека с диагнозом злокачественного новообразования. В одном из вариантов осуществления способа включает введение человеку Т-клетки, генетически сконструированной для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимуляторную сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, где вводимая генетически сконструированная Т-клетка дает начало популяции потомства Т-клетки у человека.

В одном из вариантов осуществления потомство Т-клеток у человека включает Т-клетки памяти.

В одном из вариантов осуществления Т-клетка представляет собой аутологичную Т-клетку.

В другом варианте осуществления человек является резистентным по меньшей мере к одному химиотерапевтическому средству.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз. В другом варианте осуществления хронический лимфоцитарный лейкоз является рефрактерным CD19+ лейкозом и лимфомой.

В одном из вариантов осуществления популяция потомства Т-клетки сохраняется у человека по меньшей мере в течение трех месяцев после введения. В другом варианте осуществления популяция потомства Т-клетки сохраняется у человека по меньшей мере в течение четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати месяцев, двух или трех лет после введения.

В одном из вариантов осуществления злокачественное новообразование подвергают лечению.

Следующее ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет более понятным в комбинации с представленными чертежами. В целях иллюстрирования изобретения представлены чертежи к вариантам осуществления, предпочтительные в данный момент. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено точными условиями и средствами в вариантах осуществления, представленных на чертежах.

Фиг. 1, включающая фиг. 1А-1С, представляет собой серию изображений схематического представления вектора для передачи генов и трансгена, получения генномодифицированных Т-клеток и дизайна клинического протокола. на фиг. 1А изображены лентивирусные векторы и трансген, показаны главные функциональные элементы. Получали псевдотипированные белком G вируса везикулярного стоматита лентивирусные векторы клинической категории (обозначаемые рELPs 19BBz), регулирующие экспрессию scFv против CD19, полученных из моноклонального антитела мыши FMC63, шарнирный и трансмембранный домен CD8α человека, и сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека. Конститутивную экспрессию трансгена регулировали включением EF-1α (промотора фактора элонгации-1α), длинного концевого повтора LTR, rev-чувствительного элемента RRE (сPPT) и центральной терминирующей последовательности (CTS). Фигура не масштабирована, на фиг. 1В изображено получение Т-клеток. Аутологичные клетки получали аферезом, Т-клетки обогащали энтомиацией мононуклеарных клеток, промывали и остаточные лейкозные клетки удаляли добавлением парамагнитных бус, покрытых антителами против CD3/CD2 8, для позитивной селекции и активации Т-клеток. Лентивирусные векторы добавляли во время активации клеток и промывали на 3 день после начала культивирования. Клетки подвергали экспансии на устройстве с качающейся платформой (WAVE Bioreactor System) в течение 8-12 дней. В последний день культивирования бусы удаляли пропусканием через магнитное поле, собирали Т-клетки CART-19 и осуществляли криоконсервацию в инфильтрируемой среде. На фиг. 1С изображен дизайн клинического протокола. Пациентам проводили химиотерапию, направленную на снижение количества лимфоцитов, как описано, с последующей внутривенной капельной инфузией CART-19 #1 в течение 15-20 мин. Инфузию осуществляли с использованием подхода дробных доз в течение 3 дней (10, 30, 60%), начиная с 1-5 дня после завершения химиотерапии. Анализы по конечной точке осуществляли на 4 неделе исследования. По результатам активного мониторинга индивидуумов переводили на конечный протокол для последующего длительного наблюдения в соответствии с инструкциями FDA.

Фиг. 2, включающая фиг. 2А-2F, представляет собой серию изображений, на которых показаны устойчивая экспансия *in vivo* и поддержание клеток CART-19 в крови и костном мозге. ДНК, выделенную из цельной крови, как показано на фиг. 2А-2С, или костного мозга, как показано на фиг. 2D-2F, образцы, полученные от UPN 01, как показано на фиг. 2А и 2D, UPN 02, как показано на фиг. 2В и 2Е, и UPN 03, как показано на фиг. 2С и 2F, в совокупности подвергали Q-ПЦР с использованием сертифицированного анализа для детекции и количественного определения последовательностей CART-19. Каждая точка данных представляет собой среднее для измерений в трех повторениях с использованием 100-200 нг геномной ДНК с максимальным % CV менее чем 1,56%. Параметры прохождения/непрохождения для анализа включали заранее установленные диапазоны угла наклона кривой и эффективности амплификации и амплификацию референсного образца. Нижний предел количественного анализа, установленный по диапазону для стандартной кривой, составлял 2 копии трансгена/микрограмм геномной ДНК; объемы образцов ниже этого количества считаются приблизительными, и их представляют, если по меньшей мере в 2/3 повторов получали величину Ct с % CV для величин 15%. Осуществляли инфузию клеток CART-19 в день 0, 1 и 2 в случае UPN 01 и UPN 03 и дни 0, 1, 2 и 11 в случае UPN 02.

Фиг. 3, включающая фиг. 3А-3D, представляет собой серию изображений, на которых показаны уровни цитокинов в сыворотке и костном мозге до и после инфузии клеток CART; длительные измерения изменений цитокинов, хемокинов и цитокиновых рецепторов в сыворотке у UPN 01, как показано на фиг. 3А, UPN 02, как показано на фиг. 3В, и UPN 03, как показано на фиг. 3С, в один и тот же день после инфузии клеток CART-19 и серийные определения одних и тех же анализов в костном мозге UPN 03, как показано на фиг. 3D. Образцы подвергали мультиплексному анализу с использованием технологии анализа с помощью шариков Luminex и предварительно собранных и утвержденных наборов для мультиплексного анализа. Указывали аналиты с  $\geq 3$ -кратным изменением и строили графики в виде относитель-

ного изменения по сравнению с начальным уровнем, как показано на фиг. 3А-3С, или в виде абсолютных значений, как показано на фиг. 3Д. Абсолютные значения для каждого аналита в каждый момент времени получали с использованием стандартной кривой, построенной с помощью рекомбинантного белка по серии 3-кратных разведений из 8 точек с верхним и нижним пределами количественного анализа (ULOQ, LLOQ), определяемыми по 80-120% наблюдаемым/ожидаемым предельным значениям для стандартных кривых. Каждый образец оценивали в двух повторениях с вычислением средних значений и % CV, в большинстве случаев, менее 10%. Для удобства представления сводных данных в условиях широкого диапазона абсолютных значений данные представляют как кратное изменение относительно начального уровня для каждого аналита. В случаях, когда исходные значения являлись неопределенными, в качестве исходного значения использовали половину наименьшего значения на стандартной кривой. Диапазоны стандартной кривой для анализов и исходных (день 0) значений (указаны в круглых скобках последовательно для UPN 01, 02 и 03), все в пг/мл: IL1-Р $\alpha$ : 35,5-29318 (689, 301, 287); IL-6: 2,7-4572 (7, 10,1, 8,7); IFNy: 11,2-23972 (2,8, ND, 4,2); CXCL10: 2,1-5319 (481, 115, 287); MIP-1 $\beta$ : 3,3-7233 (99,7, 371, 174); MCP-1: 4,8-3600 (403, 560, 828); CXCL9: 48,2-3700 (1412, 126, 177); IL2-Р $\alpha$ : 13,4-34210 (4319, 9477, 610); IL-8: 2,4-5278 (15,3, 14,5, 14,6); IL-10: 6,7-13874 (8,5, 5,4, 0,7); MIP-1 $\alpha$ : 7,1-13778 (57,6, 57,3, 48,1).

Фиг. 4, включающая фиг. 4А-4Д, представляет собой серию изображений, на которых представлена длительная поверхностная экспрессия CART-19 и появление функциональных CAR памяти *in vivo*. На фиг. 4А изображено определение экспрессирующих CAR CD3+ лимфоцитов и отсутствие В-клеток в периферической крови и костном мозге. Свежеобработанные мононуклеарные клетки периферической крови или костного мозга, полученные из UPN 03 в день 169 после инфузии клеток CART-19, оценивали посредством проточной цитометрии на предмет поверхностной экспрессии CAR19 (вверху) или наличия В-клеток (внизу); в качестве контроля окрашивали PBMC, полученные от здорового донора ND365. Стратегия гейтинга для CD3+ и В-клеточной популяций представлена на фиг. 9. Для оценки экспрессии CAR19 в CD3+ лимфоцитах образцы одновременно окрашивали с использованием антител к CD14-PE-Cy7 и CD16-PE-Cy7 (разгрузочный канал) и CD3-FITC, позитивно гейтингованными на CD3+, и оценивали на предмет экспрессии CAR19 в CD8+ и CD8-популяциях лимфоцитов с помощью одновременного окрашивания с использованием CD8 $\alpha$ -PE и идиотипического антитела против CAR19, коньюгированного с Alexa-647. Данные на графиках гейтируют по популяции клеток, негативной по маркерам разгрузочного канала/CD3-позитивной. Для оценки наличия В-клеток образцы одновременно окрашивали с использованием антител к CD14-APC и CD3-FITC (разгрузочные каналы) и оценивали на наличие В-клеток в негативной по маркерам разгрузочного канала фракции посредством одновременного окрашивания с использованием антител к CD20-PE и CD19-PE-Cy-7. Во всех случаях квадранты негативного гейтинга определяли на неокрашенных контролях, как показано на фиг. 4В и 4С. Представлено Т-клеточное иммунофенотипирование CD4+ (фиг. 4В) и CD8+ (фиг. 4С) субпопуляций Т-клеток. Замороженные образцы периферической крови от UPN 03, полученные аферезом в день 56 и 169 после инфузии Т-клеток, хранили в течение ночи в среде для культивирования без дополнительных факторов, промывали и подвергали мультипараметрическому иммунофенотипированию на предмет экспрессии маркеров Т-клеточной памяти, активации и истощения. Как показано на фиг. 8, стратегия гейтинга включала исходное гейтингование на негативные по маркерам разгрузочного канала (CD14, CD16, Live/Dead Aqua) и CD3-позитивные клетки с последующим позитивным гейтингованием на CD4+ и CD8+ клетки. Дискриминационные окна и квадранты определяли с использованием контролей FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) или посредством гейтинга на позитивные популяции клеток (CD3, CD4, CD8) и четко определяли субпопуляции (CD27, CD28, CD57); для объективной визуализации событий данные представляли после биэкспоненциального преобразования. на фиг. 4Д изображена функциональная компетентность поддерживаемых клеток CAR. Замороженные образцы периферической крови от UPN 03, полученные аферезом в день 56 и 169 после инфузии Т-клеток, хранили в течение ночи в среде для культивирования без дополнительных факторов, промывали и оценивали непосредственно *ex vivo* на способность распознавать экспрессирующие CD19 клетки-мишени с использованием анализов дегрануляции с помощью CD107. После двухчасовой инкубации в присутствии антител против CD28, против CD49d и CD107-FITC смеси клеток собирали, промывали и подвергали мультипараметрическому анализу проточной цитометрией для оценки способности клеток CART-19 дегранулировать в ответ на экспрессирующие CD19 мишени. Стратегия гейтинга включает исходное гейтингование на негативные по маркерам разгрузочных каналов (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead Aqua) и CD3-PE-позитивные клетки с последующим гейтингованием на окрашенные техасским красным CD8-PE-позитивные клетки; представлены данные для гейтированной по CD8+ популяции, во всех случаях квадранты негативного гейтинга определяли по неокрашенным контролям.

Фиг. 5, включающая фиг. 5А-5С, представляет собой серию изображений, на которых представлены результаты экспериментов по оценке клинических ответов после инфузии клеток CART-19. на фиг. 5А показано, что UPN 02 лечили двумя циклами ритуксимаба и бендамустина с минимальным ответом (R/B, показано стрелкой), инфузировали Т-клетки CART-19, начиная с 4 дней после лечения только бендамустином (B, показано стрелкой). Ритуксимаб и бендамустин-резистентные лейкозные клетки быстро вы-

водили из крови, на что указывает снижение абсолютного количества лимфоцитов (ALC) с 60600/мкл до 200/мкл в течение 18 дней после инфузии. Лечение кортикоидами начинали в день 18 после инфузии по причине дискомфорта и неинфекционного фебрильного синдрома. Референсной линией (пунктиром) указывают верхний предел нормы ALC. на фиг. 5В изображены результаты примеров эксперимента по окрашиванию серийных срезов костного мозга или образцов тромбов от пациентов UPN 01 и 03 на CD20. Инфильтрация лейкозными клетками, присутствовавшая у обоих пациентов перед лечением, отсутствовала в образцах после лечения, что сочеталось с нормализацией насыщенности клетками и трехлинейного гемопоэза. UPN 01 не имел каких-либо определяемых клеток CLL при оценке посредством проточной цитометрии, цитогенетического исследования и флуоресценции при гибридизации *in situ* или нормальных В-клеток, определяемых посредством проточной цитометрии в костном мозге или крови. UPN 03 имел 5% остаточных нормальных CD5-негативных В-клеток, что подтверждало посредством проточной цитометрии в день +23, также показавшей их поликлональность; не определяли нормальные В-клетки в день +176. На фиг. 5С изображены результаты экспериментов с использованием серийного КТ-сканирования для оценки быстрого разрешения резистентной к химиотерапии генерализованной лимфаденопатии. Билатеральные подмышечные опухоли разрешались в день 83 (UPN 01) и 31 (UPN 03) после инфузии, что указано на фигуре стрелками и кругом.

Фиг. 6, включающая фиг. 6А-6С, представляет собой серию изображений, на которых показаны абсолютные количества лимфоцитов и общее количество циркулирующих клеток CART-19+ в случае UPN 01, 02, 03. Общее количество лимфоцитов (общее количество нормальных и CLL клеток) относительно общего количества циркулирующих CART-19+ клеток представлено в виде графика для 3 индивидуумов с использованием абсолютного количества лимфоцитов из значений СВС и с учетом объема крови 5,0 л. Общее количество циркулирующих клеток CART-19 вычисляли с использованием последовательных значений СВС с абсолютными количествами лимфоцитов и маркерными значениями при Q-ПЦР, как показано на фиг. 2, преобразуя копии/нг ДНК в средний % маркерного значения, как представлено в настоящем описании. Обнаруживали, что % маркерного значения Q-ПЦР близко коррелирует (<2-кратная разброс) с характеристиками продуктов для инфузии при проточной цитометрии и с данными для образцов, где с помощью сопутствующих данных проточной цитометрии можно напрямую подсчитывать клетки CART-19 посредством окрашивания.

Фиг. 7, включающая фиг. 7А-7Д, представляет собой серию изображений, на которых показаны эксперименты, включающие прямое определение *ex vivo* CART-19-позитивных клеток в PBMC UPN 01 в день 71 после инфузии Т-клеток. PBMC UPN 01 собирали сразу после афереза в день 71 после инфузии, или замораживали во время афереза для получения Т-клеточного продукта (исходный уровень) и размораживали жизнеспособными перед окрашиванием, подвергали анализу проточной цитометрией для определения наличия клеток CART-19, экспрессирующих молекулу CAR19 на поверхности. Для оценки экспрессии CAR19 на лимфоцитах образцы одновременно окрашивали с использованием CD3-PE и идиотипического антитела против CAR19, коньюгированного с Alexa-647, или одновременно окрашивали только с использованием CD3-PE (FMO для CAR19). На фиг. 7А показано, что исходное гейтирование для лимфоцитов проводили на основе прямого и углового светорассеяния (FSC и SSC) с последующим гейтированием на CD3+ клетки. На фиг. 7В изображено дискриминационное окно для CD3+ лимфоцитов; на фиг. 7С изображено окрашивание с использованием идиотипических антител против CAR; на фиг. 7Д изображено идиотипическое FMO к CAR. Проводили CAR19-позитивное гейтирование на образцы CAR19 FMO.

Фиг. 8, включающая фиг. 8А-8С, представляет собой серию изображений, на которых показана стратегия гейтирования для определения экспрессии CART-19 с использованием многоцветной проточной цитометрии образцов крови UPN 03. Стратегия гейтирования на фиг. 8С представлена для образца UPN 03 в день 56 и характерна для стратегии, используемой для образца UPN 03 в день 169. На фиг. 8А изображено первичное дискриминационное окно: негативное по маркерам разгрузочного канала (CD14, CD16, Live/Dead Aqua), CD3-позитивное. На фиг. 8В изображены вторичные дискриминационные окна: CD4-позитивное, CD8-позитивное. На фиг. 8С изображены третичные дискриминационные окна: CAR19-позитивное и CAR19-негативное, устанавливаемые на образцах CAR FMO (крайние правые панели).

На фиг. 9 изображена стратегия гейтирования для прямого определения экспрессии CART-19 и В-клеток в образцах крови и костного мозга. Стратегия гейтирования на фиг. 4А, на которой показано определение экспрессирующих CAR CD3+ лимфоцитов и отсутствие В-клеток в периферической крови и костном мозге: левый график: гейтирование для клеток; верхняя панель: позитивное гейтирование на CD3+ клетки, нижняя панель: негативное гейтирование (CD14-негативное, CD3-негативное) на В-клетки, NC365, контрольные клетки из периферической крови здорового донора.

Фиг. 10 представляет собой изображение, на котором приведены демографические данные пациентов и ответы.

На фиг. 11 изображен способ получения клеток CART-19.

Фиг. 12, включающая фиг. 12А-12Д, представляет собой серию изображений, на которых показан клинический ответ пациента. На фиг. 12А представлен лентивирусный вектор, используемый для транс-

дукции Т-клеток от пациента. Получали псевдотипированные белком G вируса везикулярного стоматита лентивирусные векторы клинической категории (pELP 19-BB-z), регулирующие экспрессию scFv против CD19, получаемых из моноклонального антитела мыши FMC63, шарнирного и трансмембранных доменов CD8α человека и сигнальных доменов 4-1BB и CD3ζ человека. Элементы трансгена CAR19, в нижней части фиг. 12А представлены основные функциональные элементы. Фигура не масштабирована. 3'LTR означает длинный 3'-концевой повтор; 5'LTR - длинный 5'-концевой повтор; Amp R - ген резистентности к ампидиллину; бычий GH поли-А - бычий гормон роста с полиадениновым хвостом; cPPT/CTS - центральный полипуриновый тракт с центральным стоп-кодоном; EF-1α - фактор элонгации 1-альфа; env - оболочка; gag - группоспецифичный антиген; pol - ген ВИЧ, кодирующий полимеразу и обратную транскриптазу; R - повтор; RRE - rev-чувствительный элемент; scFv - одноцепочный вариабельный фрагмент; TM трансмембранный домен; и WPRE - посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесного сурка. На фиг. 12В показаны уровни креатинина, мочевой кислоты и лактатдегидрогеназы (LDH) в сыворотке в дни 1-28 после первой инфузии клеток CART-19. Пиковые уровни совпадали с госпитализацией с синдромом распада опухоли. На фиг. 12С изображены биоптаты костного мозга, полученные через 3 дня после химиотерапии (день -1, до инфузии клеток CART-19) и через 23 дня и 6 месяцев после инфузии клеток CART-19 (гематоксилин и эозин). На исходном образце показан гиперпластический костный мозг (60%) с трехлинейным гемопоэзом, инфильтрированный, главным образом, интерстициальными агрегатами небольших зрелых лимфоцитов, на долю которых приходится 40% от общей клеточности. В образце, полученном в день 23, обнаруживали остаточные лимфоидные агрегаты (10%), являвшиеся негативными для хронического лимфоидного лейкоза (CLL), со смесью Т-клеток и CD5-негативных В-клеток. В образце, полученном через 6 месяцев после инфузии, обнаруживали трехлинейный гемопоэз без лимфоидных агрегатов и продолжительным отсутствием CLL. На фиг. 12Д показаны срезы КТ с контрастным усилением, полученные до включения пациента в исследование и через 31 день и 104 дня после первой инфузии. На срезах КТ перед инфузией обнаруживали билатеральные опухоли размером 1-3 см. Ремиссия подмышечной лимфаденопатии происходила в течение 1 месяца после инфузии и являлась длительной. Стрелками указаны различные увеличенные лимфоузлы до терапии и ответы в лимфатических узлах на аналогичных срезах КТ после терапии.

Фиг. 13, включающая фиг. 13А-13Е, представляет собой серию изображений, на которых показаны уровни цитокинов в сыворотке и костном мозге до и после инфузии Т-клеток с химерным антигенным рецептором. Серийные измерения цитокина интерферона γ (фиг. 13А), интерферон-γ-стимулированных хемокинов CXС-хемокина 10 (CXCL10) (фиг. 13В), CXС-хемокина 9 (CXCL9) (фиг. 13С) и интерлейкина-6 (фиг. 13Д) проводили в указанные моменты времени. Повышения этих воспалительных цитокинов и хемокинов совпадали с началом синдрома распада опухоли. Низкие уровни интерлейкина-6 определяли на начальном уровне, в то время как исходные уровни интерферона γ, CXCL9 и CXCL10 находились ниже пределов определения. Диапазоны стандартной кривой для аналитов и исходные значения у пациента, указанные в круглых скобках, являлись следующими: интерферон γ - от 11,2 до 23972 пг на миллилитр (1,4 пг на миллилитр); CXCL10 - от 2,1 до 5319 пг на миллилитр (274 пг на миллилитр); CXCL9 - от 48,2 до 3700 пг на миллилитр (177 пг на миллилитр); интерлейкин-6 - от 2,7 до 4 572 пг на миллилитр (8,3 пг на миллилитр); фактор некроза опухоли α (TNF-α) - от 1,9 до 4005 пг на миллилитр (неопределено) и растворимый рецептор интерлейкина-2 - от 13,4 до 34210 пг на миллилитр (644 пг на миллилитр). На фиг. 13Е показана индукция иммунного ответа в костном мозге. Уровни цитокинов TNF-α, интерлейкина-6, интерферона γ, хемокина CXCL9 и растворимого рецептора интерлейкина-2 измеряли в супернатантах, полученных из аспиратов костного мозга в указанные дни до и после инфузии клеток CART-19. Повышения уровней интерлейкина-6, интерферона γ, CXCL9 и растворимого рецептора интерлейкина-2 совпадали с синдромом распада опухоли, пиком инфильтрации Т-клетками с химерным антигенным рецептором и устранением лейкозного инфильтрата.

Фиг. 14, включающая фиг. 14А-14С, представляет собой серию изображений, на которых изображены экспансия и поддержание Т-клеток с химерным антигенным рецептором *in vivo*. Геномную ДНК (gDNA) выделяли из образцов цельной крови (фиг. 14А) и аспиратов костного мозга (фиг. 14В) пациента, собранных в последовательные моменты времени до и после инфузии Т-клеток с химерным антигенным рецептором, и использовали для анализа посредством количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР). По результатам оценки на основе трансгенной ДНК и процентной доли лимфоцитов, экспрессирующих CAR19, Т-клетки с химерным антигенным рецептором подвергались экспансии до уровней более чем в 1000 раз выше исходных уровней энgraftmenta в периферической крови и костном мозге. Пиковые уровни Т-клеток с химерным антигенным рецептором коррелировали по времени с синдромом распада опухоли. Образец крови, полученный в день 0, и образец костного мозга, полученный в день 1, не демонстрировали сигнала при ПЦР на начальном уровне. Анализ проточной цитометрией аспиратов костного мозга на начальном уровне (фиг. 14С) показал преимущественную инфильтрацию CD19+CD5+ клетками, являющимися клонами по результатам оценки посредством окрашивания на легкую каппа-цепь иммуноглобулинов, с небольшим количеством Т-клеток. В день 31 после инфузии присутствовали CD5+ Т-клетки и не определяли нормальных или злокачественных В-клеток.

Числами указана относительная частота клеток в каждом квадранте. И ось x, и ось y представлены в виде шкалы  $\log_{10}$ . Стратегия гейтирования включала исходное гейтирование на CD19+ и CD5+ клетки (квадраты слева) и последующее определение экспрессии каппа- и лямбда-цепей иммуноглобулина на субпопуляции CD19+CD5+ (квадраты справа).

#### Подробное описание

Изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественного новообразования, включая, в качестве неограничивающих примеров, гематологические злокачественные новообразования и солидные опухоли. Настоящее изобретение относится к стратегии адоптивного переноса Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). CAR являются молекулами, в которых комбинируют антительную специфичность к желаемому антигену (например, опухолевому антигену) с активирующим Т-клеточный рецептор внутриклеточным доменом для получения химерного белка, проявляющего специфичную противоопухолевую клеточную иммунную активность.

Настоящее изобретение, главным образом, относится к применению Т-клеток, генетически модифицированных для стабильной экспрессии желаемого CAR. Т-клетки, экспрессирующие CAR, в настоящем описании обозначают как клетки CART или модифицированные Т-клетки с CAR. Предпочтительно клетку можно генетически модифицировать для стабильной экспрессии антигенсвязывающего домена на ее поверхности, придающего новую антигенную специфичность, являющуюся МНС-независимой. В некоторых случаях Т-клетку генетически модифицируют для стабильной экспрессии CAR, в котором комбинируют антиген-распознавающий домен конкретного антитела с внутриклеточным доменом CD3-дзета-цепи или белка Fc $\gamma$ RI в одном химерном белке.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит внеклеточный домен, содержащий антиген-распознавающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, который в природе ассоциирован с одним из доменов в CAR. В другом варианте осуществления трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать посредством замены аминокислоты для избежания связывания таких доменов с трансмембранными доменами одинаковых или различных белков на поверхности мембраны для минимизации взаимодействий с другими компонентами рецепторного комплекса. Предпочтительно трансмембранный домен является шарнирным доменом CD8 $\alpha$ .

Что касается цитоплазматического домена, CAR по изобретению можно конструировать содержащим сигнальный домен CD28 и/или 4-1BB сам по себе или в комбинации с любыми другими желаемыми цитоплазматическими доменами, применимыми в условиях CAR по изобретению. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен CAR можно конструировать дополнительно содержащим сигнальный домен CD3-дзета. Например, цитоплазматический домен CAR может включать, в качестве неограничивающих примеров, сигнальные модули CD3-дзета, 4-1BB и CD28 и их комбинации. Таким образом, изобретение относится к клеткам CART и способам их применения для адоптивной терапии.

В одном из вариантов осуществления клетки CART по изобретению можно получать введением лентивирусных векторов, содержащих желаемый CAR, например CAR, содержащий антиген-распознавающий домен против CD19, шарнирный и трансмембранный домен CD8 $\alpha$  и сигнальные домены 4-1BB человека и CD3-дзета, в клетки. Клетки CART по изобретению способны воспроизводиться *in vivo*, что приводит к длительному поддержанию, которое может приводить к длительному контролю опухоли.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к введению генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, для лечения пациента, имеющего злокачественное новообразование или риск развития злокачественного новообразования, с использованием инфузии лимфоцитов.

Предпочтительно в лечении используют инфузию аутологичных лимфоцитов. Аутологичные РВМС забирают у пациента, нуждающегося в лечении, и активируют и экспандируют Т-клетки с использованием способов, представленных в настоящем описании и известных в этой области, и затем инфузируют обратно пациенту.

В еще одном варианте осуществления изобретение, главным образом, относится к лечению пациента с риском развития CLL. Изобретение также включает лечение злокачественного новообразования или аутоиммунного заболевания, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия пациента приводит к значительной иммуносупрессии у пациента, таким образом, повышая риск развития CLL у пациента.

Изобретение включает применение Т-клеток, экспрессирующих CAR против CD19, включающих костимуляторный домен CD3-дзета и 4-1BB, (также обозначаемых как Т-клетки CART-19). Т-клетки CART-19 по изобретению можно подвергать устойчивой экспансии *in vivo*, и они могут служить основой для CD19-специфичных клеток памяти, высокие уровни которых сохраняются в течение продолжительного периода времени в крови и костном мозге. В некоторых случаях Т-клетки CART-19 по изобретению, инфицируемые пациенту, могут устранять лейкозные клетки *in vivo* у пациентов с резистентным к химиотерапии CLL на поздней стадии. Однако изобретение не ограничено Т-клетками CART-19. Т.е. изобретение включает любую антигенсвязывающую молекулу, подвернутую слиянию с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и любой их комбинации.

### Определения

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значение, общепринятое специалистами в той области, к которой относится изобретение. Хотя в практическом осуществлении для тестирования настоящего изобретения можно использовать любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные представленным в настоящем описании, предпочтительные материалы и способы представлены в настоящем описании. В описании и формуле настоящего изобретения будут использовать изложенную ниже терминологию.

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

В настоящем описании единственное число применяют для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или несколько элементов.

Как применяют в настоящем описании, "приблизительно" в отношении измеряемого значения, такого как количество, продолжительность времени и т.п., предназначено для включения вариантов  $\pm 20\%$  или  $\pm 10\%$ , более предпочтительно -  $\pm 5\%$ , даже более предпочтительно -  $\pm 1\%$  и еще более предпочтительно  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, т.к. такие варианты подходят для осуществления описываемых способов.

Как применяют в настоящем описании, "активация" относится к состоянию Т-клетки, которую в достаточной степени стимулировали для индукции определяемой клеточной пролиферации. Активация также может ассоциироваться с индуцируемой продукцией цитокинов и определяемыми эффекторными функциями. В частности, термин "активированные Т-клетки" относится к Т-клеткам, проходящим деление клеток.

Как применяют в настоящем описании, термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, специфически связывающейся с антигеном. Антитела могут являться интактными иммуноглобулинами, полученными из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут являться иммунореактивными частями интактных иммуноглобулинов. Антитела, как правило, являются тетramerами молекул иммуноглобулинов. В настоящем изобретении антитела могут существовать во многих 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, In: *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, in: *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 к антиген-распознающим вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, в качестве неограничивающих примеров, Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и Fv-фрагменты, линейные антитела, scFv-антитела и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

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

Как применяют в настоящем описании, "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их природных конформациях.  $\kappa$ - и  $\lambda$ -легкие цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела.

Как применяют в настоящем описании, термин "синтетическое антитело" означает антитело, получаемое с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такое как, например, антитело, экспрессируемое бактериофагом, как представлено в настоящем описании. Термин также необходимо интерпретировать как означающий антитело, получаемое синтезом молекулы ДНК, кодирующую антитело, и с помощью которой экспрессируется белок антитела или аминокислотная последовательность, определяющая антитело, где ДНК или аминокислотную последовательность получают с использованием технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, доступной и хорошо известной в этой области.

Как применяют в настоящем описании, термин "антиген" или "Ag" определяют как молекулу, провоцирующую иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать продукцию антител или активацию специфических иммунологически компетентных Т-клеток, или и то, и другое. Специалистам в этой 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. Специалистам в этой области будет понятно, что любая ДНК, содержащая нуклеотидные последовательности или неполную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, вызывающий иммунный ответ, таким образом, кодирует "антиген" в том виде, в котором этот термин используют в настоящем описании. Кроме того, специалисту в этой области будет понятно, что антиген необязательно кодирует исключительно полноразмерная нуклеотидная последовательность гена. Вполне очевидно, что настоящее изобретение в качестве неограничивающих примеров относится к применению неполных нуклеотидных последовательностей нескольких генов, и что эти нуклеотидные последовательности рас-

полагаются в различных комбинациях для стимуляции желаемого иммунного ответа. Кроме того, специалистам в этой области будет понятно, что антиген совершенно необязательно кодирует "ген". Вполне очевидно, что антиген можно синтезировать или его можно получать из биологического образца. Такой биологический образец может включать, в качестве неограничивающих примеров, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Как применяют в настоящем описании, термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому эффекту, который может проявляться снижением объема опухоли, снижением количества опухолевых клеток, снижением количества метастазов, повышением продолжительности жизни или снижением различных физиологических симптомов, ассоциированных со злокачественным новообразованием. "Противоопухолевый эффект" также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению в первую очередь участвовать в профилактике развития опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением термин "автоантиген" означает любой собственный антиген, который иммунная система ошибочно распознает как чужеродный. Аутоантигены включают, в качестве неограничивающих примеров, клеточные белки, фосфопротеины, поверхностные белки клетки, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая поверхностные рецепторы клетки.

Как применяют в настоящем описании, термин "автоиммунное заболевание" определяют как нарушение, являющееся результатом аутоиммунного ответа. Аутоиммунное заболевание является результатом неадекватного и избыточного ответа на собственный антиген. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, в качестве неограничивающих примеров, среди прочего, болезнь Адисона, очаговую аlopению, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (типа 1), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, миастению, обыкновенную пузырчатку, псориаз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит.

Как применяют в настоящем описании, термин "аутологичный" предназначен для обозначения любого материала, полученного от того же индивидуума, которому позже его вводят.

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

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

Как применяют в настоящем описании, термин "злокачественное новообразование" определяют как заболевание, отличающееся быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться местно или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных злокачественных новообразований включают, в качестве неограничивающих примеров, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, злокачественные новообразования головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п.

Как применяют в настоящем описании, термин "костимуляторный лиганд" включает молекулу на антигенпредставляющей клетке (например, аAPC, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), специфически связывающую родственную костимуляторную молекулу 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, в качестве неограничивающих примеров, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимуляторный лиганд может включать, в качестве неограничивающих примеров, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцильный костимуляторный лиганд (ICOS-L), внутриклеточную молекулу адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, связывающееся с Toll-подобным рецептором, и лиганд, специфически связывающийся с B7-H3. Костимуляторный лиганд также включает, помимо прочего, антитело, специфически связывающееся с костимуляторной молекулой, присутствующей на Т-клетке, в качестве неограничивающих примеров, такой как CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, специфически связывающийся с CD83.

"Костимуляторная молекула" относится к родственному партнеру по связыванию на Т-клетке, специфически связывающемуся с костимуляторным лигандом, таким образом, опосредующему костимуляторный ответ Т-клетки, в качестве неограничивающих примеров, такой как пролиферация. Костимуляторные молекулы включают, в качестве неограничивающих примеров, молекулу МНС класса I, BTLA и Toll-подобный рецептор.

Как применяют в настоящем описании, "костимуляторный сигнал" относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к Т-клеточной пролиферации и/или позитивной регуляции или негативной регуляции ключевых молекул.

"Заболевание" является состоянием здоровья животного, где животное не может поддерживать гомеостаз и где, если заболевание не облегчает, то здоровье животного продолжает ухудшаться. Наоборот, "нарушение" у животного является состоянием здоровья, при котором животное способно поддерживать

гомеостаз, но состояние здоровья животного является менее благоприятным, чем оно бы было в отсутствие нарушения. Если его не лечить, нарушение не обязательно приводит к ухудшению состояния здоровья животного.

Как применяют в настоящем описании, "эффективное количество" означает количество, обеспечивающее терапевтическую или профилактическую пользу.

"Кодирующий" относится к неотъемлемому свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить матрицами для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и, в результате, биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если в результате транскрипции и трансляции мРНК, соответствующей этому гену, в клетке или другой биологической системе образуется белок. И кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой является идентичной последовательности мРНК и которую, как правило, представляют в списках последовательностей, и некодирующую цепь, используемую в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, можно обозначать как кодирующую белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Как применяют в настоящем описании, "эндогенный" относится к любому материалу из организма, клетки, ткани или системы или материалу, продуцируемому в организме, клетке, ткани или системе.

Как применяют в настоящем описании, термин "экзогенный" относится к любому материалу, вводимому в организм, клетку, ткань или систему, или продуцируемому вне организма, клетки, ткани или системы.

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

"Экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности, контролирующие экспрессию, функционально связанные с подлежащей экспрессии нуклеотидной последовательностью. Экспрессирующий вектор содержит соответствующие цис-активные элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии можно восполнять элементами клетки-хозяина или в системе экспрессии *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все векторы, известные в этой области, такие как космиды, плазиды (например, безоболочные или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденоассоциированные вирусы), включающие рекомбинантный полинуклеотид.

"Гомологичный" относится к сходству последовательностей или идентичности последовательностей двух полипептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Если положение в двух сравниваемых последовательностях занято одним и тем же основанием или аминокислотой, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы являются гомологичными в этом положении, процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадений или гомологичных положений для двух последовательностей, разделенного на количество 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 имеют 50% гомологии. Как правило, сравнение осуществляют при выравнивании двух последовательностей для получения максимальной гомологии.

Как применяют в настоящем описании, термин "иммуноглобулин" или "Ig" определяют как класс белков, функционирующих как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда обозначают как BCR (В-клеточный рецептор) или антигенный рецептор. Пятью членами этого класса белков являются IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA является первичным антителом, присутствующим 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 в агглютинации, связывании комплемента и других гуморальных ответах и важен в защите против бактерий и вирусов. IgD является иммуноглобулином, не обладающим известными функциями антител, но он может служить в качестве антигенного рецептора. IgE является иммуноглобулином, опосредующим гиперчувствительность немедленного типа, вызывая высвобождение медиаторов из тучных клеток и базофилов после воздействия аллергена.

Как применяют в настоящем описании, "инструкция" включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое средство выражения, которое можно использовать для представления применимости композиций и способов по изобретению. Например, инструкцию к набору по изобретению можно прикреплять к контейнеру, содержащему нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию по изобретению, или транспортировать вместе с контейнером, содержащим нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. Альтернативно, инструкцию можно транспортировать отдельно от контейнера с целью совместного использования инструкции и соединения получателем.

"Выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в природе присутствующие в животном, не являются "выделенными", но те

же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от материалов, сопутствующих им в их природном состоянии, являются "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать, по-существу, в очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

В контексте настоящего изобретения используют следующие аббревиатуры для повсеместно встречающихся оснований нуклеиновых кислот. "A" относится к аденоzinу, "C" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "T" относится к тимидину и "U" относится к уридину.

Если не указано иначе, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, являющиеся вырожденными версиями друг друга и кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или РНК" также может включать интроны в случае, если нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, в некоторых версиях может содержать интроны.

Как применяют в настоящем описании, "лентивирус" относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов, т.к. способны инфицировать неделяющиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в виде ДНК в клетку-хозяина, таким образом, они представляют собой один из наиболее эффективных способов реализации вектора для доставки гена. ВИЧ, SIV и FIV являются примерами лентивирусов. Векторы, полученные из лентивирусов, представляют средства достижения значительных уровней передачи генов *in vivo*.

Как применяют в настоящем описании, термин "модуляция" означает опосредование определяемого повышения или снижения уровня ответа у индивидуума по сравнению с уровнем ответа у индивидуума в отсутствие лечения или соединения и/или по сравнению с уровнем ответа у иным образом идентичного, но не подвергнутого лечению индивидуума. Термин включает возмущение

сигнала и/или воздействие на нативный сигнал или ответ, таким образом, опосредующее благоприятный терапевтический ответ у индивидуума, предпочтительно, человека.

Если не указано иначе, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность", включает все нуклеотидные последовательности, являющиеся вырожденными версиями друг друга и кодирующие одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки и РНК, могут включать интроны.

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

Термин "гиперэкспрессированный" опухолевый антиген или "гиперэкспрессия" 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 гематологическими злокачественными новообразованиями, отличающимися гиперэкспрессией опухолевого антигена, можно определять стандартными анализами, известными в этой области.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (s.c), внутривенную (i.v.), внутримышечную (i.m.) или интрастернальную инъекцию или инфузионные способы.

Термины "пациент", "индивидуум" и т.п. используют в настоящем описании взаимозаменямо, и они относятся к любому животному или его клеткам *in vitro* или *in situ*, поддающимся воздействию способами, представленными в настоящем описании. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления пациент или индивидуум является человеком.

Как применяют в настоящем описании, термин "полинуклеотид" определяют как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты являются полимерами нуклеотидов. Таким образом, как применяют в настоящем описании, термины нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды являются взаимозаменяемыми. Специалист в этой области имеет общие знания о том, что нуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами, которые можно гидролизовать до мономерных "нуклеотидов". Мономерные нуклеотиды можно гидролизовать в нуклеозиды. Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПЦР и т.п., и способами синтеза.

Как применяют в настоящем описании, термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют вза-

имозаменямо, 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 ограничений по максимальному количеству аминокислот, которые может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Как применяют в настоящем описании, термин относится и к коротким цепям, также общепринято обозначаемым в этой области, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, и к более длинным цепям, как правило, обозначаемым в этой области как белки, множество типов которых существует. "Полипептиды" включают, помимо прочего, например, биологически активные фрагменты, по-существу, гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитные белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

Как применяют в настоящем описании, термин "промотор" определяют как последовательность ДНК, распознаваемую синтетическим аппаратом клетки или встраиваемым синтетическим аппаратом, необходимым для инициации конкретной транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Как применяют в настоящем описании, термин "промотор/регуляторная последовательность" означает последовательность нукleinовой кислоты, необходимую для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промотором/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может являться коровой последовательностью промотора, а в других случаях эта последовательность также может включать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, необходимые для экспрессии продукта гена. Промотор/регуляторная последовательность, например, может являться последовательностью, экспрессирующей продукт гена тканеспецифическим образом.

"Конститутивный" промотор является нуклеотидной последовательностью, которая, если функционально связана с полинуклеотидом, кодирующем или определяющим продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке в большинстве или всех физиологических условиях в клетке.

"Индуцибельный" промотор является нуклеотидной последовательностью, которая, если функционально связана с полинуклеотидом, кодирующем или определяющим продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке, по-существу, только когда индуцирующий фактор, соответствующий промотору, присутствует в клетке.

"Тканеспецифический" промотор является нуклеотидной последовательностью, которая, если функционально связана с полинуклеотидом, кодирующем или определяющим продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке, по-существу, только когда клетка представляет собой клетку ткани типа, соответствующего промотору.

Как применяют в настоящем описании, термин "специфически связывается" в отношении антитела означает антитело, распознавающее конкретный антиген, но, по-существу, не распознавающее или связывающее другие молекулы в образце. Например, антитело, специфически связывающееся с антигеном одного вида, также может связываться с этим антигеном одного или нескольких видов. Но такая межвидовая реактивность сама по себе не изменяет классификацию антитела как специфичного. В другом примере антитело, специфически связывающееся с антигеном, также может связываться с различными альтернативными формами антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не изменяет классификацию антитела как специфичного. В некоторых случаях термины "специфическое связывание" или "специфически связывающееся" можно использовать по отношению к взаимодействию антитела, белка или пептида со вторым химическим веществом, обозначая, что это взаимодействие зависит от наличия конкретной структуры (например, антигенные детерминанты или эпигоптипа) в химическом веществе; например, антитело распознает и связывается с конкретной белковой структурой чаще, чем с белками в общем. Если антитело специфично для эпигоптипа "A", наличие молекулы, содержащей эпигоптип A (или свободного немеченого A), в реакции, включающей меченный "A" и антитело, будет снижать количество меченого A, связавшегося с антителом.

Термин "стимуляция" означает первичный ответ, индуцируемый связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с ее родственным лигандом, таким образом, опосредуя передачу сигнала, в качестве неограничивающих примеров, такую как, передача сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию конкретных молекул, например негативную регуляцию TGF- $\beta$ , и/или распознавание структур цитоскелета и т.п.

Как применяют в настоящем описании, термин "стимулирующая молекула" означает молекулу на Т-клетке, специфически связывающуюся с родственным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигепредставляющей клетке.

Как применяют в настоящем описании, "стимулирующий лиганд" означает лиганд, который при наличии на антигепредставляющей 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-клетки, включая, в качестве неограничивающих примеров, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды хорошо известны в этой области и включают, помимо прочего,

молекулу МНС класса I, нагруженную пептидом, антитело против CD3, суперагонист антитела против CD28 и суперагонист антитела против CD2.

Термин "индивидуум" предназначен для включения живых организмов, в которых можно вызывать иммунный ответ (например, млекопитающих). Примеры индивидуумов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные особи.

Как применяют в настоящем описании, "по-существу, очищенные" клетки являются клетками, по-существу, не содержащими другие типы клеток. По-существу, очищенная клетка также относится к клетке, отделенной от других типов клеток, которые в норме ей сопутствуют в своем природном состоянии. В некоторых случаях популяция, по-существу, очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто к клетке, отделенной от клеток, которые в природе ей сопутствуют в своем природном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления клетки не культивируют *in vitro*.

Как применяют в настоящем описании, термин "терапевтический" означает лечение и/или профилактику.

Терапевтического эффекта достигают супрессией, ремиссией или устраниением состояния заболевания.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству заявленного соединения, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы или индивидуума, которого добивается исследователь, ветеринар, врач или другой клиницист. Термин "терапевтически эффективное количество" включает количество соединения, которое при введении является достаточным для профилактики развития или, до некоторой степени, снижения одного или нескольких признаков или симптомов нарушения или заболевания, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. индивидуума, подлежащего лечению.

Как применяют в настоящем описании, термин "лечить" заболевание означает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, которым страдает индивидуум.

Как применяют в настоящем описании, термин "трансфицированный", "трансформированный" или "трансдуцированный" относится к способу, которым экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или встраивают в клетку-хозяина. "Трансфицированная", "трансформированная" или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, трансфицированную, трансформированную или трансдуцированную с использованием экзогенной нуклеиновой кислоты. Клетка включает первичную подвергаемую воздействию клетку и ее потомство.

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

"Вектор" является интересующей композицией, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В этой области известно множество векторов, включая, в качестве неограничивающих примеров, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, ассоциированные с ионными или амфи菲尔ными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Термин также необходимо интерпретировать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, облегчающие перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновые соединения, липосомы и т.п. Примеры вирусных векторов включают, в качестве неограничивающих примеров, аденоизирические векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы и т.п.

Диапазоны: на всем протяжении этого описания различные аспекты изобретения можно представлять в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона представлено исключительно для удобства и краткости, и их не следует интерпретировать как жесткие ограничения объема изобретения. Таким образом, описание диапазона следует рассматривать как содержащее все возможные конкретно описываемые поддиапазоны, а также отдельные численные значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать 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 используют независимо от широты диапазона.

### Описание

Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественного новообразования, помимо прочих заболеваний. Злокачественное новообразование может являться гематологическим злокачественным новообразованием, солидной опухолью, первичной или метастазирующей опухолью.

Предпочтительно злокачественное новообразование является гематологическим злокачественным

новообразованием и более предпочтительно злокачественное новообразование представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). Другие заболевания, поддающиеся лечению с использованием композиций и способов по изобретению, включают вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, а также аутоиммунные заболевания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к клетке (например, Т-клетке), сконструированной для экспрессии CAR, где Т-клетка с CAR проявляет противоопухолевое свойство. CAR по изобретению можно конструировать содержащим внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, слитный с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи комплекса Т-клеточного антигенного рецепторного комплекса (например, CD3-дзета). CAR по изобретению при экспрессии в Т-клетке способен перенаправлять распознавание антигена на основании специфичности связывания антигена. Примером антигена является CD19, т.к. этот антиген экспрессируется на злокачественных В-клетках. Однако изобретение не ограничено воздействием на CD19. Т.е. изобретение включает любую антигенсвязывающую молекулу, которая при связывании с ее родственным антигеном действует на опухолевую клетку таким образом, что опухолевая клетка прекращает рост, или вызывают ее гибель, или иначе влияют на нее таким образом, что снижают или удаляют опухолевую массу у пациента. Антигенсвязывающую молекулу предпочтительно подвергают слиянию с внутриклеточным доменом от одной или нескольких костимуляторных молекул и дзета-цепи.

Предпочтительно, антигенсвязывающую молекулу подвергают слиянию с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3-дзета и любой их комбинации.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит сигнальный домен CD137 (4-1BB). Это является результатом того, что настоящее изобретение частично основано на обнаружении того, что CAR-опосредованные Т-клеточные ответы можно дополнительного усиливать добавлением костимуляторных доменов. Например, включение сигнального домена CD137 (4-1BB) значительно повышает противоопухолевую активность и поддержание Т-клеток с CAR *in vivo* по сравнению с идентичными в остальном Т-клетками с CAR, не сконструированными для экспрессии CD137 (4-1BB).

#### Композиция

Настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему внеклеточный и внутриклеточный домен. Внеклеточный домен содержит мишени-специфичный связывающий элемент, иначе обозначаемый как антигенсвязывающий фрагмент. Внутриклеточный домен или, иначе, цитоплазматический домен содержит костимуляторную сигнальную область и часть дзета-цепи. Костимуляторная сигнальная область относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимуляторной молекулы. Костимуляторные молекулы являются молекулами клеточной поверхности, иными, чем антигенные рецепторы или их лиганды, необходимые для эффективного ответа лимфоцитов на антиген.

Между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом CAR или между цитоплазматическим доменом и трансмембранным доменом CAR можно встраивать спейсерный домен. Как применяют в настоящем описании, термин "спейсерный домен", как правило, означает любой олиго- или полипептид, функционирующий, 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 CAR по изобретению содержит мишени-специфичный связывающий элемент, иначе обозначаемый как антигенсвязывающий фрагмент. Выбор фрагмента зависит от типа и количества лигандов, определяющих поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен можно выбирать для распознавания лиганда, действующего как поверхностный клеточный маркер на клетках-мишениях, ассоциированных с конкретным состоянием заболевания. Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды для домена антигенсвязывающего фрагмента в CAR по изобретению, включают маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и злокачественными клетками.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению можно конструировать для воздействия на интересующий опухолевый антиген посредством конструирования желаемого антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающегося с антигеном на опухолевой клетке. В контексте настоящего изобретения "опухолевый антиген", или "антиген гиперпролиферативного нарушения", или "антиген, ассоциированный с гиперпролиферативным нарушением" относится к антигенам, типичным для конкретных гиперпролиферативных нарушений, таких как злокачественное новообразование. Антигены, представленные в настоящем описании, включают исключительно в качестве примера. Список не предназначен для ограничения, и дополнительные примеры будут очевидны специалистам в этой области.

Опухолевые антигены являются белками, продуцируемыми опухолевыми клетками, вызывающими иммунный ответ, конкретно, опосредуемые Т-клетками иммунные ответы. Выбор антигенсвязывающего фрагмента по изобретению будет зависеть от конкретного типа злокачественного новообразования, под-

лежащего лечению. Опухолевые антигены хорошо известны в этой области и включают, например, глиома-ассоциированный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA),  $\beta$ -хорионический гонадотропин человека, альфа-фетопротеин (AFP), лектин-реактивный AFP, тиреоглобулин, RAGE-1, MN-CA IX, теломеразная обратная транскриптаза человека, RU1, RU2 (AS), кишечная карбоксилэстераза, mut hsp70-2, M-CSF, простаза, простатический специфический антиген (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, протеин, PSMA, Her2/neu, сурвивин и теломераза, антиген карциномы простаты-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, эластаза нейтрофилов, 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, в качестве неограничивающих примеров, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназа и GP 100 при меланоме и простатическая кислая фосфатаза (PAP) и простатический специфический антиген (PSA) при раке предстательной железы. Другие молекулы-мишени принадлежат к группе участвующих в трансформации молекул, таких как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одной группой антигенов-мишени являются онкофетальные антигены, такие как карциноэмбриональный антиген (CEA). При В-клеточной лимфоме иммуноглобулин опухолеспецифичного идиотипа образует, в сущности, опухолеспецифичный иммуноглобулиновый антиген, уникальный для отдельной опухоли. Антигены В-клеточной дифференцировки, такие как CD19, CD20 и CD37 являются другими кандидатами для антигенов-мишени при В-клеточной лимфоме. Некоторые из этих антигенов (CEA, HER-2, CD19, CD20, идиотип) с ограниченным успехом используют в качестве мишени для пассивной иммунотерапии с использованием моноклональных антител.

Тип опухолевого антигена, описываемого в изобретении, также может являться опухолеспецифичным антигеном (TSA) или ассоциированным с опухолью антигеном (TAA). TSA является уникальным для опухолевых клеток и не присутствует на других клетках в организме. TAA-антиген не является уникальным для опухолевых клеток и также экспрессируется на нормальных клетках в условиях, препятствующих индуцированию состояния иммунологической толерантности к антигену. Экспрессия антигена в опухоли может происходить в условиях, позволяющих иммунной системе отвечать на антиген. TAA могут являться антигенами, экспрессируемыми на нормальных клетках при развитии плода, когда иммунная система является незрелой и не способна отвечать, или они могут являться антигенами, присутствующими в норме на крайне низких уровнях на нормальных клетках, но экспрессируемыми на гораздо более высоких уровнях на опухолевых клетках.

Неограничивающие примеры TSA- или TAA-антигенов включают следующие: антигены дифференцировки, такие как MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифичные мультилинейные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; гиперэкспрессируемые эмбриональные антигены, такие как CEA; гиперэкспрессируемые онкогены и мутантные гены опухолевых супрессоров, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, образующиеся в результате хромосомных транслокаций, такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и вирусные антигены, такие как антигены EBVA вируса Эпштейн-Барр и антигены E6 и E7 папилломавируса человека (HPV). Другие большие антигены на основе белков включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-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 антигенсвязывающий фрагмент CAR нацелен на антиген, включающий, в качестве неограничивающих примеров CD19, CD20, CD22, ROR1, мезотелин, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, гликолипид F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR и т.п.

В зависимости от желаемого антигена-мишени CAR по изобретению можно конструировать включающим соответствующий антигенсвязывающий фрагмент, специфичный для желаемого антигена-мишени. Например, если CD19 является желаемым антигеном-мишенью, в качестве антигенсвязывающего фрагмента для встраивания в CAR по изобретению можно использовать антитело против CD19.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR по изобретению нацелен на CD19. Предпочтительно, антигенсвязывающий фрагмент в CAR по изобретению является scFv против CD19, где последовательность нуклеиновой кислоты scFv против CD19 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID: 14. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты scFv против CD19 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В другом варианте осуществления scFv-часть CAR против CD19 по изобретению содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20.

#### Трансмембранный домен

Что касается трансмембранного домена, CAR можно конструировать содержащим трансмембранный

ный домен, слитный с внеклеточным доменом CAR. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, в природе ассоциированный с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать заменой аминокислоты для избежания связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других белков на поверхности мембраны для минимизации взаимодействий с другими компонентами 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 использования в этом изобретении можно получать из (т.е. получать содержащими, по меньшей мере, трансмембранные области) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Альтернативно, трансмембранный домен может являться синтетическим, в этом случае он будет содержать, преимущественно, гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Предпочтительно на каждом конце синтетического трансмембранного домена будут обнаруживать триплет фенилаланина, триптофана и валина.

Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно от 2 до 10 аминокислот в длину может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR. В частности, глицин-сериновый дуплет представляет собой подходящий линкер.

Предпочтительно трансмембранным доменом в CAR по изобретению является трансмембранный домен CD8. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен CD8, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 16. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен CD8, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В другом варианте осуществления трансмембранный домен CD8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В некоторых случаях трансмембранный домен CAR по изобретению содержит шарнирный домен CD8. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая шарнирный домен CD8, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 15. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая шарнирный домен CD8, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления шарнирный домен CD8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

#### Цитоплазматический домен

Цитоплазматический домен или, иначе, внутриклеточный сигнальный домен CAR по изобретению отвечает за активацию по меньшей мере одной нормальной эффекторной функции клетки иммунной системы, в которую помещают CAR. Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может являться цитолитической активностью или хелперной активностью, включая секрецию цитокинов. Таким образом, термин "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части белка, передающей сигнал эффекторной функции и заставляющей клетку осуществлять специализированную функцию. Хотя, как правило, можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях использование целой цепи не является необходимым. В случае если используют укороченную часть внутриклеточного сигнального домена, такую укороченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин "внутриклеточный сигнальный домен" предназначен для включения любой укороченной части внутриклеточного сигнального домена, достаточной для передачи сигнала эффекторной функции.

Предпочтительные примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR по изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и сорецепторов, действующих совместно для инициации передачи сигнала после связывания антигенного рецептора, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую синтетическую последовательность, обладающую той же функциональной способностью.

Известно, что сигналов, генерируемых только через TCR, недостаточно для полной активации Т-клетки, и что также необходим вторичный или костимуляторный сигнал. Таким образом, можно сказать, что активацию Т-клетки опосредуют два различных класса цитоплазматических последовательностей, опосредующих передачу сигнала: инициирующие антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические последовательности, опосредующие передачу сигнала) и действующие антиген-независимым образом для обеспечения вторичного или костимуляторного сигнала (вторичные цитоплазматические последовательности, опосредующие передачу сигнала).

Первичные цитоплазматические последовательности, опосредующие передачу сигнала, регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим или ингибиторным образом. Первичные цитоплазматические последовательности, опосредующие передачу сигнала, действующие стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активационные мотивы или ITAM.

Примеры ITAM, включающие первичные цитоплазматические последовательности, опосредующие передачу сигнала, имеющие конкретное применение в изобретении, включают полученные из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD8, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Особенno предпочтительно, если цитоплазматическая молекула, опосредующая передачу сигнала, в CAR по изобретению содержит цитоплазматическую последовательность, опосредующую передачу сигнала, полученную из CD3-дзета.

В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR можно конструировать содержащим сигнальный домен CD3-дзета сам по себе или в комбинации с любыми другими желаемыми цитоплазматическими доменами, применимыми в условиях CAR по изобретению. Например, цитоплазматический домен CAR может содержать часть CD3-дзета-цепи и костимуляторную сигнальную область. Костимуляторная сигнальная область относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимуляторной молекулы. Костимуляторная молекула является молекулой клеточной поверхности, иной, чем антигенный рецептор или его лиганды, необходимые для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-Н3 и лиганд, специфически связывающийся с CD8 3, и т.п. Таким образом, хотя в примере изобретения в качестве костимуляторного сигнального элемента описывают, главным образом, 4-1BB, в объем изобретения также входят другие костимуляторные элементы.

Цитоплазматические последовательности, опосредующие передачу сигнала, в цитоплазматической сигнальной части CAR по изобретению, можно соединять друг с другом в случайном или специальном порядке. Необходимо, соединение может образовывать короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно от 2 до 10 аминокислот в длину. В частности, глицин-сериновый дуплет является подходящим линкером.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен конструируют содержащим сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В другом варианте осуществления цитоплазматический домен конструируют содержащим сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В еще одном варианте осуществления цитоплазматический домен конструируют содержащим сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28 и 4-1BB.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен в CAR по изобретению конструируют содержащим сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный домен 4-1BB, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ TD NO: 17, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный домен CD3-дзета, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен в CAR по изобретению конструируют содержащим сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный домен 4-1BB, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный домен CD3-дзета, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен в CAR по изобретению конструируют содержащим сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета, где сигнальный домен 4-1BB содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23, и сигнальный домен CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24.

### Векторы

Настоящее изобретение относится к конструкции ДНК, содержащей последовательности CAR, где последовательность содержит последовательность нуклеиновой кислоты антигенсвязывающего фрагмента, функционально связанного с последовательностью нуклеиновой кислоты внутриклеточного домена. Пример внутриклеточного домена, который можно использовать в CAR по изобретению, включает, в качестве неограничивающих примеров, внутриклеточный домен CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п., в некоторых случаях CAR может содержать любую комбинацию CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит scFv против CD19, шарнирный и трансмембранный домен CD8 человека и сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по изобретению, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, приведенную в SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по изобретению, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В другом варианте осуществления CAR по изобретению содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие желаемые молекулы, можно получать с использованием известных в этой области рекомбинантных способов, таких как, например, с помощью скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, выделяя ген из вектора, о котором известно, что

он его включает, или выделяя его напрямую из содержащих его клеток и тканей с использованием стандартных способов. Альтернативно, интересующий ген чаще можно получать синтетически, чем клонировать.

Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые встраивают ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения длительной передачи генов, т.к. они делают возможной длительную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкемии мышей, состоящим в том, что ими можно трансдуктировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенностью.

Вкратце, экспрессии природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, как правило, достигают функциональным соединением нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его части, с промотором, и встраиванием конструкции в экспрессирующую вектор. Векторы могут подходить для репликации и интеграции в эукариоты. Типичные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, инициирующие последовательности и промоторы, применимые для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также можно использовать для иммунотерапии нуклеиновыми кислотами и генной терапии с использованием стандартных способов доставки генов. В этой области известны способы доставки генов. См., например, патенты США №№ 5399346, 5580859, 5589466, включенные в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В другом варианте осуществления изобретение относится к вектору для генной терапии.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать в некоторые типы векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включая, в качестве неограничивающих примеров, плазмиду, фагмиду, фаговое производное, вирус животных и космиду. Конкретные интересующие 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. Технология вирусных векторов хорошо известна в этой области, и ее описывают, например, в Sambrook et al., (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, применимые в качестве векторов, включают, в качестве неограничивающих примеров, ретровирусы, аденохимеры, аденоассоциированные вирусы, вирус герпеса и лентивирусы. В основном, подходящий вектор содержит участок начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки эндонуклеаз рестрикции и один или несколько селективных маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США № 6326193).

Для передачи генов в клетки млекопитающих разрабатывают 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 использованием известных в этой области способов. Затем рекомбинантный вирус можно выделять и доставлять в клетки индивидуума *in vivo* или *ex vivo*. В этой области известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют аденохимерные векторы. В этой области известен ряд аденохимерных векторов. В одном из вариантов осуществления используют лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они локализуются в области на 30-110 п.н. выше стартового участка, хотя недавно показано, что ряд промоторов содержит функциональные элементы ниже стартового участка. Часто спейсинг между промоторными элементами является гибким таким образом, что предотвращают функционирование промотора, когда элементы инвертированы или перемещены относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tK) спейсинг между промоторными элементами можно повышать до 50 п.н. до начала снижения активности. Считают, что в зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо, активируя транскрипцию.

Одним из примеров подходящего промотора является промоторная последовательность предраннего цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность является сильной конститтивной промоторной последовательностью, способной запускать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной. Другим примером подходящего промотора является промотор фактора элонгации-1α (EF-1α). Однако также можно использовать другие конститтивные промоторные последовательности, включая, в качестве неограничивающих примеров, ранний промотор вируса обезьяны 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор в области длинных концевых повторов (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Райса, а также промоторы генов человека, в качестве неограничивающих примеров, такие как промотор гена актина, промотор гена миозина, промотор гена гемоглобина и промотор гена креатинки-

назы. Кроме того, изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также включены как часть изобретения. Использование индуцибельного промотора представляет молекулярный "переключатель", способный запускать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, если такая экспрессия является желательной, или прекращать экспрессию, если экспрессия нежелательна. Примеры индуцибельных промоторов включают, в качестве неограничивающих примеров, промотор металлотионеинов, промоторы генов глюкокортикоидов, промотор гена прогестерона и промотор гена тетрациклина.

В целях оценки экспрессии полипептида CAR или его частей экспрессирующий вектор для встраивания в клетку также может содержать ген селективного маркера или репортерный ген, или оба для облегчения определения и селекции экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо трансфицировать или инфицировать с помощью вирусных векторов. В других аспектах селективный маркер может нести отдельный фрагмент ДНК и его можно использовать в способе котрансфекции. И селективные маркеры, и репортерные гены можно фланкировать соответствующими регуляторными последовательностями, делая возможной экспрессию в клетках-хозяевах. Применимые селективные маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и т.п.

Для определения потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей используют репортерные гены. В основном, репортерный ген является геном, не присутствующим или экспрессируемым в организме или ткани и кодирующим полипептид, экспрессия которых проявляется в некотором легко определяемом свойстве, например ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящий момент времени после встраивания ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол ацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу, или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et. al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и их можно получать с использованием известных способов или из коммерческого источника. В основном, конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, демонстрирующую наибольший уровень экспрессии репортерного гена, определяют как промотор. Такие промоторные области можно соединять с репортерным геном и использовать для оценки средств на способность модулировать запускаемую промотором транскрипцию.

В этой области известны способы встраивания и экспрессии генов в клетке. Что касается экспрессирующего вектора, вектор легко можно встраивать в клетку-хозяина, например клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомых, любым способом, известным в этой области. Например, экспрессирующий вектор можно трансфицировать в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими способами.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, лиофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекции, электропорацию и т.п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в этой области. См., например, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция с помощью фосфата кальция.

Биологические способы введения интересующего 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, поксивирусов, вируса простого герпеса I, аденоивирусов и аденоассоциированных вирусов, и т.п. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362.

Химические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают системы коллоидных дисперсий, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросфера, бусы и системы на основе липидов, включая эмульсии "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Примером коллоидной системы для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственное мембранные средство).

В случае если используют невирусные системы доставки, примером средства доставки является липосома. Использование липидных составов предназначено для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновую кислоту можно соединять с липидом. Нуклеиновую кислоту, соединенную с липидом, можно инкапсулировать в водной внутренней части липосомы, можно распределять внутри липидного бислоя липосомы, прикреплять к липосоме с помощью линкерной молекулы, соединенной и с липосомой, и с олигонуклеотидом, заключать в липосому, получать ее комплекс с липосомой, диспергировать в растворе, содержащем липид, смешивать с липидом, комбинировать с липидом, она может содержаться в виде суспензии в липиде, содержаться или образовывать комплекс с мицеллой, или ее можно иначе соединять с липидом. Композиции, ассоциированные с липидами, липидами/ДНК или липидами/экспрессирующим вектором, не ограничены любой конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислойной структуре, в виде мицеллы или со "сложенной" структурой. Они также могут просто распределяться в растворе, возможно,

образуя агрегаты, не являющиеся однородными по размеру или форме. Липиды являются жирными веществами, которые могут представлять собой природные или синтетические липиды. Например, липиды включают жировые капли, в природе присутствующие в цитоплазме, а также класс соединений, содержащих 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, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно приобретать в Sigma, St. Louis, MO; дицетил фосфат ("DCP") можно приобретать в K & K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") можно приобретать в Calbiochem-Behring; димиристил фосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно приобретать в Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Стоковые растворы липидов в хлороформе или хлороформ/метаноле можно хранить приблизительно при -20°C. В качестве растворителя используют исключительно хлороформ, т.к. он испаряется легче, чем метанол. "Липосома" представляет собой общий термин, включающий множество одно- и многослойных липидных средств, получение посредством образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать как имеющие везикулярную структуру с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы имеют многочисленные липидные слои, разделенные водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды супензируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования замкнутых структур идерживают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5; 505-10). Однако также включают композиции, имеющие в растворе структуры, иные, чем нормальная везикулярная структура. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать как неоднородные агрегаты молекул липидов. Также включают комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения наличия рекомбинантной последовательности ДНК в клетке-хозяине можно осуществлять множество анализов. Такие анализы включают, например, "молекулярно-биологические" анализы, хорошо известные специалистам в этой области, такие как Саузерн- и "нозерн"-блоттинг, RT-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как определение наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммuno-логическими способами (ELISA и вестерн-блоттингом), или посредством анализов, представленных в настоящем описании, для определения средств, включенных в объем изобретения.

#### Источники Т-клеток

До экспансии и генетической модификации Т-клеток по изобретению из индивидуума получают источник Т-клеток. Т-клетки можно получать из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфоузла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из места инфекции, асцитическую жидкость, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать любое количество Т-клеточных линий, доступных в этой области. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетки можно получать из единицы крови, забранной у индивидуума, с использованием любого количества способов, известных специалистам в этой области, таких как разделение с использованием фиколла. В одном из предпочтительных вариантов осуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают аферезом. Как правило, продукт афереза содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном из вариантов осуществления клетки, собранные 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 промывочный раствор не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, бивалентные катионы. Кроме того, неожиданно, исходные этапы активации в отсутствие кальция приводят к усиленной активации. Как будет очевидно специалистам в этой области, этап промывания можно осуществлять известными в этой области способами, такими как использование полуавтоматической "проточной" центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter Cytomate или Haemonetics Cell Saver 5) по инструкциям производителя. После промывания клетки можно ресусцировать во множестве биосовместимых буферов, таких как, например, несодержащий  $Ca^{2+}$ , несодержащий  $Mg^{2+}$  PBS, плазмалита A или другой физиологический раствор с буфером или без него. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца после афереза и напрямую ресусцировать клетки в средах для культивирования.

В другом варианте осуществления Т-клетки выделяют из периферической крови лизисом эритроцитов и удалением моноцитов, например, центрифугированием с помощью градиента PERCOLL™ или противоточной центрифужной элютрации. Конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как  $CD3^+$ ,  $CD28^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD45RA^+$  и  $CD45RO^+$  Т-клетки, дополнительно можно выделять способами позитивной или негативной селекции. Например, в одном из вариантов осуществления Т-клетки выделяют инкубацией с бусами, конъюгированными с антителами против CD3/CD28 (т.е. 3×28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для позитивной селекции желаемых Т-

клеток. В одном из вариантов осуществления период времени составляет приблизительно 30 мин. В дополнительном варианте осуществления период времени находится в диапазоне от 30 мин до 36 ч или более, включая все целочисленные значения между ними. В дополнительном варианте осуществления период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч. В другом предпочтительном варианте осуществления период времени составляет от 10 до 24 ч. В одном из предпочтительных вариантов осуществления время инкубации составляет 24 ч.

Для выделения Т-клеток пациентов с лейкозом использование большего времени инкубации, такого как 24 ч, может повышать выход клеток. Большее время инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, например при выделении лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из ткани опухоли или у иммунологически компрометированных индивидуумов. Кроме того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, просто укорачивая или увеличивая время, Т-клеткам позволяют связываться с CD3/CD28-бусами, и/или, повышая или снижая соотношение бус и Т-клеток (как представлено далее в настоящем описании), субпопуляции Т-клеток предпочтительно можно подвергать позитивной или негативной селекции в начале культивирования или в другие моменты времени во время осуществления способа. Дополнительно, повышая или снижая соотношение антител против CD3 и/или против CD28 на бусах или другой поверхности, субпопуляции Т-клеток предпочтительно можно подвергать позитивной или негативной селекции в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалистам в этой области следует понимать, что в условиях настоящего изобретения также можно использовать многочисленные этапы селекции. В определенных вариантах осуществления желательным может являться осуществление способа селекции и использование "неселектированных" клеток в активации и экспансии. "Неселектированные" клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции.

Обогащение популяции Т-клеток посредством негативной селекции можно осуществлять с помощью комбинации антител против поверхностных маркеров, уникальных для негативно селектируемых клеток. Одним из способов является клеточный сортинг и/или селекция с помощью способа негативной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которой используют смесь моноклональных антител против поверхностных клеточных маркеров, присутствующих на негативно селектируемых клетках. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup>-клеток с помощью негативной селекции смесь моноклональных антител, как правило, включает антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных вариантах осуществления желательным может являться обогащение или позитивная селекция регуляторных Т-клеток, как правило, экспрессирующих 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 с помощью бус, коньюгированных с антителами против CD25, или другими аналогичными способами селекции.

Для выделения желаемой популяции клеток с помощью позитивной или негативной селекции можно варьировать концентрацию клеток и площадь поверхности (например, частиц, таких как бусы). В определенных вариантах осуществления желательным может являться значительное снижение объема, в котором смешивают бусы и клетки (т.е. повышение концентрации клеток), для обеспечения максимального контакта клеток и бус. Например, в одном из вариантов осуществления используют концентрацию 2 млрд клеток/мл. В одном из вариантов осуществления используют концентрацию 1 млрд клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют больше 100 млн клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 млн клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 млн клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрации 125 или 150 млн клеток/мл. Использованием высоких концентраций может приводить к повышению выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток делает возможным более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать интересующие антигены-мишени, таких как CD28-негативные Т-клетки, или захват из образцов, где присутствует много опухолевых клеток (т.е. крови больного лейкозом, ткани опухоли и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и их получение может являться желательным. Например, использование высокой концентрации клеток делает возможной более эффективную селекцию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в норме слабее экспрессирующих CD28.

В родственном варианте осуществления желательным может являться использование более низких концентраций клеток. Значительно разбавляя смесь Т-клеток, приводимых в контакт с поверхностью (например, частицами, таких как бусы), минимизируют взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет осуществлять селекцию клеток, экспрессирующих большое количество желаемых антигенов, подлежащих связыванию с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28 и подвергаются более эффективному захвату, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки в меньших концентрациях. В одном из вариантов осуществления используемая концентрация 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, включая любое целочисленное значение между ними.

В других вариантах осуществления клетки можно инкубировать на ротаторе в течение различных

периодов времени при различных скоростях при 2-10°C или при комнатной температуре.

T-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывания. Не желая быть связанными теорией, этап замораживания и последующий этап размораживания обеспечивает получение более однородного продукта посредством удаления гранулоцитов и до некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После этапа промывания, на котором удаляют плазму и тромбоциты, клетки можно супензировать в охлаждающем растворе. Хотя многие охлаждающие растворы и параметры известны в этой области и будут применимыми в этом контексте, один из способов включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточный альбумин человека, или сред для культивирования, содержащих 10% декстран 40 и 5% декстрозу, 20% сывороточный альбумин человека и 7,5% DMSO, или 31,25% плазмалита-А, 31,25% декстрозы (5%), 0,45% NaCl, 10% декстран 40 и 5% декстрозу, 20% сывороточный альбумин человека и 7,5% DMSO или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hespan и плазмалит А, 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 представлено в настоящем описании, и позволяют им отстаиваться в течение одного часа при комнатной температуре до активации с использованием способов по настоящему изобретению.

Также в контекст изобретения включают забор образцов крови или продукта афереза у индивидуума в период времени перед тем, как могут понадобиться экспандированные клетки, как представлено в настоящем описании. В связи с этим источник клеток для экспансии можно собирать в любой необходимый момент времени, и желаемые клетки, такие как T-клетки, можно выделять и замораживать для позднейшего использования в T-клеточной терапии для любого количества заболеваний или состояний, для которых T-клеточная терапия может являться благоприятной, таких как представленные в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления образец крови или продукт афереза, как правило, забирают у здорового индивидуума. В определенных вариантах осуществления образец крови или продукт афереза, как правило, забирают у здорового индивидуума, имеющего риск развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и интересующие клетки выделяют и замораживают для позднейшего использования. В определенных вариантах осуществления T-клетки можно экспандировать, замораживать и использовать позднее. В определенных вариантах осуществления образцы забирают у пациента вскоре после постановки диагноза конкретного заболевания, как представлено в настоящем описании, но перед любым лечением. В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют из образца крови или продукта афереза от индивидуума до любого количества родственных способов лечения, включая, в качестве неограничивающих примеров, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусными средствами, химиотерапию, лучевую терапию, лечение иммуносупрессирующими средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, миофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как CAMPATH, антитела против CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, миофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и лучевая терапия. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, важную для индуцируемой факторами роста передачи сигнала, (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 клетки выделяют для пациента и замораживают для дальнейшего использования в комбинации (например, до, одновременно или после) с трансплантацией костного мозга или стволовых клеток, подавляющей T-клетки терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как флударабин, наружная дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как ОКТ3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления клетки выделяют до лечения и их можно замораживать для позднейшего использования для лечения после подавляющей В-клетки терапии, например, средствами, реагирующими с CD20, например ритуксном.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения T-клетки получают от пациента непосредственно после лечения. В связи с этим наблюдают, что после конкретного лечения злокачественных новообразований, в частности лечения лекарственными средствами, повреждающими иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты в норме восстанавливались после лечения, качество получаемых T-клеток может являться оптимальным или улучшенным по 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 энgraftment и экспансии in vivo. Таким образом, в контекст настоящего изобретения включают сбор клеток крови, включая T-клетки, дендритные клетки или другие клетки гематопоэтического ростка, в течение этой фазы восстановления. Кроме того, в определенных вариантах осуществления можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с использованием GM-CSF) и схемы симптоматического

лечения для достижения состояния индивидуума, где предпочтительна репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или пролиферация 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 или после генетической модификации Т-клеток для экспрессии желаемого CART-клетки можно активировать и экспандировать, как правило, с использованием способов, описываемых, например, в патентах США №№ 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514, 6867041 и публикации патентной заявки США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки по изобретению экспандируют посредством приведения в контакт с поверхностью, к которой прикреплено средство, стимулирующее ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, стимулирующий костимуляторную молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как представлено в настоящем описании, например приведением в контакт с антителом против CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или приведением в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с кальциевым ионофором. Для костимуляции дополнительной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, связывающийся с дополнительной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом против 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 антител против CD28, включающие 9.3, В-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, France), как используют в других способах, общезвестных в этой области (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 помощью разных протоколов. Например, средства, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или их можно присоединять к поверхности. При присоединении к поверхности средства можно присоединять к той же поверхности (т.е. в "цис"-положении) или к разным поверхностям (т.е. в "транс"-положении). Альтернативно, одно средство можно присоединять к поверхности, а другое средство может находиться в растворе. В одном из вариантов осуществления средства, обеспечивающее костимуляторный сигнал, соединяют с поверхностью клетки, а средство, обеспечивающее первичный сигнал активации находится в растворе, или его присоединяют к поверхности. В определенных вариантах осуществления оба средства могут находиться в растворе. В другом варианте осуществления средства могут находиться в растворимой форме, и затем их можно перекрестно сшивать с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело или другое связывающее средство, которое будет связываться со средствами. В связи с этим см., например, публикации патентных заявок США №№ 20040101519 и 20060034810 на предмет искусственных антигенпредставляющих клеток (aAPC), которые предлагают для применения в активации и экспансии Т-клеток в настоящем изобретении.

В одном из вариантов осуществления два средства иммобилизуют на бусах - на одной бусине, т.е. в "цис"-положении, или на разных бусинах, т.е. в "транс"-положении. В качестве примера, средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, является антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, и средство, обеспечивающее костимуляторный сигнал, является антителом против CD28 или его антигенсвязывающим фрагментом; и оба средства совместно иммобилизуют на одной бусине в эквивалентных молекулярных количествах. В одном из вариантов осуществления используют соотношение 1:1 каждого антитела, связанного с бусами, для экспансии CD4<sup>+</sup> Т-клеток и роста Т-клеток. В определенных аспектах настоящего изобретения используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, для повышения наблюдаемой экспансии Т-клеток по сравнению экспансий, наблюдаемой с использованием соотношения 1:1. В одном конкретном варианте осуществления наблюдают повышение приблизительно в 1-3 раза по сравнению с экспансией, наблюдаемой с использованием соотношения 1:1. В одном из вариантов осуществления соотношение антител CD3:CD28, связанных с бусами, находится в диапазоне от 100:1 до 1:100, включая все целочисленные значения между ними. В одном из аспектов настоящего изобретения с частицами связывают больше антитела против CD28, чем антитела против CD3, т.е. соотношение CD3:CD28 составляет менее одного. В определенных вариантах осуществления соотношение антитела против CD28 и антитела против CD3, связанных с бусами, составляет более 2:1. В одном конкретном варианте осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, 1:100. В другом варианте осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, 1:75. В дополнительном варианте осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, 1:50. В другом варианте осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, 1:30. В одном из предпочтительных вариантов осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с

бусами, 1:10. В другом варианте осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, 1:3. В еще одном варианте осуществления используют соотношение антител против CD3:CD28, связанных с бусами, 3:1.

Для стимуляции Т-клеток или других клеток-мишеней можно использовать соотношения частиц к клеткам от 1:500 до 500:1, включая любые целочисленные значения между ними. Специалистам в этой области будет понятно, что соотношение частиц к клеткам может зависеть от размера частиц относительно клетки-мишени. Например, бусы небольшого размера могут связывать лишь несколько клеток, в то время как бусы большего размера могут связывать много клеток. В определенных вариантах осуществления соотношение клеток к частицам находится в диапазоне от 1:100 до 100:1, включая любые целочисленные значения между ними, и в дополнительных вариантах осуществления для стимуляции Т-клеток также можно использовать соотношение от 1:9 до 9:1, включая любые целочисленные значения между ними. Соотношение частиц, к которым присоединены антитела против CD3 и против CD28, и Т-клеток, приводящее к стимуляции Т-клеток, как указано выше, может варьироваться, однако конкретные 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 с одним предпочтительным соотношением частиц и Т-клеток, составляющим, по меньшей мере, 1:1. В одном из вариантов осуществления используют соотношение частиц и клеток 1:1 или менее. В одном конкретном варианте осуществления предпочтительное соотношение частица:клетка составляет 1:5. В дополнительных вариантах осуществления соотношение частиц и клеток может варьироваться в зависимости от дня стимуляции. Например, в одном из вариантов осуществления соотношение частиц и клеток составляет от 1:1 до 10:1 в первый день, и каждый день или в дальнейшем через день в течение до 10 дней к клеткам добавляют дополнительные частицы при конечных соотношениях от 1:1 до 1:10 (в зависимости от количества клеток в день добавления). В одном конкретном варианте осуществления соотношение частиц и клеток составляет 1:1 в первый день стимуляции и его доводят до 1:5 в третий и пятый дни стимуляции. В другом варианте осуществления частицы добавляют ежедневно или через день до конечного соотношения 1:1 в первый день и 1:5 в третий и пятый дни стимуляции. В другом варианте осуществления соотношение частиц и клеток составляет 2:1 в первый день стимуляции и его доводят до 1:10 в третий и пятый дни стимуляции. В другом варианте осуществления частицы добавляют ежедневно или через день до конечного соотношения 1:1 в первый день и 1:10 в третий и пятый дни стимуляции. Специалистам в этой области будет понятно, что множество других соотношений может подходить для использования в настоящем изобретении. В частности, соотношения будут варьироваться в зависимости от размера частиц и размера и типа клеток.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, такие как Т-клетки, комбинируют с покрытыми средством бусами, затем бусы и клетки разделяют, а затем клетки культивируют. В альтернативном варианте осуществления перед культивированием покрытые средством бусы и клетки не разделяют, а культивируют совместно. В дополнительном варианте осуществления бусы и клетки сначала концентрируют, используя силу, такую как сила магнитного поля, что приводит к повышению лигирования поверхностных клеточных маркеров, таким образом, индуцируя стимуляцию клетки.

В качестве примера, белки поверхности клетки можно соединять с лигандами, позволяя парамагнитным бусам, к которым прикреплены антитела против CD3 и против CD28 (бусы 3×28), контактировать с Т-клетками. В одном из вариантов осуществления клетки (например, от  $10^4$  до  $10^9$  Т-клеток) и бусы (например, парамагнитные бусы DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т в соотношении 1:1) комбинируют в буфере, предпочтительно PBS (без бивалентных катионов, таких как кальций и магний). Снова, специалистам в этой области будет понятно, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетки-мишени могут редко встречаться в образце и составлять только 0,01% образца, или целый образец (т.е. 100%) может содержать интересующие клетки-мишени. Таким образом, любое количество клеток включают в контекст настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления желательным может являться значительное снижение объема, в котором смешивают частицы и клетки (т.е. повышают концентрацию клеток), для обеспечения максимального контакта клеток и частиц. Например, в одном из вариантов осуществления используют концентрацию приблизительно 2 млрд клеток/мл. В другом варианте осуществления используют более 100 млн клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют концентрации клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 млн клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 млн клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрации 125 или 150 млн клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к повышению выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток делает возможным более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать интересующие антигены-мишени, таких как CD28-негативные Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение, и в определенных вариантах осуществления желательным может являться их получение. Например, использование высокой концентрации клеток делает возможной более эффективную селекцию CD8+ Т-клеток, которые в норме имеют более слабую экспрессию CD28.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения смесь можно культивировать в тече-

ние периода от нескольких часов (приблизительно 3 ч) до приблизительно 14 дней, включая любое целочисленное значение между ними. В другом варианте осуществления смесь можно культивировать в течение 21 дней. В одном из вариантов осуществления изобретения бусы и Т-клетки культивируют совместно в течение приблизительно восьми дней. В другом варианте осуществления бусы и Т-клетки культивируют совместно в течение 2-3 дней. Желательными также могут являться несколько циклов стимуляции таким образом, что время культивирования Т-клеток может составлять 60 дней 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 $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$  и TNF- $\alpha$ , или любые другие добавки для роста клеток, известные специалистам в этой области. Другие добавки для роста клеток включают, в качестве неограничивающих примеров, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среды могут включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, не содержащие сыворотку или дополненные соответствующим количеством сыворотки (или плазмы), или определенным набором гормонов и/или количеством цитокинов, достаточным для роста и экспансии Т-клеток. Антибиотики, например пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток для инфузии индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух с 5% CO<sub>2</sub>).

Т-клетки, подвергаемые стимуляции в течение разных периодов времени, могут проявлять разные свойства. Например, типичные мононуклеарные клетки крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (T<sub>H</sub>, CD4 $^{+}$ ), большую, чем популяции цитотоксических или супрессорных Т-клеток (T<sub>C</sub>, CD8 $^{+}$ ). Экспансия Т-клеток *ex vivo* посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к образованию популяции Т-клеток, которая до приблизительно 8-9 дней состоит, главным образом, из T<sub>H</sub>-клеток, в то время как после приблизительно 8-9 дней популяция Т-клеток содержит все большую популяцию T<sub>C</sub>-клеток. Таким образом, в зависимости от цели лечения предпочтительной может являться инфузия индивидууму популяции Т-клеток, содержащей, главным образом, T<sub>H</sub>-клетки. Аналогично, если выделяют антиген-специфичную субпопуляцию T<sub>C</sub>-клеток, благоприятной может являться экспансия этой субпопуляции до большего количества.

Кроме того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8, в течение экспансии клеток значительно варьируются другие фенотипические маркеры, но по большей части, воспроизводимо. Таким образом, такая воспроизводимость делает возможной адаптацию активированного Т-клеточного продукта для конкретных целей.

#### Терапевтическое применение

Настоящее изобретение относится к клетке (например, Т-клетке), трансдуцированной с использованием лентивирусных векторов (LV). Например, LV кодирует CAR, в котором комбинируют антиген-распознающий домен специфического антитела с внутриклеточным доменом CD3-дзета, CD28, 4-1BB или любых их комбинаций. Таким образом, в некоторых случаях трансдуцированная Т-клетка может вызывать CAR-опосредованный Т-клеточный ответ.

Изобретение относится к применению CAR для перенаправления специфичности первичной Т-клетки на опухолевый антиген. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу стимуляции опосредуемого Т-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткань у млекопитающего, включающему этап введения млекопитающему Т-клетки, экспрессирующую CAR, где CAR содержит связывающий фрагмент, специфически взаимодействующий с заранее определенной мишенью, часть дзета-цепи, содержащую, например, внутриклеточный домен CD3-дзета человека, и костимуляторную сигнальную область.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к типу клеточной терапии, где Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии CAR и осуществляют инфузию Т-клеток с CAR нуждающемуся в этом реципиенту. Инфицируемые клетки способны уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, Т-клетки с CAR способны к экспансии *in vivo*, приводя к длительному поддержанию, которое может приводить к длительному контролю опухоли.

В одном из вариантов осуществления Т-клетки с CAR по изобретению можно подвергать устойчивой экспансии *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 реактивировать для ингибирования образования или роста любой дополнительной опухоли. Например, не ожидали того, что клетки CART-19 по изобретению можно подвергать устойчивой экспансии *in vivo*, их можно поддерживать на высоких уровнях в течение продолжительного периода времени в крови и костном мозге, и они могут образовывать специфические 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 контакта с клетками-мишениями, экспрессирующими антиген-имитатор, и последующего их устраниния.

Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый CAR-модифицированными Т-клетками, может являться активным или пассивным иммунным ответом. Кроме того, CAR-опосредованный иммунный ответ может являться частью подхода адоптивной иммунотерапии, при котором CAR-модифицированные Т-клетки индуцируют иммунный ответ, специфичный для антигенсвязывающей части CAR. Например, клетки CART-19 вызывают иммунный ответ, специфичный против клеток, экспрессирующих CD19.

Хотя в данных, представленных в настоящем описании, конкретно описывают лентивирусные векторы, содержащие последовательности scFv против CD19, полученных из моноклонального антитела мыши FMC63, шарнирный и трансмембранный домен CD8a человека и сигнальные домены 4-1BB и CD3-дзета человека, изобретение следует интерпретировать как включающее любое количество вариантов для каждого из компонентов конструкции, как представлено в настоящем описании. Т.е. изобретение включает применение любого антигенсвязывающего фрагмента CAR для получения CAR-опосредованного Т-клеточного ответа, специфичного для антигенсвязывающей части. Например, в целях лечения злокачественного новообразования антигенсвязывающий фрагмент CAR по изобретению может быть направлен на опухолевый антиген.

Злокачественные новообразования, которые можно лечить, включают опухоли, не васкуляризованные или, по-существу, не васкуляризованные, а также васкуляризованные опухоли.

Злокачественные новообразования могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Типы злокачественных новообразований, подлежащих лечению с помощью CAR по изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, карциному, бластому и саркому, и конкретные лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например саркомы, карциномы и меланомы. Также включены опухоли/злокачественные новообразования взрослых и опухоли/злокачественные новообразования детей.

Гематологическими злокачественными новообразованиями являются злокачественные новообразования крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных новообразований 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 высокозлокачественную формы), множественную миелому, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодиспазию.

Солидные опухоли являются аномальными опухолями ткани, как правило, не содержащими кисты или области жидкости. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей называют по типу образующих их клеток (например, саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фиброзаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстого кишечника, лимфолейкоз, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легких, рак яичников, рак предстательной железы, печеночноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярный рак щитовидной железы, папиллярный рак щитовидной железы, феохромоцитому, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такая как глиома ствола головного мозга и смешанная глиома), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома) астроцитома, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома, крахиофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головном мозге).

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR по изобретению конструируют для лечения конкретного злокачественного новообразования. Например, CAR, сконструированный против CD19, можно использовать для лечения злокачественных новообразований и нарушений, включая, в качестве неограничивающих примеров, пре-В ALL (применение в педиатрии), ALL взрослых, лимфому из клеток зоны мантии, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, и для повышения выживаемости после аллотрансплантации костного мозга и т.п.

В другом варианте осуществления CAR можно конструировать направленным против CD22 для лечения диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы.

В одном из вариантов осуществления злокачественные новообразования и нарушения включают, в

качестве неограничивающих примеров, пре-В ALL (применение в педиатрии), ALL взрослых, лимфому из клеток зоны мантии, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, выживаемость после аллотрансплантации костного мозга и т.п., можно лечить с использованием комбинации CAR, направленных против CD19, CD20, CD22 и ROR1.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать направленным против мезотелина для лечения мезотелиома, рака поджелудочной железы, рака яичников и т.п.

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

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

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать направленным против PSMA для лечения рака предстательной железы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать направленным против гликоглиптида F77 для лечения рака предстательной железы и т.п.

В одном из вариантов осуществления CAR можно конструировать направленным против EGFRvIII для лечения глиобластомы и т.п.

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

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

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

Однако изобретение нельзя интерпретировать как ограниченное исключительно антигенами-мишениями и заболеваниями, представленными в настоящем описании. Т.е. изобретение необходимо интерпретировать, как включающее любую антигенную мишень, ассоцииированную с заболеванием, где CAR можно использовать для лечения заболевания.

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

Что касается иммунизации *ex vivo*, по меньшей мере одно из следующего происходит *in vitro* до введения клеток млекопитающим: i) экспансия клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки, и/или iii) криоконсервация клеток.

Способы *ex vivo* хорошо известны в этой области и полностью описаны ниже. В кратком изложении, клетки выделяют из млекопитающего (предпочтительно, человека) и генетически модифицируют (т.е. трансфицируют *in vitro*) с помощью вектора, экспрессирующего CAR, представленного в настоящем описании. CAR-модифицированную клетку можно вводить млекопитающему-реципиенту для получения благоприятного терапевтического эффекта. Млекопитающее-реципиент может являться человеком, и CAR-модифицированная клетка может являться аутологичной для реципиента. Альтернативно, клетки могут являться аллогенными, изогенными или ксеногенными в для реципиента.

Способ экспансии гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников *ex vivo* описаны в патенте США № 5199942, включенном в настоящее описание в качестве ссылки, и его можно использовать для клеток по настоящему изобретению. В этой области известны другие подходящие способы, таким образом, настоящее изобретение не ограничено любым конкретным способом экспансии клеток *ex vivo*. В кратком изложении, культивирование и экспансия Т-клеток *ex vivo* включает: (1) получение CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников от млекопитающего из образцов периферической крови или эксплантов костного мозга и (2) экспансию таких клеток *ex vivo*. В дополнение к клеточным факторам, описываемым в патенте США № 5199942, для культивирования и экспансии клеток можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд с-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, клетки, активированные и экспандированные, как представлено в настоящем описании, можно использовать в лечении и профилактике заболеваний, возникающих у иммунокомпрометированных индивидуумов. В частности, CAR-модифицированные Т-клетки по изобретению используют в лечении CCL. В определенных вариантах осуществления клетки по изобретению используют в лечении пациентов с риском развития CCL. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики CCL, 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 комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. В кратком изложении фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать популяцию клеток-мишеней, как представлено в на-

стоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципциентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, соответствующим заболеванию, подлежащему лечению (или профилактике). Количество и частоту введений будут определять в зависимости от таких факторов, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя соответствующие дозировки можно определять с помощью клинических испытаний.

Если указывают "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое количество", точное количество композиций по настоящему изобретению для введения может определять врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, масштабе инфекции или метастазирования и состояния пациента (индивидуума). Как правило, можно сказать, что фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, представленные в настоящем описании, можно вводить в дозировке 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. Также композиции Т-клеток можно вводить множество раз в этих дозировках. Клетки можно вводить с использованием способов инфузии, общезвестных в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Специалист в области медицины легко может определять оптимальную дозировку и схему лечения конкретного пациента посредством мониторинга пациента на предмет признаков заболевания и, таким образом, корректировать лечение.

В определенных вариантах осуществления желательным может являться введение активированных Т-клеток индивидууму и затем повторный забор крови (или проведение афереза), активация Т-клеток по настоящему изобретению и реинфузия пациенту этих активированных и экспандированных Т-клеток. Эту процедуру можно осуществлять множество раз в течение нескольких недель. В определенных вариантах осуществления можно активировать Т-клетки из образцов крови от 10 до 400 см<sup>3</sup>. В определенных вариантах осуществления активируют Т-клетки из образцов крови 20, 30, 40, 50 см<sup>3</sup>, 60, 70, 80, 90 или 100 см<sup>3</sup>. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, использование этого протокола многочисленных заборов крови/многочисленных реинфузий можно использовать для исключения конкретных популяций Т-клеток.

Введение заявленных композиций можно осуществлять любым удобным способом, включая ингаляцию аэрозоля, инъекцию, пероральное введение, переливание, имплантацию или трансплантацию. Композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить пациенту подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, внутривенной (i.v.) инъекцией или интраперитонеально. В одном из вариантов осуществления композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту внутрикожной или подкожной инъекцией. В другом варианте осуществления композиции Т-клеток по настоящему изобретению предпочтительно вводят i.v. инъекцией. Композиции Т-клеток можно инъецировать непосредственно в опухоль, лимфоузел или очаг инфекции.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, активированные и экспандированные с использованием способов, представленных в настоящем описании, или других известных в этой области способов, где Т-клетки экспандируют до терапевтических уровней, вводят пациенту в комбинации с (например, до, одновременно или после) любым количеством подходящих способов лечения, включая, в качестве неограничивающих примеров, лечение средствами, такими как противовирусная терапия, цидофовир и интерлейкин-2, лечение цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом в случае пациентов с MS, или лечение эфализумабом в случае пациентов с псориазом или другие способы лечения в случае пациентов с PML. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, иммuno-супрессирующими средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, миофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как CAMPATH, антитела против CD3 или другие антитела, цитоксин, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, миофеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины и лучевая терапия. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, важную для индуцируемой факторами роста передачи сигнала (рапамицин) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et. al, Curt. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят пациенту в комбинации (например, до, одновременно или после) с трансплантацией костного мозга, подавляющей Т-клетки терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как, флударабин, наружная дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как ОКТ3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления композиции клеток по настоящему изобретению вводят после подав-

ляющей В-клетки терапии, такой как терапия средствами, взаимодействующими с CD20, например, ритуксном. Например, в одном из вариантов осуществления индивидуумов можно подвергать стандартному лечению химиотерапией высокими дозами после трансплантации 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 или после хирургической операции.

Дозировка указанных выше терапевтических средств, подлежащих введению пациенту, будет варьироваться в зависимости от конкретной природы состояния, подвергаемого лечению, и реципиента. Коррекцию дозировок для введения человеку можно осуществлять согласно общепринятой в этой области практике. Например, доза САМРАТН будет находиться в диапазоне от 1 до приблизительно 100 мг для взрослого пациента, как правило, ее вводят ежедневно в течение периода времени от 1 до 30 дней. Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг в сутки, хотя в некоторых случаях можно использовать большие дозы до 40 мг в сутки (как описано в патенте США № 6120766).

#### **Экспериментальные примеры**

Далее изобретение подробно описываются со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры представлены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения изобретения, если не указано иначе. Таким образом, изобретение ни в коем случае нельзя интерпретировать как ограниченное следующими примерами, скорее его необходимо интерпретировать как включающее любой и все варианты, становящиеся очевидными из идеи, представленной в настоящем описании.

Без дальнейшего описания полагают, что специалист в этой области с использованием представленного выше описания и следующих иллюстративных примеров может получать и использовать соединения по настоящему изобретению и практиковать заявленные способы. Таким образом, в следующих демонстрационных примерах, главным образом, указывают предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, и их нельзя интерпретировать как каким-либо образом ограничивающие остальную часть изобретения.

Пример 1. Т-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, создают иммунологическую память и сильные противоопухолевые эффекты у пациентов с лейкозом на поздней стадии

Лимфоциты, сконструированные для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), демонстрируют минимальную экспансию *in vivo* и противоопухолевые эффекты в предшествующих клинических испытаниях. Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что Т-клетки с CAR, содержащие CD137, обладают сильной клинической активностью, не связанной с перекрестным иммунитетом, после инфузии у трех из трех подвергнутых лечению пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом на поздней стадии (CLL). Сконструированные Т-клетки экспандировались *in vivo* более чем в тысячу раз, перемещались в костный мозг и продолжали экспрессировать функциональные CAR на высоких уровнях по меньшей мере в течение 6 месяцев. В среднем, каждая инфильтрированная CAR+ Т-клетка устранила по меньшей мере 1000 клеток CLL. Демонстрировали CD19-специфичный иммунный ответ в крови и костном мозге, сопровождаемый полной ремиссией у двух из трех пациентов. Часть клеток сохраняется как CAR+ Т-клетки памяти, что свидетельствует о потенциале этого подхода без рестрикции по МНС для эффективного лечения В-клеточных злокачественных новообразований.

Далее описываются материалы и способы, используемые в этих экспериментах.

#### **Материалы и способы** **Общий лабораторный отчет**

Обработку исследуемого образца, замораживание и лабораторные анализы осуществляли в Translational and Correlative Studies Laboratory в University of Pennsylvania, действующей в соответствии с принципами Good Laboratory Practice, установленными SOP, и/или протоколами получения образцов, их обработки, замораживания и анализа. Осуществление анализа и предоставление данных соответствует руководством MIATA (Janetzki et al., 2009, *Immunity* 31: 527-528).

#### **Дизайн протокола**

Клиническое испытание (NCT01029366) осуществляли, как представлено на фиг. 1. Для исследования подходили пациенты с CD19-позитивным гематологическим злокачественным новообразованием с персистирующим заболеванием после по меньшей мере двух предшествующих схем лечения, не подходящие для аллотрансплантации стволовых клеток. После реостадирования опухоли Т-клетки периферической крови собирали аферезом для получения CART-19 и индивидуумам проводили однократный курс химиотерапии, как показано на фиг. 10, в течение недели перед инфузией, клетки CART-19 вводили внутривенной инфузией с использованием 3-дневной схемы лечения дробными дозами (10, 30 и 60%) при дозе, указанной фиг. 10, и, если возможно, вторую дозу вводили в день 10; только пациент UPN 02 имел достаточно клеток для второй инфузии. Индивидуумов оценивали на наличие токсических эффектов и ответ через короткие промежутки времени в течение по меньшей мере 6 месяцев. Протокол одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, Recombinant DNA Advisory Committee и Institutional Review Board of the University of Pennsylvania. Первый день инфузии указывали как день исследования 0.

### Индивидуумы: резюме клинических данных

Резюме клинических данных представлено на фиг. 10 и в настоящем описании подробно представлены анамнезы. У пациента UPN 01 впервые диагностировали В-клеточный CLL стадии II в возрасте 55 лет. У пациента не наблюдали симптомов и его наблюдали в течение приблизительно 1-1/2 лет до возникновения необходимости в терапии прогрессирующего лимфоцитоза, тромбоцитопении, аденопатии и спленомегалии. С течением времени пациенту проводили терапию предыдущих линий. Последней терапией являлись 2 цикла терапии пентостатином, циклофосфамидом и ритуксимабом за 2 месяца до инфузии клеток CART-19 с минимальным ответом. Затем пациенту проводили один цикл терапии бендамустином в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, до инфузии клеток CART-19.

У пациента UPN 02 впервые диагностировали CLL в возрасте 68 лет, когда у пациента развивались утомляемость и лейкоцитоз. Пациент являлся относительно стабильным в течение 4 лет, когда у него развивался прогрессирующий лейкоцитоз (195000/мкл), анемия и тромбоцитопения, требующие терапии. Кариотипический анализ показал, что клетки CLL имеют делецию в хромосомном локусе 17р. По причине прогрессирующего заболевания пациента лечили алемтузумабом с частичным ответом, но в течение полутора лет пациент имел прогрессирующее заболевание. Пациента повторно лечили алемтузумабом в течение 18 недель с частичным ответом и периодом без прогрессирования 1 год. Затем пациенту проводили 2 цикла терапии бендамустином с ритуксимабом без значимого ответа (фиг. 5А). Пациенту проводили лечение только бендамустином в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, до инфузии клеток CART-19.

Пациента UPN 03 наблюдали в возрасте 50 лет с бессимптомным CLL стадии I и затем в течение многих лет. Пациент имел прогрессирующий лейкоцитоз (лейкоцитарная формула 92000/мкл) и прогрессирующую аденопатию, требующие терапии. Пациенту проводили 2 цикла терапии ритуксимабом с флударабином, приведшие к нормализации лейкоцитарной формулы и значимому улучшению, хотя и не к полному разрешению аденопатии. У пациента наблюдали период без прогрессирования приблизительно 3 года. Кариотипический анализ показал наличие клеток, содержащих делецию в хромосомном локусе 17р, с использованием FISH показали наличие делеции TP53 в 170 из 200 клеток. В течение последующих лет пациенту проводили лечение с использованием 3 различных линий терапии (фиг. 10) прогрессирующего лейкоцитоза и аденопатии, последним использовали алемтузумаб с частичным ответом за 6 месяцев до инфузии клеток CART-19. Пациенту проводили лечение пентостатином и циклофосфамидом в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов до инфузии клеток CART-19.

### Получение вектора

Трансген CD19-BB-Z (GeMCRIS 0607-793) конструировали, как описано в (Milone et. al., 2009, Mol Ther. 17: 1453-1464). Лентивирусные векторы получали согласно текущим рекомендациям Good Manufacturing Practice с использованием трехплазмидного подхода в Lentigen Corporation, как описано в (Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:871-875).

### Получение CART-19-клеточного продукта

Способы получения Т-клеток с использованием парамагнитных полистирольных бус, покрытых моноклональными антителами против CD3 и против CD28, описывают в (Laport et al., 2003, Blood 102: 2004-2013). Лентивирусную трансдукцию осуществляли, как описано в (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103: 17372-17377).

### Способы вычисления опухолевой массы

Опухолевую массу CLL на начальном уровне оценивали, как показано на фиг. 10. Количество клеток CLL вычисляли в костном мозге, крови и вторичных лимфоидных тканях, как описано ниже.

Костный мозг: у здоровых взрослых костный мозг представляет собой приблизительно 5% общей массы тела (Woodard et al., 1960, Phys Med Biol, 5:57-59; Bigle et al., 1976, Health Phys 31: 213-218). Костный мозг в образцах подвздошного гребня имеет повышающуюся с возрастом процентную долю неактивного (жирного) костного мозга, увеличивающуюся от 20% общего костного мозга в возрасте 5 лет до приблизительно 50% в возрасте 35 лет, когда он остается стабильным до возраста 65 лет, и затем повышается до приблизительно 67% неактивного костного мозга в возрасте 75 лет (Hartsock et al., 1965, Am J Clin Path 43: 326-331). Международное референсное значение общей массы скелета активного (красного) и неактивного (жирного) костного мозга для мужчин в возрасте 35 лет в настоящее время составляет 1170 г и 2480 г соответственно (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68

(A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)). Взрослые мужчины в возрасте от 35 до 65 лет имеют костный мозг, представляющий 5,0% общей массы тела, состоящий из 1,6% активного (красного) костного мозга и 3,4% неактивного (жирного) костного мозга (Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: The Skeleton in Annals of the ICRP, vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68 (A report of a Task Group of Committee 2 of the International Commission on Radiological Protection, Oxford, 1995)). На основе биопсии костного мозга и аспирации образцов вычисляли массу клеток CLL для трех пациентов на начальном уровне, как показано

в табл. 1. Затем эти показатели общей массы CLL костного мозга преобразовывали в общее количество клеток CLL в костном мозге с использованием равенства 1 кг =  $10^{12}$  клеток, полученные количества представлены на фиг. 10. Эти вычисления основаны на условии, что CLL имеет однородное распределение в костном мозге. В случае пациента UPN 01 вычисления представлены для биопсии костного мозга, полученной до химиотерапии бендамустином, и для аспиратов, полученных после терапии бендамустином и перед инфузией клеток CART-19. Количество являлось менее точными для аспиратов в день -1 по сравнению с биоптатами в день -14 в результате технических ограничений аспирации в день -1. Пациент UPN 02 имел один биоптат до лечения, демонстрирующий полное замещение костного мозга CLL. Этот пациент имел неизмененный образец в день 30 после инфузии CART-19. Опухолевую массу в костном мозге в случае пациента UPN 03 вычисляли на основе биопсии после химиотерапии и перед инфузией CART-19.

Таблица 1. Масса костного мозга

	Масса активного костного мозга (кг)	Масса неактивного костного мозга (кг)	Общая масса костного мозга (кг)
Мужчины в норме (референсный стандарт ICRP)	1,17	2,48	3,65
UPN 01 день -14 (95% клеток)	3,47	0,18	3,65
UPN 02 день -47 (95% клеток) /	3,47	0,18	3,65
UPN 03 день -1 (60% клеток)	2,19	1,46	3,65
	Масса CLL (кг)		
UPN 01 день -14 (70% CLL)	2,43		
UPN 01 день -1 (50% CLL густок)	1,73		
UPN 02 день -47 (>95% CLL)	3,29		
UPN 03 день -1 (40% CLL)	0,88		

Кровь: Только пациент UPN 02 имел значительную опухолевую массу CLL в крови перед инфузией CART-19. Проточная цитометрия показала, что клетки имели типичный фенотип, как клональная популяция kappa-рестрицированная CD5+CD10-CD19+CD20(dim)+CD23(переменная)+IgM-B-клеток с поверхностью с низкой флуоресценцией (dim). Приблизительно 35% клеток CLL коэкспрессировали CD38. Опухолевую массу CLL не устранили с использованием 3 циклов химиотерапии бендамустином, и она присутствовала во время инфузий клеток CART-19. Во время инфузии CART-19 количество CLL в крови составляло 55000 клеток/мкл. Учитывая объем крови 5,0 л, пациент UPN 02 имел  $2,75 \times 10^{11}$  клеток CLL в крови в день 0. Учитывая нормальную общую WBC у пациентов UPN 01 и 03, не вычисляли циркулирующую опухолевую массу заболевания у этих пациентов, что приведет к небольшому занижению общей опухолевой массы организма.

Вторичные лимфоидные ткани: Объем лимфаденопатии и спленомегалии количественно оценивали на продольных срезах КТ с использованием одобренного FDA программного обеспечения. Определяли объемы только для грудной, брюшной и тазовой полости. Массы от уровня тела позвонка T1 до уровня бифуркации общей бедренной артерии измеряли у всех пациентов и в некоторых случаях также включали узлы в паховой области. Узлы в области головы/шеи и конечностей исключали из анализа и исключали из исходного количества клеток-мишеней CLL, что также приведет к небольшому снижению общей опухолевой массы организма. Пациенты UPN 01 и 03 имели длительные полные ремиссии более 6 месяцев, и, таким образом, для определения снижения опухолевой массы относительно исходного уровня использовали формулу (исходный объем - объем через 3 месяца); пациент UPN 02 имел стабильную аденоопатию, и, таким образом, исходную опухолевую массу оценивали, вычитая референсный объем селезенки подходящих по возрасту здоровых мужчин (Harris et al., 2010, Eur J Radiol 75:e97-e101). Исходную опухолевую массу преобразовывали в клетки CLL с использованием подхода определения плотности клеток (плотность 1 кг/л, и 1 кг =  $10^{12}$  клетки) или объемного подхода (клетки CLL имели диаметр 10 мкм или 600 фл, учитывая сферическую форму), и оба значения представлены на фиг. 10. Объемы опухолей во вторичных лимфоидных тканях у трех пациентов, вычисленные с использованием доступных срезов КТ, представлены ниже в табл. 2.

Таблица 2. Объемы опухолей

Пациент	День исследования	Объем LN (мм <sup>3</sup> )	Объем селезенки (мм <sup>3</sup> )	Общий объем (мм <sup>3</sup> )
URN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1 месяц	105005	1258575	1363580
	3 месяца	65060	1176625	1241685
UP 02	-24	115990	1166800	1282790
	1 месяц	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1 месяц	111525	371200	482725
	3 месяца	47245	299860	347105

КТ-сканирование на начальном уровне для пациента UPN 01 осуществляли через 8 дней после 2 циклов

пентостатина/циклофосфамида/ритуксимаба, и оно не показало ответа на эту химиотерапевтическую схему лечения по сравнению с предыдущим КТ-сканированием. Пациенту проводили один цикл бендамустина перед инфузией CART-19, и, таким образом, изменение объема опухоли со дня -37 до дня +31 для UPN 01 не может исключать потенциального влияния бендамустина, а также CART-19. Аналогично, изменение объема опухоли для UPN 03 отражает комбинированный эффект 1 цикла пентостатина/циклофосфамида и CART-19.

#### Способ оценки эффективного соотношения E:T in vivo у пациентов

Соотношение E:T инфузированных CART-клеток и количества уничтоженных опухолевых клеток вычисляли с использованием количества опухолевых клеток, присутствующих на момент инъекции T-клеток с CAR, и количества инъецируемых T-клеток с CAR (Carpenito et. al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365). В случае настоящего изобретения использовали количество инъецируемых CART-19+ T-клеток, показанное на фиг. 10, поскольку невозможно с достаточной точностью определять абсолютное количество присутствующих in vivo CART-19+ T-клеток. Доступные данные свидетельствуют о том, что экспансия клеток CART-19 в крови и костном мозге является устойчивой, как показано на фиг. 2 и фиг. 6. Однако невозможно определить миграцию клеток CART-19 в другие участки, такие как вторичные лимфоидные ткани, что создает значительную неопределенность в отношении общего количества клеток CART-19, доступных in vivo на момент максимального уменьшения опухоли. Для получения эффективного соотношения E:T использовали вычисленные значения из табл. 3.

Таблица 3. Вычисленные соотношения E:T CART-19, полученные in vivo

Пациент	Опухолевая масса (исходный уровень и дельта)				Инфузированные CART-19+ клетки	In Vivo E:T
	Исходный уровень в костном мозге	Исходный уровень в крови	Исходный уровень в узлах/селезенке	Общее изменение опухолевой массы CLL		
UPN 01	1,70E+12	Нет данных	8,1E+11	2,51E+12	1,13E+09	1:2200
UPN 02	3,20E+12	2,75E+11	1,6E+12	2,74E+11 <sup>2</sup>	5,80E+08	1:1000
UPN 03	8,80E+11	Нет данных	4,4E+11	1,32E+12	1,42E+07	1:93000
					диапазон	1000-93000

1 = среднее по способу определения плотности клеток и объемному способу

2 = у пациента UPN 02 не наблюдали ответа в костном мозге, но наблюдали частичное снижение аденоапатии (3,1E+11 клеток) в опухолевых массах, измеряемых с помощью КТ в селезенке и лимфоузлах. Ответ в крови см. на фиг. 5A.

#### Обработка и замораживание образцов

Образцы (периферическую кровь, костный мозг) собирали в вакутейнеры с лиловыми крышками (K2EDTA) или красными крышками (без добавок) (Becton Dickinson) и доставляли в TCSL в течение 2 ч после забора. Образцы обрабатывали в течение 30 мин регистрации образцов согласно установленной лабораторной SOP. Мононуклеарные клетки периферической крови и костного мозга выделяли с помощью центрифugирования в градиенте плотности фиколла с использованием фиколл-пака (GE Healthcare, 17-1440-03) и замораживали в RPMI (Gibco 11875-135), дополненной 4% сывороточным альбумином человека (Gemini Bio-Products, 800-120), 2% гидроксиэтилкрахмалом (Novaplus, NDC0409-7248-49) и 10% DMSO (Sigma, D2650) с использованием контейнеров для замораживания 5100 Стю 1°; после 24-72 ч при температуре -80°C клетки переносили в жидкий азот для длительного хранения. Аферезные образцы

получали из Hospital of the University of Pennsylvania Blood Bank и обрабатывали в CVPF с помощью очистки в градиенте фиколла и замораживали, как указано выше. Непосредственно после размораживания жизнеспособность при оценке составляла более 85%. Для выделения сыворотки образцам позволяли коагулировать в течение 1,5-2 ч при комнатной температуре; сыворотку выделяли посредством центрифугирования и замораживали аликвоты 100 мкл для однократного использования при температуре -80°C.

#### Клеточные линии

K562 (CML, СБ19-негативные) получали из ATCC (CCL-243), K.562/CD19 получали в качестве дара от Carmine Carpenito, и они являлись трансдуцированной лентивирусом K562 при 100% частоте для экспрессии молекулы CD19. NALM-6, CD19-позитивную не-Т, не-В ALL клеточную линию предшественников В-клеток (Hurwitz et al., 1979, *Tnt J Cancer* 23: 174-180) с подтвержденной экспрессией антигена CD19 получали в дар от Laurence Cooper. Указанные выше клеточные линии поддерживали в среде R10 (RPMI 1640 (Gibco, 11875)), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Hyclone) и 1% Pen-Strep (Gibco, 1140-122). Мононуклеарные клетки периферической крови (ND365) от здорового донора получали аферезом в Human Immunology Core в University of Pennsylvania, обрабатывали и замораживали, как указано выше.

#### Выделение ДНК и анализ с помощью Q-ПЦР

Образцы цельной крови или костного мозга собирали в вакутейнеры BD с лиловыми крышками (K3EDTA) (Becton Dickinson). Геномную ДНК выделяли непосредственно из цельной крови с использованием наборов QIAamp DNA blood midi kit (Qiagen) и установленной лабораторной SOP, количественно оценивали с помощью спектрофотометра и хранили при температуре -80°C. Анализ образцов геномной ДНК с помощью Q-ПЦР осуществляли в совокупности с использованием 123-200 нг геномной ДНК/момент времени и технологии ABI Тақтап и валидированного анализа для определения встроенной последовательности трансгена CD19 CAR. С использованием квалификационных исследований и заранее установленных диапазонов принятия вычисляли диапазоны параметра прохождение/непрохождение, включая угол наклона стандартной кривой и значения  $r^2$ , способность точно количественно анализировать референсный образец (пик 1000 копий/плазмиду) и не определяли амплификацию в образце ДНК здорового донора. Праймер/зонды для трансгена CAR против CD19 описаны в (Milone et al., 2009, *Mol Ther* 17: 1453-1464). Для определения количества копий/единицу ДНК строили 8-точечную стандартную кривую, с использованием  $10^{6-5}$  копий лентивирусной плазмиды, содержащихся в 100 нг не-трансдуцированной контрольной геномной ДНК. Каждую точку данных (образцы, стандартная кривая, референсные образцы) оценивали в трех повторениях с указанием средних значений. В случае пациента UPN 01 все приведенные значения получали из положительного значения Ct в 3/3 повторений с % CV менее 0,46%. В случае пациента UPN 02, за исключением образца в день +177 (2/3 повторений положительные, высокий % CV), все приведенные значения получали из положительного значения Ct в 3/3 повторениях с % CV менее 0,72%. В случае пациента UPN 03, за исключением образца в день +1 (2/3 повторений положительные, 0,8% CV) и образца в день +3 (2/3 повторений положительные, 0,67% CV), все приведенные значения получали из положительного значения Ct в 3/3 повторений с % CV менее 1,56%. Нижний предел количественных колебаний (LLOQ) для анализа определяли по стандартной кривой при 2 копиях/микрограмм ДНК (10 копий/200 нг внесенной ДНК); средние значения ниже LLOQ (т.е. определяемые, но не поддающиеся количественному анализу) считали приблизительными. Параллельную реакцию амплификации для контроля качества встроенной ДНК осуществляли с использованием 12-20 нг внесенной геномной ДНК, комбинации праймера/зонда, специфичной для нетранскрибуируемой геномной последовательности выше гена CDKN1A (GENEBANK: Z85996) (прямой праймер: GAAA-GCTGACTGCCCTATTTG; SEQ ID NO: 25, обратный праймер: GAGAGGAAGTGTGGAACAAAT; SEQ ID NO: 26, зонд: VIC-CTC CCC AGT CTC TTT; SEQ ID NO: 27) и 8-точечной стандартной кривой, полученной с помощью разведения контрольной геномной ДНК; с помощью этих реакций амплификации получали поправочный коэффициент (CF) (нг определенной ДНК/нг внесенной ДНК).

Копии трансгена/микрограмм ДНК вычисляли по формуле:

копии, вычисленные из стандартной кривой для CD19/внесенную ДНК (нг)  $\times$  CF  $\times$  1000 нг.

Точность этого анализа определяли по способности количественно анализировать мечение инфузированного клеточного продукта с помощью Q-PCR по формуле: Среднее мечение = определяемые копии/внесенную ДНК  $\times$  6,3 пг ДНК/соответствующие соматические клетки  $\times$  CF по сравнению трансген-позитивностью, определяемой с помощью проточной цитометрии с использованием CAR-специфичных реагентов для определения. С помощью этого "слепого" определения получали 22,68% мечение для инфузируемого продукта UPN 01 (22,6% по данным проточной цитометрии), 32,33% мечение для инфузируемого продукта UPN 02 (23% по данным проточной цитометрии) и 4,3% мечение для инфузируемого продукта UPN 03 (4,7% мечение по данным проточной цитометрии).

#### Анализы цитокинов

Количественный анализ растворимых цитокинов осуществляли с использованием технологии анализа Luminex bead и наборов, приобретенных в Life technologies (Invitrogen). Анализы осуществляли по инструкциям производителя с использованием 8-точечной стандартной кривой, построенной с использо-

ванием серии 3-кратных разведений. Каждую точку стандартной кривой и образец оценивали в двух повторениях при разведении 1:3; вычисленный % CV для измерений в двух повторениях составлял менее 15%. Данные получали с использованием Bioplex 200 и анализировали с помощью программного обеспечения Bioplex Manager версии 5.0 с использованием анализа 5-параметрической логистической регрессии. Диапазоны количественного анализа стандартной кривой определяли как диапазон 80-120% (наблюданное/ожидаемое значение). Диапазоны количественного анализа отдельных анализаторов представлены на легендах фигур.

#### Клеточный анализ для определения функции CAR

Клетки оценивали по функциональности после размораживания и отстаивания в течение ночи в ТСМ посредством измерения дегрануляции с помощью CD107 в ответ на клетки-мишени. Анализы дегрануляции осуществляли с использованием  $1 \times 10^6$  PBMC и  $0,25 \times 10^6$  клеток-мишени в конечном объеме 500 мкл в 48-луночных планшетах в течение 2 ч при 37°C в присутствие CD49d (Becton Dickinson), антитела против CD28, монензина (eBioscience) и антитела против CD107a-FITC (eBiosciences), по-существу, как описано в (Berts et. al., 2003, J Immunol Methods 281:6578).

#### Антитела-реагенты

Для этих исследований использовали следующие антитела: MDA-CAR, антитело мыши против CD19CAR, конъюгированное с Alexa 647, представляющее собой даром от Drs. Bipulendu Jena и Laurence Cooper (MD Anderson Cancer Center). Для мультипараметрического иммунофенотипирования и функциональных анализов: антитела против CD3-A700, против CD8-PE-Cy7, против PD-1-FITC, против CD25-AF488, против CD28-PercP-Cy5.5, против CD57-eF450, против CD27-APC-eF780, против CD17-APC-eF780, против CD45RA-eF605NC, CD107a-FITC (все от e-Bioscience), против CD4-PE-Texas Red и Live/Dead Aqua (от Life Technologies) и против CD 14-V500, против CD 16-V500 (от Becton Dickinson). Для общего иммунофенотипирования: CD3-PE, CD M-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, CD16PE-Cy7, CD19-PE-Cy7, CD20-PE, все от Becton Dickinson.

#### Мультипараметрическая проточная цитометрия

Клетки оценивали с помощью проточной цитометрии как свежими после обработки фиколл-паком или, если их замораживали, после отстаивания в течение ночи при плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл в Т-клеточной среде (TCM) (X-vivo 15 (Lonza, 04-418Q), дополненной 5% АВ сыворотки человека (GemCall, 100-512), 1% Hepes (Gibco, 15630-080), 1% Pen-Strep (Gibco, 15140-122), 1% Glutamax (Gibco, 35050-061) и 0,2% N-ацетилцистеином (American Regent, NDC05 17-7610-03). Мультипараметрическое иммунофенотипирование осуществляли для клеток общим количеством  $4 \times 10^6$  клеток/условие с использованием FMO-красителей, как описано в тексте. Клетки окрашивали при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/100 мкл PBS в течение 30 минут на льду с использованием концентраций антитела и реагента, рекомендованных производителем, промывали, ресуспенсировали в 0,5% параформальдегиде и определяли с использованием модифицированного LSRII (BD Immunocytometry systems), оборудованного синим (488 нм), фиолетовым (405 нм), зеленым (532) и красным (633 нм) лазерами и соответствующими наборами фильтров для определения и разделения указанных выше комбинаций антител. Для каждого красителя определяли минимум 100000 CD3+ клеток. Для функциональных анализов клетки промывали, окрашивали на поверхности маркеры, ресуспенсировали в 0,5% параформальдегиде и определяли, как указано выше; для каждого условия окрашивания собирали минимум 50000 CD3+ клеток. Значения компенсации устанавливали с использованием красителей для отдельных антител и бус BD для анализа компенсации (Becton Dickinson), и вычисляли и автоматически использовали с помощью инструмента. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (версии 8.8.4, Treestar). Для общего иммунофенотипирования клетки определяли с использованием цитометра Accuri C6, оборудованного синим (488) и красным (633 нм) лазером. Значения компенсации устанавливали с использованием красителей отдельных антител и бус BD для анализа компенсации (Becton Dickinson) и вычисляли вручную. Данные анализировали с использованием аналитического пакета программ C-Flow (версии 1.0.2 64.9, цитометры Accuri).

#### Анамнез пациентов и ответ на терапию

Обобщенные результаты клинического лечения представлены на фиг. 10. У пациента UPN 01 впервые диагностировали В-клеточного CLL стадии II в возрасте 55 лет. У пациента не наблюдали симптомов, и его наблюдали в течение приблизительно 1-1/2 лет до возникновения необходимости терапии прогрессирующего лимфоцитоза, тромбоцитопении, adenопатии и спленомегалии. После 4 циклов флурадарбина у пациента наблюдали полную нормализацию формулы крови и полный ответ по результатам КТ-сканирования. Отмечали прогрессирование в течение 5 месяцев с бессимптомным лимфоцитозом, тромбоцитопенией и повышенной adenопатией. У пациента не наблюдали симптомов в течение приблизительно 3 лет, и затем ему понадобилось лечение ритуксимабом и флурадарбином по поводу прогрессирующего лейкоцитоза, анемии и тромбоцитопении. Пациента лечили 4 циклами ритуксимаба с флурадарбином с частичным улучшением формулы крови. У пациента снова наблюдали прогрессирование в течение одного года, потребовавшее терапии и проявившееся лейкоцитозом (WBC 150000/мкл) и тромбоцитопенией (тромбоциты 30000/мкл), и его лечили алемтузумабом с нормализацией формулы крови. Отмечали прогрессирование в течение 13 месяцев. Затем пациенту проводили монотерапию ритуксимабом без

значимого ответа, и затем ритуксимабом, циклофосфамидом, винкристином и преднизоном (R-CVP) в течение 2 циклов с минимальным ответом, а затем леналидомидом. По причине токсичности прерывали терапию леналидомидом. Пациенту проводили 2 цикла пентостатина, циклофосфамида и ритуксимаба с минимальным ответом.

Позднее пациенту проводили лечение бендамустином в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, за 4 дня до инфузии клеток CART-19. Перед терапией, WBC составляли 14200/мкл, гемоглобин - 11,4 г/дл, количество тромбоцитов - 78000/мкл, и ALC составляло 8000/мкл. КТ-сканирование показало диффузную аденопатию и интенсивную инфильтрацию костного мозга CLL (67% клеток). Пациенту вводили  $1,6 \times 10^7$  клеток CART-19/кг (общее количество клеток CART-19  $1,13 \times 10^9$ , оцениваемое с помощью FACS). Не наблюдали токсичности при инфузии. У пациента развивалась нейтропения приблизительно через 10 дней после бендамустина и через 6 дней после инфузии клеток CART-19, и через 10 дней после первой инфузии CART-19 у пациента развивалась лихорадка, озноб и преходящая гипотензия. В то же время, рентген и КТ-сканирование грудной клетки показали пневмонию верхней левой доли, которую лечили антибиотиками. Лихорадка сохранялась в течение приблизительно 2 недель и разрешалась при восстановлении нейтрофилов. У пациента не наблюдали дальнейших инфекций или системных симптомов.

Пациент достигал быстрого и полного ответа, как показано на фиг. 5. Между 1 и 6 месяцем после инфузии с помощью проточной цитометрии не определяли циркулирующих клеток CLL в крови. По данным морфологического анализа и тестирования с помощью проточной цитометрии наблюдали длительное отсутствие лимфоцитарного инфильтрата в костном мозге через 1, 3 и 6 месяцев после инфузии клеток CART-19. КТ-сканирование через 1 и 3 месяца после инфузии показали полное разрешение аномальной аденопатии. У пациента сохранялась лейкопения (WBC 1000-3900/мкл), тромбоцитопения (тромбоциты  $\sim 100000$ /мкл) и умеренная гипогаммаглобулинемия (IgG 525 мг/дл, в норме 650-2000 мг/дл), но не наблюдали инфекционных осложнений.

Пациента UPN 02 лечили с использованием клеток CART-19 в возрасте 77 лет. В анамнезе пациент имел ишемическую болезнь сердца, и впервые диагностировали CLL в 2000 году в возрасте 68 лет, когда у пациента развивались утомляемость и лейкоцитоз. Пациент являлся относительно стабильным в течение 4 лет, когда у него развивался прогрессирующий лейкоцитоз (195000/мкл), анемия и тромбоцитопения, требующие терапии. В это время генетическое тестирование показало, что клетки CLL имеют делецию в хромосомном локусе 17p. По причине прогрессирующего заболевания пациенту проводили 12-недельный курс терапии алемтузумабом с частичным ответом и улучшением формулы крови. В течение полутора лет пациент имел прогрессирующий лейкоцитоз, анемию, тромбоцитопению и спленомегалию. С помощью кариотипического анализа подтверждали наличие делеции хромосомного локуса 17p, теперь с делецией хромосомного локуса 13q. Пациента повторно лечили алемтузумабом в течение 18 недель с улучшением лейкоцитоза и стабилизацией анемии и спленомегалии. У пациента наблюдали признаки прогрессирующего лейкоцитоза, анемии и тромбоцитопении в течение одного года. Лечение включало 2 цикла бендамустина с ритуксимабом, приведшие к стабильному заболеванию, но без значимого улучшения, как показано на фиг. 5A.

Пациенту проводили лечение только бендамустином в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, перед инфузии клеток CART-19. Пациенту вводили  $4,3 \times 10^6$  клеток CART-19/кг (общее количество клеток  $4,1 \times 10^8$ ) в 3 отдельных инфузиях, осложненных транзиторной лихорадкой до  $102^{\circ}\text{F}$  в течение 24 ч. В 11 день после первой инфузии пациенту проводили повторную инфузию  $4,1 \times 10^8$  ( $4,3 \times 10^6$ /кг) клеток CART-19, и эта инфузия осложнялась лихорадкой, ознобом и одышкой без гипоксии, что потребовало госпитализации на 24 ч. Не наблюдали признаков ишемии сердца, и симптомы разрешились. В день 15 после первой инфузии клеток CART-19 и в день 4 после повторной инфузии клеток CART-19 пациент поступил в больницу с высокой температурой (до  $40^{\circ}\text{C}$ ) и ознобом. С помощью обширного тестирования с использованием посевов крови и мочи и CXR не смогли идентифицировать источник инфекции. Пациент жаловался на одышку, но не имел гипоксии. Электрокардиограмма показала выраженный гипокинез. Фракция выброса составляла 20%. Пациенту вводили преднизон в дозе 1 мг на килограмм в течение одного дня и 0,3 мг на килограмм в течение приблизительно одной недели. Это приводило к быстрому разрешению лихорадки и дисфункции сердца.

Одновременно с развитием высокой температуры у пациента наблюдали резкое снижение количества лимфоцитов в периферической крови, как показано на фиг. 5A. Хотя у пациента наблюдали нормализацию лейкоцитарной формулы, у него сохранялись циркулирующие клетки CLL, стабильная умеренная анемия и тромбоцитопения. В костном мозге обнаруживали сохраняющуюся интенсивную инфильтрацию CLL через месяц после терапии, несмотря на значительную редукцию клеток в периферической крови, и КТ-сканирование показало частичное снижение аденопатии и спленомегалии. Через пять месяцев после инфузии клеток CART-19 у пациента развивался прогрессирующий лимфоцитоз. Через девять месяцев после инфузии у пациента наблюдали лимфоцитоз (16500/мкл) со стабильной умеренной анемией и тромбоцитопенией и со стабильной аденопатией. У пациента не наблюдали симптомов и не проводили дальнейшую терапию.

У пациента UPN 03 диагностировали бессимптомный CLL стадии I в возрасте 50 лет и затем наблюдали его в течение 6 лет. Позднее у пациента наблюдали прогрессирующую лейкоцитоз (лейкоцитарная формула 92000/мкл) и прогрессирующую аденопатию, требующие терапии. Пациенту проводили 2 цикла терапии ритуксимабом с флударабином, приведшие к нормализации формулы крови и значимому улучшению, хотя и не к полному разрешению аденопатии. У пациента был период без прогрессирования приблизительно 3 года, а затем в течение следующих 6 месяцев наблюдали быстро прогрессирующий лейкоцитоз (WBC 165000/мкл) и прогрессирующую аденопатию, требующую терапии. Пациенту проводили один цикл терапии флударабином и 3 цикла терапии ритуксимабом с флударабином с нормализацией формулы крови и разрешением пальпируемой аденопатии. У пациента был период без прогрессирования приблизительно 20 месяцев, пока у него снова не начал быстро развиваться прогрессирующий лейкоцитоз и аденопатия. В это время костный мозг подвергался интенсивной инфильтрации клетками CLL, и кариотипический анализ показал наличие клеток, содержащих делецию в хромосомном локусе 17p, и анализ FISH показал наличие делеции TP53 в 170/200 клеток. Пациенту проводили один цикл терапии ритуксимабом с бендамустином, а затем 4 цикла терапии только бендамустином (по причине тяжелой аллергической реакции на ритуксимаб). У пациента наблюдали начальную нормализацию формулы крови, но вскоре после прекращения терапии наблюдали прогрессирующий лейкоцитоз и аденопатию.

У пациента UPN 03 аферезом собирали аутологичные Т-клетки и осуществляли криоконсервацию. Затем пациента лечили алемтузумабом в течение 11 недель с исключительным гематологическим ответом. Наблюдали улучшение, хотя и не полное разрешение аденопатии. У пациента наблюдали активное, но стабильное заболевание в течение следующих 6 месяцев. Позднее пациенту проводили лечение пентостатином и циклофосфамидом в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, перед инфузией клеток CART-19.

Через три дня после химиотерапии, но перед инфузией клеток, костный мозг являлся гиперпластичным (60%) с приблизительно 40% поражением CLL. По причине производственных ограничений, свойственных аферезным образцам от пациентов с CLL, как показано в табл. 3 и (Bonyhadi et al., 2005, J Immunol 174:2366-2375), пациентам проводили инфузии с использованием в общей сложности  $1,46 \times 10^5$  CART-19+ клеток на кг (общее количество CART-19+ клеток  $1,42 \times 10^7$ ) в течение 3 дней. Не наблюдали инфузионной токсичности. Через четырнадцать дней после первой инфузии у пациента развивался озноб, лихорадка до 39°C, тошнота и диарея, которые лечили симптоматически. У пациента не наблюдали респираторных или сердечных симптомов. Ко дню 22 после инфузии диагностировали синдром распада опухоли, проявлявшийся повышением LDH, мочевой кислоты и осложненный почечной недостаточностью. Пациента госпитализировали и лечили жидкостной реанимацией и расбуриказой с быстрой нормализацией уровня мочевой кислоты и функции почек. Осуществляли подробный клинический анализ CXR, посевов крови, мочи и кала, и все они являлись негативными или нормальными.

В течение 1 месяца инфузии CART-19 у пациента наблюдали выведение циркулирующих клеток CLL из крови и костного мозга по данным морфологического исследования, проточной цитометрии, цитогенетического анализа и анализа FISH, и КТ-сканирование показало разрешение аномальной аденопатии (фиг. 5C). Ремиссия у пациента являлась длительной - более 8 месяцев от начальной инфузии клеток CART-19.

Далее описывают результаты экспериментов.

#### Клинический протокол

Три пациента с резистентным к химиотерапии CLL на поздней стадии включали в пилотное клиническое исследование, как показано на фиг. 1. Всех пациентов предварительно интенсивно лечили с использованием различных химиотерапевтических и биологических схем лечения, как показано на фиг. 10. Двое из пациентов имели p53-дефицитный CLL, делецию, учитывая которую, можно прогнозировать плохой ответ на общепринятою терапию и быстрое прогрессирование (Dohner et al, 1995, Blood, 85:1580-189). Каждый из пациентов имел большую опухолевую массу после предварительной химиотерапии, включая интенсивную инфильтрацию костного мозга (от 40 до 95%) и лимфаденопатию; также у пациента UPN 02 наблюдали значительный периферический лимфоцитоз. Т-клетки CART-19 получали, как показано на фиг. 1B, и подробности получения клеток и описание продукта для каждого пациента представлены в табл.4. Всех пациентов предварительно лечили в течение 1-4 дней перед инфузиями Т-клеток CART-19 с использованием химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов. Использовали дробный режим инфузии клеток для пробного тестирования CAR, включающего костимуляторный сигнальный домен 4-1BB, как показано на фиг. 1 A.

Таблица 4. Критерии выпуска продуктов афереза и продукта CART-19

	Анализ	Описание	UPN 01	UPN 02	UPN 03
Продукт афереза					
	Проточная цитометрия для CD3+ или CD45+	Нет данных	4,46%	2,29%	2,67%
Продукт CART-19					
	Общее количество инфузируемых клеток	$\sim 2-5 \cdot 10^9$	$5 \times 10^9$	$1,275 \cdot 10^9$ $1,275 \cdot 10^9$ ( $2,55 \cdot 10^9$ всего)	$3 \times 10^9$
	Жизнеспособность клеток	$\geq 70\%$	96,2%	95,3 (90,5) <sup>1</sup>	90,3
	% CD3+ клеток	$\geq 80\%$	88,9%	98,8	98,9
	Количество оставшихся бусин	$\leq 100$ бус/ $3 \times 10^6$ клеток	3,95	1	4
	Эндотоксин	$\leq 3,5$ ЭЕ/мл	<0,5 ЭЕ/мл	<0,5 ЭЕ/мл	<0,5 ЭЕ/мл
	Микоплазма	Негативный	Негативный	Негативный	Негативный
	Стерильность (Bactec)	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста
	Культура грибов	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста	Отсутствие роста
	BSA ELISA	$\leq 1$ мкг/мл	<0,5 нг/мл	<0,5 нг/мл	<0,5 нг/мл
	Репликационно-компетентный лентивирус (RCL)	Неопределенный RCL	Неопределенный	Недостаточный <sup>2</sup>	Недостаточный <sup>2</sup>
	Эффективность трансдукции (экспрессия ScFv)	$\geq 20\%$	22,6%	23%	4,74% <sup>3</sup>
	Последовательность ДНК вектора (CART19 PGR)	0,2-3 копий/клетку	0,15 <sup>3</sup>	0,275	0,101

1 = Доза #2.

2 = Результат анализа в день 12 ниже LOQ, снижающийся относительно более раннего при экспансии, соответствовал переносу плазмидой ДНК из векторного поколения.

Передано в FDA в качестве корректировки информации.

3 = высвобождение продукта на основе окрашивания поверхности посредством FACS.

4 = Исключение из лечения при условии критерия исключения внешними DSMC и IRB.

#### Экспансия и поддержание клеток CART-19 *in vivo* и их миграция в костный мозг

CAR+ Т-клетки экспандировали с использованием бус CD3/CD28, и считали, что экспрессия сигнального домена 4-1BB является улучшением CAR без 4-1BB. Разрабатывали анализ на основе Q-ПЦР, делающий возможным количественное отслеживание клеток CART-19 в крови и костном мозге. Все пациенты демонстрировали экспансию и поддержание клеток CART-19 в крови в течение по меньшей мере 6 месяцев, как показано на фиг. 2А и 2С. В частности, пациенты UPN 01 и UPN 03 демонстрировали 1000-10000-кратную экспансию CAR+ Т-клеток в крови в течение первого месяца после инфузии. Пиковые уровни экспансии совпадали с началом постинфузионных клинических симптомов у пациента UPN 01 (день 15) и пациента UPN 03 (день 23). Кроме того, после начальной задержки, которую можно моде-

лировать с использованием кинетики первого порядка, уровни Т-клеток CART-19 стабилизировались у всех 3 пациентов в дни 90-180 после инфузии. В немалой степени, у всех пациентов Т-клетки CART-19 также мигрировали в костный мозг, хотя и на уровнях в 5-10 раз ниже наблюдаемых в крови, как показано на фигурах 2D-2F. У пациентов UPN 01 и 03 наблюдали прямо пропорциональную задержку в костном мозге с потерей  $T^{1/2}$  -35 дней.

#### **Индукция специфического иммунного ответа в крови и компартментах костного мозга после инфузии клеток CART-19**

Собирали образцы сыворотки от всех пациентов и анализировали серию образцов для количественного определения уровней цитокинов, оценивая панель цитокинов, хемокинов и других растворимых факторов для оценки потенциальной токсичности и получения доказательств функционирования клеток CART-19, как показано на фиг. 3. Из тридцати тестируемых анализов одиннадцать имели 3-кратное или большее изменение по сравнению с исходным уровнем, включая 4 цитокина (IL-6, IFN  $\gamma$ , IL-8 и IL-10), 5 хемокинов (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, CXCL9, CXCL10) и растворимые рецепторы IL-1R $\alpha$  и IL-2R $\alpha$ . Из них интерферон  $\gamma$  имел наибольшее относительное изменение по сравнению с исходным уровнем. Примечательно, что время пика повышения уровня цитокина у UPN 01 и UPN 03 коррелировало во времени с описываемыми ранее клиническими симптомами и пиковыми уровнями клеток CART-19 в крови каждого пациента. У пациента UPN 02 отмечали только умеренные измерения, возможно, в результате лечения кортикоэстериоидами, вводимыми этому пациенту. В сыворотке пациентов не определяли повышение уровня растворимого рецептора IL-2, даже если одной из доклинических причин разработки CAR+ Т-клеток с сигнальными доменами 4-1BB являлась сниженная предрасположенность к запуску секреции IL-2 по сравнению с сигнальными доменами CD28 (Milone et al, 2009, Mol Ther. 17: 1453-1464). Это может иметь отношение к длительной клинической активности, т.к., как показали предыдущие исследования, CAR+ Т-клетки потенциально супрессированы регуляторными Т-клетками (Lee et al., 2011, Cancer Res 71:2871-2881), клетками, которые можно стимулировать CAR, секретирующими значительные количества IL-2, или введением экзогенного IL-2 после инфузии. В конечном итоге, наблюдали значительную индукцию секреции цитокинов в супернатантах аспиратов костного мозга UPN 03, как показано на фиг. 3D, что также совпадало с развитием синдрома распада опухоли и полной ремиссии.

#### **Длительная экспрессия и появление популяции клеток памяти CART-19 в крови**

Центральным вопросом CAR-опосредованной иммунотерапии злокачественных новообразований является следующий: повышают ли оптимизированное получение клеток и костимулирующие домены поддержание генетически модифицированных Т-клеток и делают ли возможным установление CAR+ Т-клеток памяти у пациентов. Предыдущие исследования не показали устойчивой экспансии, длительного поддержания и/или экспрессии CAR на Т-клетках после инфузии (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110). Анализ образцов крови и костного мозга с помощью проточной цитометрии в день 169 после инфузии позволил определить наличие экспрессирующих CAR19 клеток у UPN 03 (фиг. 4A и 4B) и отсутствие В-клеток, как показано на фиг. 4A. В частности, анализ с помощью Q-ПЦР показал, что все три пациента имели поддерживающиеся CAR+ клетки через 4 месяца и больше, как показано на фиг. 2 и 6. По данным проточной цитометрии частота CAR+ клеток *in vivo* близко соответствовала значениям, полученным при ПЦР-анализе для трансгена CART-19. Важно, что у пациента UPN 03 только CD3+ клетки экспрессировали CAR19, т.к. CAR 19+ клетки являлись неопределенными в CD16- или CD14-позитивных субпопуляциях, как показано на фиг. 4A. Экспрессию CAR также определяли на поверхности 4,2% Т-клеток в крови пациента UPN 01 в день 71 после инфузии, как показано на фиг. 7.

Затем для осуществления подробных исследований для дальнейшего описания экспрессии, фенотипа и функции клеток CART-19 у UPN 03 использовали многоцветную проточную цитометрию с использованием идиотипического антитела против CAR (MDA-647) и стратегии гейтирования, представленной на фиг. 8. Наблюдали значимые различия экспрессии маркеров памяти и активации в CD8+ и CD4+ клетки на основе экспрессии CAR19. В день 56 CART-19 CD8+ клетки демонстрировали, главным образом, эффекторный фенотип памяти (CCR7-CD27-CD28-), соответствующий длительному и сильному воздействию антигена, как показано на фиг. 4C. Наоборот, CAR-негативные CD8+ клетки состояли из смеси эффекторных клеток и клеток центральной памяти с экспрессией CCR7 в субпопуляции клеток и значительными количествами CD27+/CD28-H CD27+/CD28+ фракций. В то время как CART-19 и CAR-негативные популяции клеток значительно экспрессировали CD57, эта молекула равномерно коэкспрессировалась с PD-1 в клетках CART-19, что является возможным отражением обширной репликативной истории этих клеток. В отличие от популяции CAR-негативных клеток, во всей популяции CART-19 CD8+ клеток нет экспрессии CD25 и CD127. В то время как ко дню 169 фенотип популяции CAR-негативных клеток остается аналогичным образцу в день 56, популяция CART-19 развивалась в популяцию, содержащую миорную субпопуляцию со свойствами клеток центральной памяти, в частности, экспрессией CCR7, более высокими уровнями CD27 и CD28, а также CAR+ клетки, являвшиеся PD-1-негативными, CD57-негативными и CD127-позитивными.

В компартменте CD4+ в день 56 клетки CART-19 отличались равномерным отсутствием CCR7 и преобладанием CD27+/CD28+/PD-1+ клеток, распределенных по CD57+ и -компартментам, и значительным отсутствием экспрессии CD25 и CD127, как показано на фиг. 4В. Наоборот, в этот момент времени CAR-негативные клетки являлись гетерогенными по экспрессии CCR7, CD27 и PD-1, экспрессировали CD127 и также содержали значительную популяцию CD25+/CD127-клеток (потенциальных регуляторных Т-клеток). В то время как экспрессия CD28 ко дню 169 оставалась равномерно позитивной во всех CAR+CD4+-клетках, фракция CART-19 CD4+-клеток развивалась в сторону фенотипа центральной памяти с экспрессией CCR7, более высокой процентной долей CD27-клеток, наличием PD-1-негативной субпопуляции и приобретением экспрессии CD127. CAR-негативные клетки оставались в достаточной степени соответствующими эквивалентным им клеткам в день 56, за исключением снижения экспрессии CD27 и снижения процентной доли CD25+/CD127-клеток.

Клетки CART-19 могут сохранять эффекторную функцию после 6 месяцев в крови. В дополнение к кратковременному поддержанию и недостаточной пролиферации *in vivo*, ограничением предыдущих исследований с использованием CAR+ Т-клеток является быстрая потеря функциональной активности инфузированных Т-клеток *in vivo*. Высокий уровень поддержания клеток CART-19 и поверхностная экспрессия молекулы CAR19 у пациентов UPN 01 и 03 предоставляли возможность непосредственно тестировать анти-CD19-специфичные эффекторные функции в клетках, восстановленных из подвергнутых криоконсервации образцов периферической крови. PBMC от пациента UPN 03 культивировали с клетками-мишениями, явившимися позитивными или негативными по экспрессии CD19 (фиг. 4d). Сильную CD19-специфичную эффекторную функцию Т-клеток CART-19 демонстрировали с помощью специфической дегрануляции в ответ на CD19-позитивные, но не CD19-негативные клетки-мишени, что оценивали по поверхностной экспрессии CD107a. В частности, воздействие CD19-позитивных мишней на популяцию клеток CART-19 индуцировало быструю интернализацию поверхностного CAR19, как показано на фиг. 8 для поверхностной экспрессии CAR19 в тех же эффекторных клетках при стандартном окрашивании при проточной цитометрии. Наличие костимуляторных молекул на клетках-мишениях не являлось необходимым для запуска дегрануляции клеток CART-19, т.к. линия NALM-6 не экспрессирует CD80 или CD86 (Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 1: 5426-5435). Эффекторная функция являлась очевидной в день 56 после инфузии и сохранялась ко дню 19. Выраженную эффекторную функцию CAR+ и CAR- Т-клеток также можно продемонстрировать с помощью фармакологической стимуляции.

#### Клиническая активность клеток CART-19

У любого пациента в течение четырех дней после инфузии не наблюдали значимую токсичность, иную, чем транзиторные лихорадочные реакции. Однако затем у всех пациентов развивалась значительная клиническая и лабораторная токсичность между днем 7 и днем 21 после первой инфузии. Эта токсичность являлась кратковременной и обратимой. Из трех пациентов, подвергнутых лечению к настоящему времени, согласно стандартным критериям 2 представляли собой CR и 1 представлял собой PR через >6 месяцев после инфузии CART-19 (Hallek et al., 2008, Blood 111: 5446). Подробности анамнеза и ответа на терапию для каждого пациента представлены на фиг. 10.

Вкратце у пациента UPN 01 развивался фебрильный синдром с ознобом и преходящей гипотензией, начиная со дня 10 после инфузии. Лихорадка сохранялась в течение приблизительно 2 недель и разрешалась; у пациента не наблюдали дальнейших системных симптомов. Пациент достигал быстрого и полного ответа, как показано на фиг. 5. Между 1 и 6 месяцем после инфузии с помощью проточной цитометрии не определяли циркулирующих клеток CLL в крови. В костном мозге через 1, 3 и 6 месяцев после инфузии клеток CART-19 наблюдали длительное отсутствие лимфоцитарной инфильтрации по данным морфологического исследования и проточной цитометрии, как показано на фиг. 5В. Через 1 и 3 месяца после инфузии при КТ-сканировании наблюдали разрешение adenопатии, как показано на фиг. 5С. Полная ремиссия являлась длительной в течение 10+ месяцев на момент публикации этой заявки.

Пациента UPN 02 лечили 2 циклами терапии бендамустином с ритуксимабом, что приводило к стабилизации заболевания, как показано на фиг. 5А. Пациенту вводили третью дозу бендамустина в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, перед инфузией Т-клеток CART-19. У пациента развивалась лихорадка до 40°C, озноб и одышка, потребовавшие 24-часовой госпитализации в день 11 после первой инфузии и в день второй повторной инфузии клеток CART-19. Лихорадка и системные симптомы сохранялись и в 15 день, у пациента наблюдали временную дисфункцию сердца; все симптомы разрешались после терапии кортикоステроидами, начатой в 18 день.

После инфузии клеток CART-19 и соответственно с началом повышения температуры у пациента наблюдали быстрое выведение p53-дефицитных клеток CLL из периферической крови, как показано на фиг. 5А, и частичное снижение adenопатии, через один месяц после терапии в костном мозге наблюдали сохраняющуюся интенсивную инфильтрацию клетками CLL, несмотря на значительную редукцию клеток в периферической крови. Пациент оставался бессимптомным.

Пациенту UPN 03 проводили лечение пентостатином и циклофосфамидом в качестве химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов, перед инфузией клеток CART-19. Через три дня после химиотерапии, но перед инфузией клеток, костный мозг являлся гиперпластичным (60%) с

приблизительно 50% поражением CLL. Пациенту вводили низкую дозу клеток CART-19 ( $1,5 \times 10^5$  CAR+ Т-клеток/кг, разделенные на 3 дня). Снова не наблюдали острой инфузционной токсичности. Однако через 14 дней после первой инфузии у пациента начал развиваться озноб, лихорадка, тошнота и диарея. Ко дню 22 после инфузии диагностировали синдром распада опухоли, требующий госпитализации. У пациента наблюдали разрешение системных симптомов и в течение 1 месяца инфузии CART-19 у пациента наблюдали выведение циркулирующих клеток CLL из крови и костного мозга по данным морфологического исследования, проточной цитометрии, цитогенетического анализа и анализа FISH. При КТ-сканировании наблюдали разрешение аномальной аденоапатии, как показано на фиг. 5В и 5С. Полная ремиссия длилась более 8 месяцев после начальной инфузии клеток CART-19.

#### **Обсуждение соотношения *in vivo* эффекторных клеток CART-19 и клеток-мишеней CLL**

Доклинические исследования показали, что можно удалять большие опухоли и что с помощью инфузии  $2,2 \times 10^7$  клеток с CAR можно осуществлять устранение опухолей, содержащих  $1 \times 10^9$  клеток, для соотношения E:T *in vivo* 1:42 у гуманизированных мышей (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 3360-3365), хотя в этих вычислениях не принимали во внимание экспансию Т-клеток после инъекции. В оценке опухолевой массы CLL с течением времени допускали вычисление уменьшения опухоли и получали приблизительные соотношения CART-19 E:T *in vivo* у трех индивидуумов на основании количества инфузированных CAR+ Т-клеток. Общие опухолевые массы вычисляли измерением опухолевой массы CLL в костном мозге, крови и вторичных лимфоидных тканях. Опухолевые массы на начальном уровне, как показано на фиг. 10, свидетельствуют о том, что каждый пациент имел порядка  $10^{12}$  клеток CLL (т.е. опухолевая масса 1 килограмм) до инфузии CART-19. Пациент UPN 03 на начальном уровне имел приблизительную опухолевую массу  $8,8 \times 10^{11}$  клеток CLL в костном мозге в день -1 (т.е. после химиотерапии и перед инфузией CART-19) и измеряемую опухолевую массу во вторичных лимфоидных тканях  $3,3-5,5 \times 10^{11}$  клеток CLL в зависимости от способа волюметрического анализа срезов КТ. С учетом того, что UPN 03 инфузировали только  $1,4 \times 10^7$  клеток CART-19, использовали оценку исходной общей опухолевой массы ( $1,3 \times 10^{12}$  клеток CLL) и того, что не определяли клетки CLL после лечения, достигали исключительного соотношения E:T 1:93000. С помощью аналогичных вычислений вычисляли эффективное соотношение E:T *in vivo* 1:2200 и 1:1000 для UPN 01 и UPN 02 (как показано в табл.3). В конечном итоге, вероятно, что в мощных противолейкозных эффектах, опосредуемых клетками CART-19, задействовано последовательное уничтожение Т-клетками CART-19 в комбинации с экспансией CART-19 *in vivo* в  $>1000$ -раз.

Т-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, служат основой для иммунологической памяти и выраженных противоопухолевых эффектов у пациентов с лейкозом на поздней стадии

Ограничения экспрессии *in vivo* и эффекторная функция CAR являются основными ограничениями в пробных исследованиях CAR первого поколения (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Park et al., 2007, Mol Ther 15:825833; Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270). На основе доклинического моделирования, демонстрирующего повышенное поддержание CAR, содержащего сигнальный модуль 4-1BB (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17: 1453-1464; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106: 3360-3365), осуществляли дизайн экспериментов для разработки второго поколения CAR, сконструированных с использованием технологии лентивирусных векторов. Обнаруживали, что это второе поколение CAR является безопасным в условиях хронической ВИЧ-инфекции (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA 103: 17372-17377). Настоящие результаты показали, что, когда это второе поколение CAR экспрессируется в Т-клетках, и их культивируют в условиях, подобранных для увеличения энgraftmenta Т-клеток центральной памяти (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11:1230-1237; Bondanza et al., 2006, Blood 107: 1828-1836), наблюдали улучшенную экспансию Т-клеток с CAR после инфузии по сравнению с предыдущими данными. Клетки CART-19 являлись основой для CD19-специфичной клеточной памяти и уничтожали опухолевые клетки в соотношениях E:T *in vivo*, которых ранее не достигали.

CART-19 является первым исследуемым CAR, включающим сигнальный домен 4-1BB, и первым, для которого используют технологию лентивирусных векторов. Настоящие результаты демонстрируют эффективную миграцию клеток с CAR в участки опухоли с появлением *de facto* "инфильтрирующих опухоль лимфоцитов", проявляющих CD19-специфичность. Выраженная экспансия *in vivo* позволила впервые продемонстрировать, что клетки с CAR, выделенные непосредственно у пациентов, могут сохранять эффекторную функцию *in vivo* в течение месяцев. Результаты предыдущего исследования позволяли предполагать, что введение первого поколения CAR в вирус-специфичные Т-клетки является предпочтительным для первичных Т-клеток (Pule et al., 2008, Nat Med 14:1264-1270), однако результаты для второго поколения CAR, встроенных в оптимально костимулированные первичные Т-клетки, ставят этот вывод под вопрос. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, возникает сомнение, что клинические эффекты являлись полными и беспрецедентными с лизисом опухолевых масс весом в килограмм у всех трех пациентов, сопровождающимся отсроченным высвобождением потенциально опасных цитокинов на высоких уровнях у двух из пациентов. Классических эффектов цитокиновой бури не наблюдали. Однако настоящее исследование планировали для снижения этой возможности посредством намеренной инфузии CART-19 в течение трех дней.

Обнаруживали, что очень низкие дозы CAR могут вызывать выраженные клинические ответы. В пилотном исследовании демонстрировали безопасность сконструированного вектора CART-19. Данные о том, что дозы клеток CART-19 на несколько порядков ниже тестируемых в предыдущих исследованиях могут обладать клиническим преимуществом, могут иметь важное значение для будущего осуществления терапии CAR в более широком масштабе и для дизайна пробных исследований CAR, направленных против мишеней, иных, чем CD19.

Кроме того, настоящее исследование показало, что CART-19 экспрессируется и в Т-клетках центральной памяти, и эффекторных Т-клетках, и, вероятно, вносит вклад в их длительное выживание по сравнению с предыдущими исследованиями. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, Т-клетки с CAR могут дифференцироваться *in vivo* в подобное центральной памяти состояние после контакта с клетками-мишениями (например, опухолевыми клетками CLL или нормальными В-клетками), экспрессирующими антиген-имитатор, и последующего их устранения. Как сообщают, фактически передача сигнала 4-1BB усиливает развитие памяти в отношении передачи сигнала TCR (Sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28: 333-339).

Длительная пролиферация и выживание клеток CART-19 позволили выявить аспекты фармакокинетики Т-клеток с CAR, о которых ранее не сообщали. Наблюдали, что кинетика высвобождения цитокинов в сыворотке и костном мозге коррелировала с пиковыми уровнями CART-19, таким образом, возможно, задержка инициируется, когда клетки-мишени, экспрессирующие CD19, становятся ограниченными. Механизм длительного выживания CART-19 может относится к указанному выше встраиванию домена 4-1BB или к передаче сигнала через природный TCR и/или CAR. Любопытной возможностью является то, что длительное выживание относится к популяции CART-19, идентифицированной в образцах костного мозга, давая начало гипотезе, что CD19 CAR могут поддерживаться посредством контакта с предшественниками В-клеток в костном мозге. В связи с этим возникает вопрос, что запускает исходную экспансию клеток CART-19 *in vivo*? За редким исключением (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110; Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270) настоящее исследование является единственным, в котором пренебрегали инфузией IL-2, таким образом, клетки CART-19, вероятно, пролиферируют в ответ на гомеостатические цитокины или, что более вероятно, на CD19, экспрессируемый на лейкозных мишенях и/или нормальных В-клетках. В последнем случае это может являться привлекательным свойством для CAR, направленных против мишеней на нормальных АПК, таких как CD19 и CD20, если возможно осуществление самообновления CART-19 на нормальных клетках, обеспечивающее механизм памяти CAR посредством "самовакцинации/повторной вакцинации" и, таким образом, длительный опухолевый иммунологический надзор. Механизмы гомеостаза CART-19 могут требовать дополнительных исследований для выявления внутренних и внешних механизмов поддержания клеток. До этих результатов большинство исследователей рассматривали терапию CAR как временную форму иммунотерапии, однако CAR с оптимизированными сигнальными доменами могут играть роль и в индукции ремиссии и восстановления, а также в длительном иммунологическом надзоре.

Выраженные противолейкозные эффекты наблюдали у всех трех пациентов, включая двух пациентов с p53-дефектным лейкозом. Предыдущие исследования с использованием CAR столкнулись с трудностями разделения эффектов CAR и противоопухолевых эффектов химиотерапии, направленной на снижение количества лимфоцитов. Однако задержанное высвобождение цитокинов в комбинации с кинетикой одновременного распада опухоли у флуадарбин-рефрактерных пациентов, возможно, зависящего от экспансии клеток с CAR *in vivo* в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что CART-19 опосредует выраженные противоопухолевые эффекты. Настоящие результаты не исключают роли химиотерапии в потенцировании эффектов CAR.

Тщательное сравнение вектора, трансгена и способов получения клеток с результатами продолжающихся исследований в других центрах может потребовать полного понимания ключевых свойств, необходимых для достижения длительного функционирования Т-клеток с CAR *in vivo*. В отличие от терапии антителами CAR-модифицированные Т-клетки обладают потенциалом для пролиферации *in vivo*, и их длительное поддержание может приводить к длительному контролю опухоли. Доступность готового терапевтического средства, состоящего из цитотоксических Т-клеток без перекрестной резистентности, обладает потенциалом в улучшении исхода у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями. Ограничение терапии антителами, например, с использованием средств, таких как ритуксимаб и бевацизумаб, состоит в том, что терапия требует повторных инфузий антител, что является неудобным и дорогостоящим. Осуществление длительной (в этом случае в течение по меньшей мере 6 месяцев у 3 из 3 пациентов, подвергнутых лечению к настоящему времени) терапии антителами с использованием scFv против CD19, экспрессируемых на Т-клетках после однократной инфузии клеток CART-19, обладает рядом практических преимуществ, включая удобство и экономию затрат.

Пример 2. Модифицированные Т-клетки с химерным антигенным рецептором при хроническом лимфоидном лейкозе

Конструировали лентивирусные векторы, экспрессирующие химерный антигенный рецептор со специфичностью для В-клеточного антигена CD19, соединенный с CD137 (костимуляторным рецептором в Т-клетках [4-1BB]) и сигнальными доменами CD3-дзета (компонент передачи сигнала Т-

клеточного антигенного рецептора). Наблюдали, что низкая доза (приблизительно  $1,5 \times 10^5$  клеток на килограмм массы тела) модифицированных аутологичных Т-клеток с химерным антигенным рецептором, реинфузированных пациенту с рефрактерным хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), экспансионировалась до уровня, более чем в 1000 раз большего исходного уровня энgraftmenta *in vivo*. Также наблюдали, что пациент проявлял задержанное развитие синдрома распада опухоли с полной ремиссией.

Помимо синдрома распада опухоли единственным другим токсическим эффектом степени 3/4, связанным с Т-клетками с химерным антигенным рецептором, являлась лимфопения.

Сконструированные клетки сохранялись на высоких уровнях в течение по меньшей мере 6 месяцев в крови и костном мозге и продолжали экспрессировать химерный антигенный рецептор. В костном мозге определяли специфический иммунный ответ, которому сопутствовала потеря нормальных В-клеток и лейкозных клеток, экспрессирующих CD19. Ремиссия продолжалась 10 месяцев после лечения. Гипогаммаглобулинемия являлась ожидаемым хроническим токсическим эффектом.

Далее описывают материалы и способы, используемые в этих экспериментах.

#### Материалы и способы

##### Способы исследования

Конструировали самоинактивирующиеся лентивирусные векторы (GeMCRTS 0607-793), которые подвергали доклиническому тестированию на безопасность, как сообщали ранее (Milone et al., 2009, Mol Ther, 17: 1453-64). Способы получения Т-клеток также описывали ранее (Porter et al., 2006, Blood, 107: 1325-31). Осуществляли анализ с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения Т-клеток с химерным антигенным рецептором в крови и костном мозге. Нижний предел количественного анализа определяли по стандартной кривой, средние значения ниже нижнего предела количественного анализа (т.е. определяемые, но не поддающиеся количественному анализу) считали приблизительными. Нижний предел количественного анализа составлял 25 копий на микрограмм геномной ДНК.

Анализ растворимых факторов осуществляли с использованием сыворотки из цельной крови и костного мозга, разделенной на аликовты для однократного использования, и хранили при температуре -80°C. Количественный анализ растворимых цитокинов осуществляли с использованием технологии и реагентов Luminex bead-array (Life Technologies).

##### Аферез № 1.

В аферезном центре осуществляли аферез 12-15 л. В течение этой процедуры получают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) для получения Т-клеток CART-19. При однократном лейкоферезе собирали по меньшей мере  $50 \times 10^9$  лейкоцитов для получения Т-клеток CART-19. Также на начальном уровне получали лейкоциты крови и подвергали криоконсервации.

#### Цитостатическая химиотерапия

Химиотерапию начинают приблизительно за 5-10 дней до инфузии таким образом, что клетки CART-19 можно вводить через 1-2 дня после завершения химиотерапии. Таким образом, время начала химиотерапии зависит от длительности схемы лечения. Целью химиотерапии является индукция лимфопении для облегчения энgraftmenta и гомеостатической экспансии клеток CART-19. Также химиотерапию можно выбирать для снижения опухолевой массы при заболевании. Цитостатическую химиотерапию выбирают и проводят онкологи. Выбор химиотерапии зависит от заболевания, которым страдает пациент, и предшествующей терапии. Флударабин ( $30 \text{ мг}/\text{м}^2/\text{день} \times 3 \text{ дня}$ ) и циклофосфамид ( $300 \text{ мг}/\text{м}^2/\text{день} \times 3 \text{ дня}$ ) являются средствами выбора, т.к. в этой области накоплен большой опыт использования этих средств в проведении адоптивной иммунотерапии. Подходящими являются несколько других приемлемых схем лечения с использованием одобренных FDA лекарственных средств, включая СНОР, HyperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE или другие схемы лечения.

#### Оценка рестадирования

По завершении химиотерапии осуществляют ограниченное рестадирование для проведения измерений исходного уровня опухолевой массы. Оно включает визуализацию, физикальное обследование и оценку минимального остаточного заболевания (MRD). Индивидуумов подвергали следующему преинфузионному тестированию: физикальному обследованию, документации побочных эффектов и заборам крови для гематологического анализа, биохимического анализа и тестирования на беременность (в случае необходимости).

#### Получение Т-клеток CART-19

Аутологичные Т-клетки конструировали для экспрессии внеклеточного одноцепочечного антитела (scFv) со специфичностью к CD19. Внеклеточное scFv может перенаправлять специфичность трансдуцированных Т-клеток на клетки, экспрессирующие CD19, молекулу, рестриционированную по экспрессии на поверхности злокачественных клеток и нормальных В-клеток. В дополнение к scFv против CD19 клетки трансдуцировали для экспрессии внутриклеточной сигнальной молекулы, состоящей из TCR $\zeta$ -цепи или tandemного сигнального домена, состоящего из сигнальных модулей 4-1BB и TCR $\zeta$ . scFv получают из моноклонального антитела мыши, и, таким образом, оно содержит последовательности мыши, но сигнальные домены полностью происходят из нативных последовательностей человека. Т-клетки CART-19

получают выделением Т-клеток аферезом и с использованием технологии лентивирусных векторов (Drapalic 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 вводили контрольные scFv:TCR для сравнительного эксперимента по репопуляции. Эти рецепторы являются "универсальными", т.к. они связывают антиген МНС-независимым образом, таким образом, одну конструкцию рецептора можно использовать для лечения популяции пациентов с позитивными по антигену CD19 опухолями.

Конструкции CAR разрабатывали в University of Pennsylvania, и вектор клинической категории получали в Lentigen Corporation. Клетки CART-19 получали в Clinical Cell and Vaccine Production Facility в University of Pennsylvania способом, представленным на фиг. 11. В конце культивирования клетки подвергали криоконсервации в инфицируемых средах для криоконсервации. Однократную дозу трансдущированных Т-клеток CART-19, состоящую из дозы для инфузии в общей сложности от  $2,5 \times 10^9$  до  $5 \times 10^9$  клеток, вводят в 1 или 2 мешка. Каждый мешок содержит аликвоту (объем зависит от дозы) сред для криоконсервации, содержащие следующие инфицируемые реагенты (% об./об.): 31,25 плазмалита-А, 31,25 декстрозы (5%), 0,45 NaCl, до 7,50 DMSO, 1,00 декстрана 40, 5,00 сывороточного альбумина человека с приблизительно  $2,5-5 \times 10^9$  аутологичными Т-клетками на мешок. Для повышения безопасности первую дозу вводили как дробную дозу в дни 0, 1 и 2, с использованием ~10% клеток в день 0, 30% в день 1 и 60% в день 2.

### Хранение

Мешки (емкостью от 10 до 100 мл), содержащие трансдущированные Т-клетки CART-19, хранили в условиях банка крови в контролируемой морозильной камере при температуре 135°C. Мешки для инфузии хранили в морозильной камере до возникновения необходимости.

### Размораживание клеток

После регистрации клеток в исследовательском аптечном пункте замороженные клетки перемещали на сухом льду к постели пациента. Клетки размораживали с использованием водяной бани, поддерживаемой при температуре от 36 до 38°C, у постели пациента в количестве одного мешка за один раз. Мешок осторожно переворачивали до момента окончания размораживания клеток. В контейнере не должно оставаться замороженных комочек. Если клеточный продукт CART-19, по-видимому, имеет поврежденный или протекающий мешок или иные нарушения, нельзя проводить инфузию.

### Премедикация

Побочные эффекты после инфузий Т-клеток могут включать временную лихорадку, озноб и/или тошноту. Рекомендуют премедикацию индивидуума с использованием 650 мг ацетаминофена перорально и 25-50 мг гидрохлорида дифенгидрамина перорально или i.v. перед инфузией клеток CART-19. Введение этих лекарств можно повторять каждые шесть часов по мере необходимости. Можно прописывать курс нестероидных противовоспалительных средств, если у пациента продолжается лихорадка, необлегчаемая ацетаминофеном. Рекомендуют в любое время не вводить пациентам системные кортикоиды, такие как гидрокортизон, преднизон, преднизолон (Solu-Medrol) или дексаметазон (Decadron), за исключением случаев, опасных для жизни, т.к. они могут оказывать неблагоприятное воздействие на Т-клетки. Если кортикоиды необходимы при острой инфузционной реакции, рекомендуют начальную дозу гидрокортизона 100 мг.

### Введение/Инфузия

Инфузии начинают через 1-2 дня после завершения химиотерапии. В день первых инфузий пациентам проводят общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и оценку количества CD3, CD4 и CD8, т.к. химиотерапию проводили, частично, для индукции лимфопении. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, полагают, что начальная i.v. доза  $2,5-5 \times 10^9$  клеток CART-19 является оптимальной для этого протокола. Т.к. у здорового взрослого человека существует приблизительно  $1 \times 10^{12}$  Т-клеток, предполагаемая общая доза Т-клеток эквивалентна 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 как дробную дозу в дни 0 (10%), 1 (30%) и 2 (60%). Индивидуумам проводят инфузии в отдельной комнате. Клетки размораживают у постели пациента, как представлено в настоящем описании. Размороженные клетки вводят так быстро, как это переносит пациент, таким образом, что продолжительность инфузии составляет приблизительно 10-15 мин. Трансдущированные Т-клетки вводят быстрой внутривенной инфузией при скорости приблизительно от 10 до 20 мл в минуту через систему калибра 18 без латекса Y-типа с трехходовым краном. Продолжительность инфузии составляет приблизительно 15 мин. Один или два мешка модифицированных клеток CART-19 доставляют на льду и клетки вводят индивидууму холодными. У индивидуумов, которым вводят смеси клеток CART-19, для облегчения смешивания клетки вводят одновременно с использованием Y-адаптера. Индивидуумам проводят инфузию и премедикацию, как представлено в настоящем описании. Оценивают основные показатели жизнедеятельности индивидуумов и проводят пульсоксиметрию перед введением дозы, в конце инфузии, затем каждые 15 мин в течение 1 ч и пока они не станут стабильными и удовлетворительными. Образец крови для определения исходного уровня CART-19 получают перед инфузией и через 20 мин после инфузии. В

случае пациентов, у которых наблюдали токсичность при предшествующей цитостатической химиотерапии, задерживали проведение инфузий до разрешения этих токсических явлений. Конкретные токсические явления, требующие задержки инфузий Т-клеток, включают: 1) легочные: потребность в дополнительном кислороде для сохранения насыщенности более 95% или наличие прогрессирующих аномалий по данным рентгенографического исследования грудной клетки; 2) сердечные: возникшая сердечная аритмия, не контролируемая с использованием лекарственных средств; 3) гипотензия, требующая введения лекарственных средств, повышающих артериальное давление; 4) активная инфекция: положительные посевы крови на бактерии, грибы или вирусы в течение 48 ч после инфузий Т-клеток. Образец сыворотки на калий и мочевую кислоту забирали перед первой инфузией, а также через два часа после каждой последующей инфузии.

#### **Лабораторные исследования после инфузий для оценки энgraftmenta и поддержания**

Индивидуумы возвращались в день 4 и 10 после начальной инфузий клеток CART-19 для забора крови на уровень цитокинов в сыворотке и ПЦР CART-19 для оценки наличия клеток CART-19. Индивидуумы возвращались раз в неделю в течение трех недель для следующего: физикального обследования, документации побочных эффектов и заборов крови для гематологического анализа, биохимического анализа, анализа энgraftmenta и поддержания клеток CART-19 и лабораторных исследований.

#### **Вторая инфузия**

Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, полагают, что вторую дозу клеток CART-19 можно вводить пациентам в день 11 при условии, что они проявляют соответствующую толерантность к первой дозе и получено достаточно клеток CART-19. Доза составляет в общей сложности  $2-5 \times 10^9$  клеток. Образец сыворотки на калий и мочевую кислоту можно собирать через два часа после инфузий.

#### **Второй аферез**

В аферезном центре осуществляли аферез 2 л. Получали РВМС для исследования и подвергали их криоконсервации. Индивидуумов подвергали следующему: физикальному обследованию, документации побочных эффектов и заборам крови для гематологического анализа, биохимического анализа, анализа энgraftmenta и поддержания клеток CART-19 и лабораторных анализов. Кроме того, осуществляли рестадирование для проведения измерений опухолевой массы. Тестирование для рестадирования определяли по типу заболевания, и оно включало визуализацию, оценку MRD, аспирацию и биопсию костного мозга и/или биопсию лимфоузлов.

#### **Ежемесячные обследования в течение от 2 до 6 месяцев после инфузии**

Индивидуумы возвращались ежемесячно в течение от 2 до 6 месяцев после инфузий клеток CART-19. В эти визиты индивидуумов подвергали следующему: введению средств комплексной терапии, физикальному обследованию, документации побочных эффектов и заборам крови для гематологического анализа, биохимического анализа, анализа энgraftmenta и поддержания клеток CART-19 и лабораторным исследованиям. Анализ ДНК на ВИЧ осуществляют через 2-6 месяцев после инфузии клеток CART-19 для исключения наличия определяемого RCL.

#### **Ежеквартальные обследования в течение периода до 2 лет после инфузии**

Индивидуумов обследовали ежеквартально до достижения 2 лет после инфузий. В эти визиты индивидуумов подвергали следующему: введению средств комплексной терапии, физикальному обследованию, документации побочных эффектов и заборам крови для гематологического анализа, биохимического анализа, анализа энgraftmenta и поддержания клеток CART-19 и лабораторных анализов. Анализ ДНК на ВИЧ осуществляли через 3 и 6 месяцев после инфузий клеток CART-19 для исключения наличия определяемого RCL.

Далее описывают результаты экспериментов.

#### **Анамнез пациента**

У пациента диагностировали CLL стадии I в 1996 г. Через 6 лет наблюдения ему впервые понадобилось лечение по причине прогрессирующего лейкоцитоза и аденопатии. В 2002 г. ему проводили два цикла терапии ритуксимабом и флударабином; это лечение привело к нормализации формулы крови и частичному разрешению аденопатии. В 2006 г. ему проводили четыре цикла терапии ритуксимабом и флударабином по причине прогрессирования заболевания, снова с нормализацией формулы крови и частичной ремиссией аденопатии. За этим ответом последовал 20-месячный промежуток времени без прогрессирования и 2-летний промежуток времени без лечения. В феврале 2009 г. у него развился быстро прогрессирующий лейкоцитоз и рецидивирующая аденопатия. Его костный мозг подвергся интенсивной инфильтрации клетками CLL. Цитогенетический анализ показал, что 3 из 15 клеток содержали делецию в хромосомном локусе 17p, и анализ флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) показал, что 170 из 200 клеток имели делецию, включающую TP53 в хромосомном локусе 17p. Ему вводили ритуксимаб с бендамустином в течение одного цикла терапии и проводили три дополнительных цикла терапии бендамустином без ритуксимаба (по причине тяжелой аллергической реакции). Это лечение приводило только к временному улучшению лимфоцитоза. С помощью компьютерной томографии (КТ) после терапии определяли прогрессирующую аденопатию.

Аутологичные Т-клетки собирали с помощью лейкофереза и подвергали криоконсервации. Затем

пациенту вводили алемтузумаб (антитело против CD52, маркера зрелых лимфоцитов, поверхностного антигена клетки) в течение 11 недель с улучшением гемопоэза и частичным разрешением аденоатии. В течение следующих 6 месяцев у него наблюдали стабильное заболевание с сохраняющимся интенсивным вовлечением костного мозга и диффузной аденоатией, затрагивающей многочисленные лимфоузлы размером от 1 до 3 см. В июле 2010 г. пациента включали в клиническое испытание фазы 1 модифицированных Т-клеток с химерным антигенным рецептором.

#### Инфузии клеток

Аутологичные Т-клетки пациента размораживали и трансдудицировали лентивирусом для экспрессии CD19-специфичного химерного антигенного рецептора (фиг. 1А); идентификаторы последовательности из лентивирусных векторов и родственные последовательности представлены в табл. 5. За четыре дня до инфузии клеток пациенту проводили химиотерапию, направленную на снижение количества лимфоцитов (пентостатин в дозе 4 мг на квадратный метр поверхности тела и циклофосфамид в дозе 600 мг на квадратный метр) без ритуксимаба (Lamanna et al, 2006, J Clin Oncol, 24: 1575-81). Через три дня после химиотерапии, но перед инфузией клеток, костный мозг являлся гиперпластичным с приблизительно 40% поражением CLL. Лейкозные клетки экспрессировали легкую каппа-цепь и CD5, CD19, CD20 и CD23. Цитогенетический анализ показал наличие двух отдельных клонов с потерей хромосомного локуса 17р и локуса TP53 (46,XY,del(17)(p12)[5]/46,XY,der(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14]). Через четыре дня после химиотерапии пациенту вводили, в общей сложности,  $3 \times 10^8$  Т-клеток, из которых 5% являлись трансдудицированными - в общей сложности,  $1,42 \times 10^7$  трансдудицированных клеток ( $1,46 \times 10^5$  клеток на килограмм), разделенных на три последовательные ежедневные внутривенные инфузии (10% в день 1, 30% в день 2 и 60% в день 3). После инфузии не вводили цитокины. Не отмечали токсических эффектов после инфузии.

Таблица 5. Идентификаторы последовательности для вектора pELPS-CD19-BBZ для передачи генов

SEQ ID NO: №	ИДЕНТИЧНОСТЬ
SEQ ID NO: 1	Вектор pELPS-CD19-BBZ (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 2	U3 RSV (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 3	R-повтор ВИЧ (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 4	U5-повтор ВИЧ (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 5	Часть Gag/Pol (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 6	cPPT (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 7	Промотор EF1 альфа (последовательность нуклеиновой кислоты)

SEQ ID NO: 8	CD19-BBZ CAR (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 9	Hu Woodchuck PRE (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 10	R-повтор (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 11	U5-повтор (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 12	CD19-BBZ CAR (аминокислотная последовательность)
SEQ ID NO: 13	Лидерная последовательность CD8 (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 14	scFv против CD19 (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 15	Шарнирный домен CD8 (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 16	Трансмембранный домен CD8 (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 17	4-1BB (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 18	CD3-дзета (последовательность нуклеиновой кислоты)
SEQ ID NO: 19	Лидерная последовательность CD8 (аминокислотная последовательность)
SEQ ID NO: 20	scFv против CD19 (аминокислотная последовательность)
SEQ ID NO: 21	Шарнирный домен CD8 (аминокислотная последовательность)
SEQ ID NO: 22	Трансмембранный домен CD8 (аминокислотная последовательность)
SEQ ID NO: 23	4-1BB (аминокислотная последовательность)
SEQ ID NO: 24	CD3-дзета (аминокислотная последовательность)

#### Клинический ответ и оценка

Через четырнадцать дней после первой инфузии пациент начал испытывать озноб и субфебрилитет, ассоциированный с утомляемостью степени 2. В течение следующих 5 дней озноб усиливался и температура повышалась до 39,2°C (102,5°F), сопровождаясь ознобом, повышенным потоотделением, потерей аппетита, тошнотой и диареей. У него не наблюдали респираторных или сердечных симптомов. По причине лихорадки осуществляли рентгенографию грудной клетки и посевы крови, мочи и кала, и все они являлись негативными или нормальными. Синдром распада опухоли диагностировали в день 22 после инфузии (фиг. 12B). Уровень мочевой кислоты составлял 10,6 мг на децилитр (630,5 ммоль на литр), уровень фосфора составлял 4,7 мг на децилитр (1,5 ммоль на литр) (нормальный диапазон: 2,4 до 4,7 мг на децилитр [от 0,8 до 1,5 ммоль на литр]) и уровень лактатдегидрогеназы составлял 1130 Е на литр (нормальный диапазон: от 98 до 192). Наблюдали признаки острой почечной недостаточности с уровнем креатинина 2,60 мг на децилитр (229,8 ммоль на литр) (начальный уровень: <1,0 мг на децилитр [<88,4 ммоль на литр]). Пациента госпитализировали и лечили с использованием жидкостной реанимации и расбуриказы. Уровень мочевой кислоты возвращался к нормальному диапазону в течение 24 ч, а уровень креатинина - в течение 3 дней; его выписывали из больницы в день 4. Уровень лактатдегидрогеназы снижался постепенно, становясь нормальным в течение следующего месяца.

Ко дню 28 после инфузии клеток CART-19 аденопатия больше не являлась пальпируемой, и в день 23 не наблюдали признаков CLL в костном мозге (фиг. 12C). Кариотип становился нормальным в 15 из 15 клеток (46,XY), и тестирование с помощью FISH показывало негативный результат по делекции TP53 в 198 из 200 исследуемых клеток; этот результат считают находящимся в нормальных пределах у отрицательных контролей. Анализ с помощью проточной цитометрии не показал остаточного CLL, и не определяли В-клетки (<1% клеток в дискриминационном окне CD5+CD10-CD19+CD23+ лимфоцитов). КТ, проведенная в день 31 после инфузии, показала разрешение аденопатии (фиг. 2D).

Через 3 и 6 месяцев после инфузии клеток CART-19 физикальное исследование проходило без особенностей, без определения пальпируемой аденопатии, и через 3 месяца после инфузии клеток CART-19 проводили КТ, показавшую длительную ремиссию (фиг. 12D). Исследования костного мозга после 3 и 6 месяцев также не показали наличия признаков CLL по данным морфологического анализа, кариотипического анализа (46,XY) или анализа с помощью проточной цитометрии, что сопровождалось длительным

отсутствием нормальных В-клеток. Ремиссия длилась в течение по меньшей мере 10 месяцев.

#### **Токсичные эффекты клеток CART-19**

Инфузии клеток не оказывали острых токсических эффектов. Единственным отмеченным значительным (степени 3 или 4) побочным эффектом являлся синдром распада опухоли степени 3, описываемый выше. У пациента наблюдали лимфопению степени 1 на начальном уровне и лимфопению степени 2 или 3, начиная со дня 1 и затем в течение по меньшей мере 10 месяцев после терапии. Лимфопению степени 4 с абсолютным количеством лимфоцитов 140 клеток на кубический миллиметр регистрировали в день 19, но со дня 22 в течение по меньшей мере 10 месяцев абсолютное количество лимфоцитов находилось в диапазоне от 390 до 780 клеток на кубический миллиметр (лимфопения степени 2 или 3). У пациента наблюдали транзиторную тромбоцитопению степени 1 (количество тромбоцитов от 98000 до 131000 на кубический миллиметр) со дня 19 по день 26 и нейтропению степени 1 или 2 (абсолютное количество нейтрофилов от 1090 до 1630 на кубический миллиметр) со дня 17 по день 33. Другие симптомы, возможно, относящиеся к исследуемому лечению, включали повышения уровней аминотрансферазы и щелочной фосфатазы степени 1 и 2, развивавшиеся в течение 17 дней после первой инфузии и разрешавшиеся в день 33. Системные симптомы степени 1 и 2 включали лихорадку, озноб, повышенное потоотделение, миалгии, головные боли и тошноту. Гипогаммаглобулинемию степени 2 корректировали внутривенными инфузиями иммуноглобулина.

#### **Анализ цитокинов в сыворотке и костном мозге**

Клинический ответ пациента сопровождался замедленным повышением уровней воспалительных цитокинов (фиг. 13A-13D), где уровни интерферона  $\gamma$ , интерферон  $\gamma$ -чувствительных хемокинов CXCL9 и CXCL10 и интерлейкина-6 являлись в 160 раз более высокими, чем начальные уровни. По времени повышение уровней цитокинов сопровождало клинические симптомы, достигая пика с 17 по 23 дни после первой инфузии клеток CART-19.

Измеряли уровни цитокинов в супернатантах серии аспираторов костного мозга и наблюдали признаки активации иммунной системы (фиг. 13E). Отмечали значимое повышение интерферона  $\gamma$ , CXCL9, интерлейкина-6 и растворимого рецептора интерлейкина-2 по сравнению с начальными уровнями за день до инфузии Т-клеток; значения достигали пика в день 23 после первой инфузии клеток CART-19. Повышение цитокинов в костном мозге совпадало с повышением уровня лейкозных клеток из костного мозга. Уровень фактора некроза опухоли в сыворотке и костном мозге оставался неизменным.

#### **Экспансия и поддержание Т-клеток с химерным антигенным рецептором**

С помощью ПЦР в реальном времени определяли ДНК, кодирующую химерный антигенный рецептор против CD19 (CAR19), начиная со дня 1 после первой инфузии (фиг. 14A). Отмечали экспансию клеток *in vivo* более чем на 3 порядка ко дню 21 после инфузии. На пиковых уровнях клетки CART-19 в крови составляли более 20% циркулирующих лимфоцитов; эти пиковые уровни совпадали с развитием системных симптомов, синдрома распада опухоли (фиг. 12B) и повышением уровней цитокинов в сыворотке (фигура 13A-13D). Клетки CART-19 оставались определяемыми при высоких уровнях через 6 месяцев после инфузии, хотя значения снижались на порядок относительно пиковых уровней. Время удвоения Т-клеток с химерным антигенным рецептором в крови составляло приблизительно 1,2 дня со временем полуыведения 31 день.

#### **Т-клетки с химерным антигенным рецептором в костном мозге**

Клетки CART-19 определяли в образцах костного мозга, начиная со дня 23 после первой инфузии (фиг. 14B), и они сохранялись в течение по меньшей мере 6 месяцев со временем полуыведения 34 дня. Наиболее высокие уровни клеток CART-19 в костном мозге определяли при первом обследовании через 23 дня после первой инфузии, что совпадало с индукцией иммунного ответа, на что указывают профили секреции цитокинов (фиг. 13E). Анализ аспираторов костного мозга с помощью проточной цитометрии свидетельствует о клональной экспансии CD5+CD19+ клеток на начальном уровне, отсутствующих через 1 месяц после инфузии и в образце, полученном через 3 месяца после инфузии (данные не представлены). После лечения не определяли наличия нормальных В-клеток (фиг. 14C).

#### **Лечение аутологичными генетически модифицированными клетками CART-19**

В настоящем описании представлено замедленное развитие синдрома распада опухоли и полный ответ через 3 недели после лечения аутологичными Т-клетками, генетически модифицированными для воздействия на CD19 посредством трансдукции лентивирусным вектором, экспрессирующим scFv против CD19, соединенное с сигнальными доменами CD3-дзета и CD137 (4-1BB). Генетически модифицированные клетки присутствовали в костном мозге при высоких уровнях в течение по меньшей мере 6 месяцев после инфузии. Возникновение CD19-специфичного иммунного ответа в костном мозге демонстрировали посредством временной динамики высвобождения цитокинов и уничтожения лейкозных клеток, совпадающего с пиковой инфильтрацией Т-клетками с химерным антигенным рецептором. Ранее не сообщали о развитии синдрома распада опухоли после клеточной иммунотерапии (Baeksgaard et al., 2003, Cancer Chemother Pharmacol, 51: 187-92).

Генетические манипуляции с аутологичными Т-клетками для воздействия на специфические опухолевые антигены является привлекательной стратегией для терапии злокачественных новообразований

(Sadelain et al., 2009, *Curr Opin Immunol*, 21: 215-23; Jena et al., 2010, *Blood*, 116: 1035-44). Важной характеристикой подхода, представленного в настоящем описании, является то, что Т-клетки с химерным антигенным рецептором могут распознавать опухолевые мишени без рестрикции по HLA таким образом, что можно конструировать "готовые" химерные антигенные рецепторы для опухолей с широким спектром гистологических характеристик. Для терапии злокачественных новообразований использовали лентивирусные векторы на основе ВИЧ, подход, который может обладать некоторыми преимуществами по сравнению с использованием ретровирусных векторов (June et al., 2009, *Nat Rev Immunol*, 9: 704-16).

В предыдущих исследованиях Т-клеток с химерными антигennыми рецепторами объективные ответы опухоли являлись умеренными, и пролиферация модифицированных клеток *in vivo* не являлась длительной (Kershaw et al., 2006, *Clin Cancer Res*, 12: 6106-15; Till et al., 2008, *Blood*, 112: 2261-71; Pule et al., 2008, *Nat Med*, 14: 1264-70). Brentjens с соавт. опубликовали предварительные результаты клинического испытания химерных антигенных рецепторов против CD19, соединенных с сигнальным доменом CD28, и обнаруживали транзиторные ответы опухоли у двух из трех пациентов с CLL на поздней стадии (Brentjens et al., 2010, *Mol Ther*, 18: 666-8); однако химерные антигенные рецепторы быстро исчезали из циркуляции.

Неожиданным являлось то, что очень низкая доза инфузированных Т-клеток с химерными антигennыми рецепторами может приводить к клинически выраженному противоопухолевому ответу. Фактически, доза инфузированных Т-клеток с химерными антигennыми рецепторами  $1,5 \times 10^5$  на килограмм являлась на несколько порядков более низкой, чем дозы, используемые в предыдущих исследованиях Т-клеток, модифицированных для экспрессии химерных антигенных рецепторов или трансгенных Т-клеточных рецепторов (Kershaw et al., 2006, *Clin Cancer Res*, 12: 6106-15; Brentjens et al., 2010, *Mol Ther*, 18: 666-8; Morgan et al., 2010, *Mol Ther*, 18: 843-51; Johnson et al., 2009, *Blood*, 114: 535-46). Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, предполагают, что химиотерапия может усиливать эффекты химерного антигенного рецептора.

Длительное поддержание клеток CART-19 в крови и костном мозге пациента является результатом включения сигнального домена 4-1BB. Вероятно, опосредованная клетками CART-19 элиминация нормальных В-клеток облегчала индукцию иммунологической толерантности к химерному антигенному рецептору, т.к. клетки CART-19, экспрессирующие одноцепочный фрагмент антитела Fv, содержащий последовательности мыши, не отторгались. Учитывая отсутствие определяемых CD19-позитивных лейкозных клеток у этого пациента, и без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, можно предполагать, что гомеостаза Т-клеток с химерными антигennыми рецепторами достигали, по меньшей мере, частично в результате стимуляции, осуществляющей ранними предшественниками В-клеток, т.к. они начинают появляться в костном мозге. Изобретение относится к обнаружению того, что может существовать новый механизм поддержания Т-клеток "памяти" с химерными антигennыми рецепторами.

Хотя CD19 является привлекательной опухолевой мишенью с экспрессией, ограниченной нормальными и злокачественными В-клетками, существуют сомнения, что поддержание Т-клеток с химерными антигennыми рецепторами может опосредовать длительный дефицит В-клеток. Фактически, у пациента В-клетки отсутствуют в крови и костном мозге в течение по меньшей мере 6 месяцев после инфузии. У этого пациента не наблюдали рецидивирующих инфекций. Воздействие на В-клетки через CD20 с использованием ритуксимаба является эффективной и относительно безопасной стратегией для пациентов с В-клеточными неоплазиями, и длительная В-клеточная лимфопения поддается лечению (Molina, 2008, *Ann Rev Med*, 59: 237-50). Сообщали о том, что у пациентов, подвергаемых лечению ритуксимабом, В-клетки возвращаются в течение 6 месяцев после прекращения терапии. До сих пор не известно, происходит ли такое восстановление у пациентов, у которых *in vivo* сохраняются Т-клетки против В-клеток.

Пациенты, страдающие CLL с делециями TP53, имели короткие ремиссии после стандартных способов терапии (Dohner et al., 1995, *Blood*, 85: 1580-9). Аллотрансплантация костного мозга является единственным подходом, вызывающим длительные ремиссии у пациентов с CLL на поздней стадии (Gribben et al., 2011, *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: Suppl:S63-S70). Однако полученный выраженный эффект "трансплантат против опухоли" ассоциирован со значительной смертностью по причине высокой частоты хронической реакции "трансплантат против хозяина", являющейся особенно тяжелой у пожилых пациентов - тех, кто, как правило, страдает CLL (Gribben et al., 2011, *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: Suppl:S63-S70; Sorror et.al., 2008, *Blood*, 111: 446-52). Данные, представленные в настоящем описании, позволяют предполагать, что генетически модифицированные аутологичные Т-клетки могут преодолевать это ограничение.

Замедленное начало синдрома распада опухоли и секреции цитокинов в комбинации с интенсивной экспансией Т-клеток с химерными антигennыми рецепторами *in vivo* и значительной противолейкозной активностью указывают на значительные и длительные эффекторные функции клеток CART-19. Эксперименты, представленные в настоящем описании, указывают на активность этой терапии и являются основой для подробных исследований аутологичных Т-клеток, генетически модифицированных для воздействия на CD19 (и другие мишени) посредством трансдукции химерного антигенного рецептора, соединенного с активными сигнальными доменами. В отличие от антитело-опосредованной терапии модифицированные Т-клетки с химерными антигennыми рецепторами обладают потенциалом воспроизведе-

ния *in vivo*, и их длительное поддержание может приводить к длительному контролю опухоли. Двум другим пациентам с CLL на поздней стадии также проводили инфузии CART-19 по этому протоколу, и у всех трех развивались ответы опухоли. Эти результаты требуют продолжения исследований CD19-перенаправляющих Т-клеток в отношении В-клеточных неоплазий.

Таким образом, описания каждого патента, патентной заявки и публикации, процитированные в настоящем описании, включают в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Хотя это изобретение описывают со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие специалисты в этой области могут разрабатывать другие варианты осуществления и варианты этого изобретения без отклонения от сущности и объема изобретения. Формула изобретения предназначена для включения всех таких вариантов осуществления и эквивалентных вариантов.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевая фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество популяции человеческих Т-клеток, где клетки указанной популяции включают клетки, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), где указанный CAR содержит домен, связывающий антиген CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ ; костимуляторную сигнальную область 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета, где указанные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека, имеющего злокачественное новообразование.
2. Композиция по п.1, где трансмембранный домен CD8 $\alpha$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.
3. Композиция по п.1, где CAR дополнительно содержит шарнирный домен CD8 $\alpha$  и где указанный шарнирный домен CD8 $\alpha$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.
4. Композиция по п.1, где костимуляторная сигнальная область 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.
5. Композиция по п.1, где домен, связывающий антиген CD19, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 14.
6. Композиция по п.4, где трансмембранный домен CD8 $\alpha$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 16.
7. Композиция по п.3, где шарнирный домен CD8 $\alpha$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 15.
8. Композиция по п.4, где костимуляторная сигнальная область 4-1BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 17.
9. Композиция по п.2, где костимуляторная сигнальная область 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.
10. Композиция по п.9, где костимуляторная сигнальная область 4-1BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 17.
11. Композиция по п.3, где костимуляторная сигнальная область 4-1BB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.
12. Композиция по п.11, где костимуляторная сигнальная область 4-1BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 17.
13. Композиция по п.5, где CAR дополнительно содержит шарнирный домен CD8 $\alpha$  и где указанный шарнирный домен CD8 $\alpha$  содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.
14. Композиция по п.13, где шарнирный домен CD8 $\alpha$  кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 15.
15. Противоопухолевая фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество популяции человеческих Т-клеток, где клетки указанной популяции включают клетки, которые содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный антигенный рецептор (CAR), где указанный CAR содержит домен, связывающий антиген CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; шарнирный домен CD8 $\alpha$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; костимуляторную сигнальную область 4-1BB, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и сигнальный домен CD3-дзета, где указанные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека, страдающего раком.
16. Композиция по п.15, где домен CAR, связывающий антиген CD19, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 14, шарнирный домен CD8 $\alpha$  CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 15, трансмембранный домен CD8 $\alpha$  CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 16, и костимуляторная сигнальная область 4-1BB CAR кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей SEQ ID NO: 17.
17. Композиция по п.1 или 15, где указанное эффективное количество Т-клеток составляет от  $10^4$  до

$10^9$  клеток/кг массы тела человека, нуждающегося в таких клетках.

18. Композиция по п.1 или 15, где указанное эффективное количество Т-клеток составляет от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела человека, нуждающегося в таких клетках.

19. Композиция по п.1 или 15, где указанные Т-клетки представляют собой Т-клетки человека, имеющего гематологическое злокачественное новообразование.

20. Композиция по п.19, где указанное гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз или лимфому.

21. Композиция по п.20, где указанный лейкоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

22. Композиция по п.20, где указанная лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток зоны мантии, неходжкинскую лимфому или ходжкинскую лимфому.

23. Композиция по п.19, где указанное гематологическое злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.

24. Способ лечения гематологического злокачественного новообразования у пациента-человека, где указанный способ включает введение указанному пациенту-человеку противоопухолевой фармацевтической композиции по любому из пп.1-16.

25. Способ по п.24, где указанная противоопухолевая фармацевтическая композиция содержит эффективное количество популяции человеческих Т-клеток, составляющее от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела указанного пациента-человека.

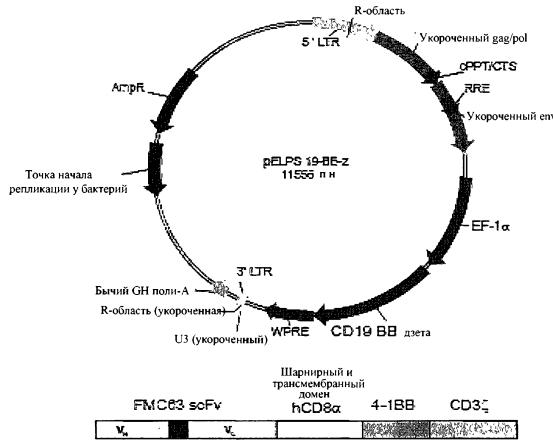
26. Способ по п.24, где указанная противоопухолевая фармацевтическая композиция содержит эффективное количество популяции человеческих Т-клеток, составляющее от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела указанного пациента-человека.

27. Способ по п.24, где указанное гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз или лимфому.

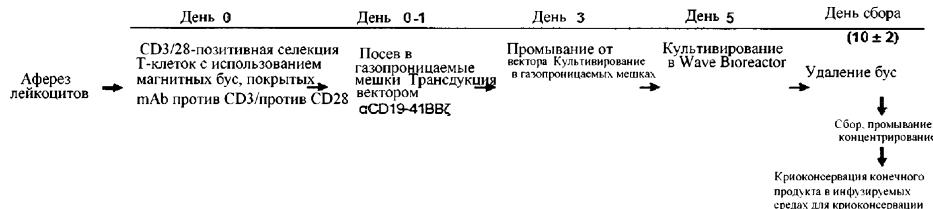
28. Способ по п.27, где указанный лейкоз представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

29. Способ по п.27, где указанная лимфома представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток зоны мантии, неходжкинскую лимфому или ходжкинскую лимфому.

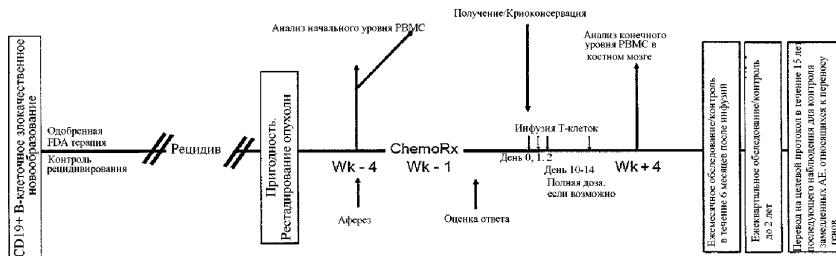
30. Способ по п.24, где указанное гематологическое злокачественное новообразование представляет собой множественную миелому.



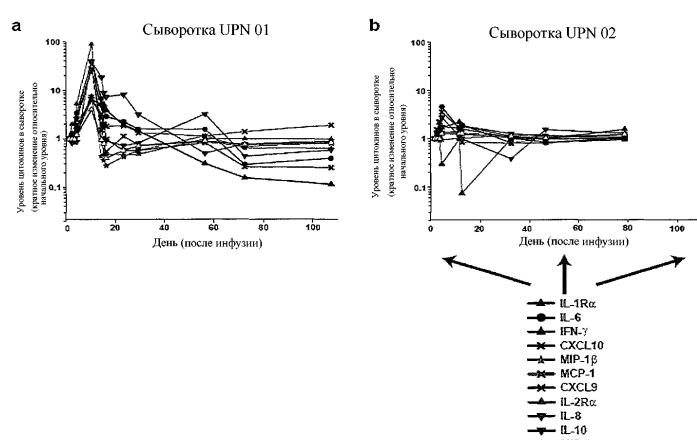
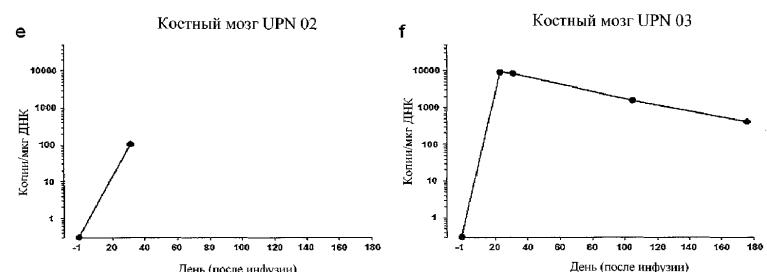
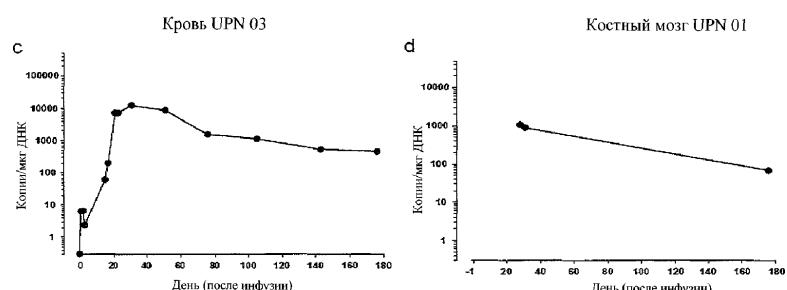
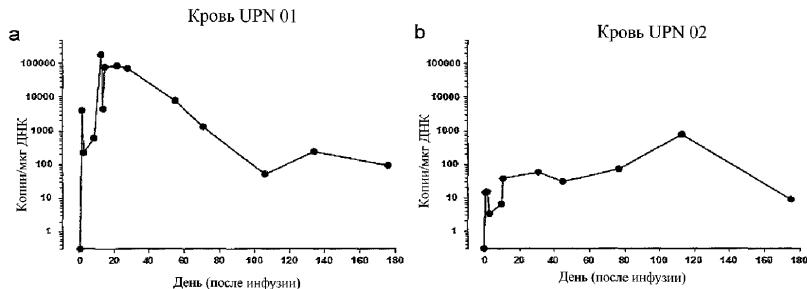
Фиг. 1А

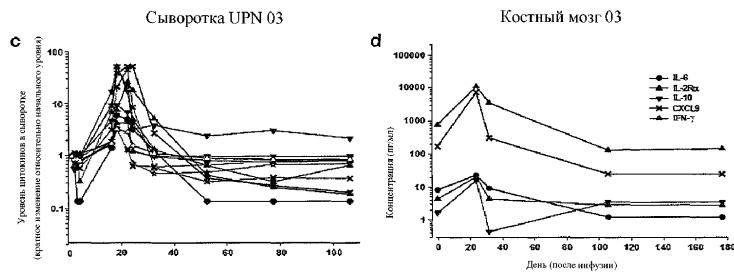


Фиг. 1В

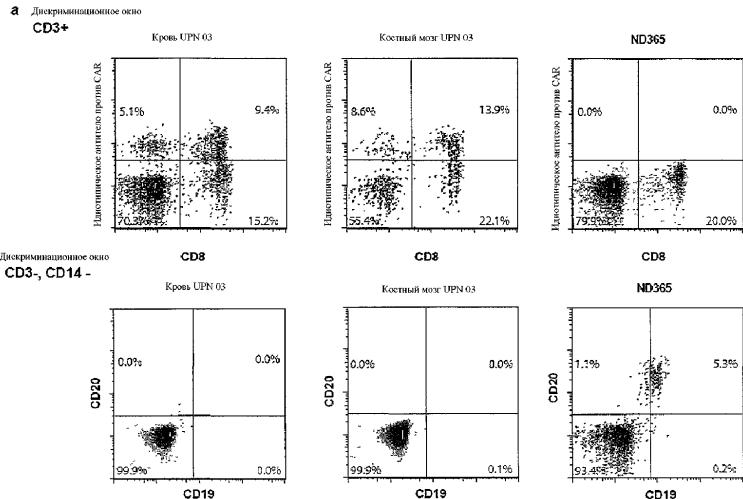


Фиг. 1C

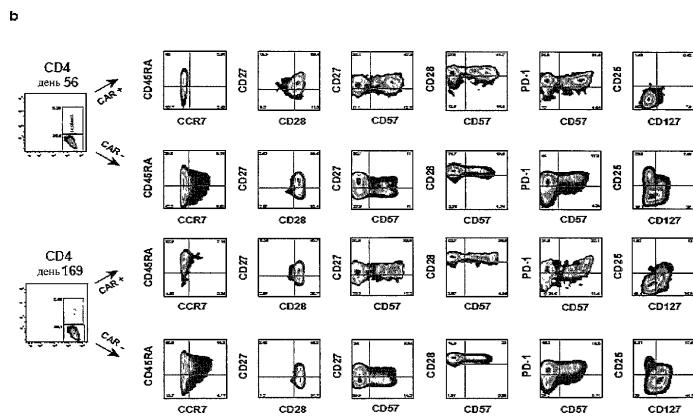




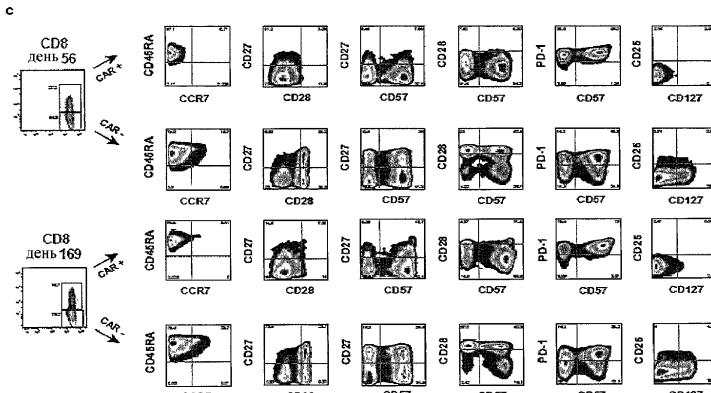
Фиг. 3С-3Д



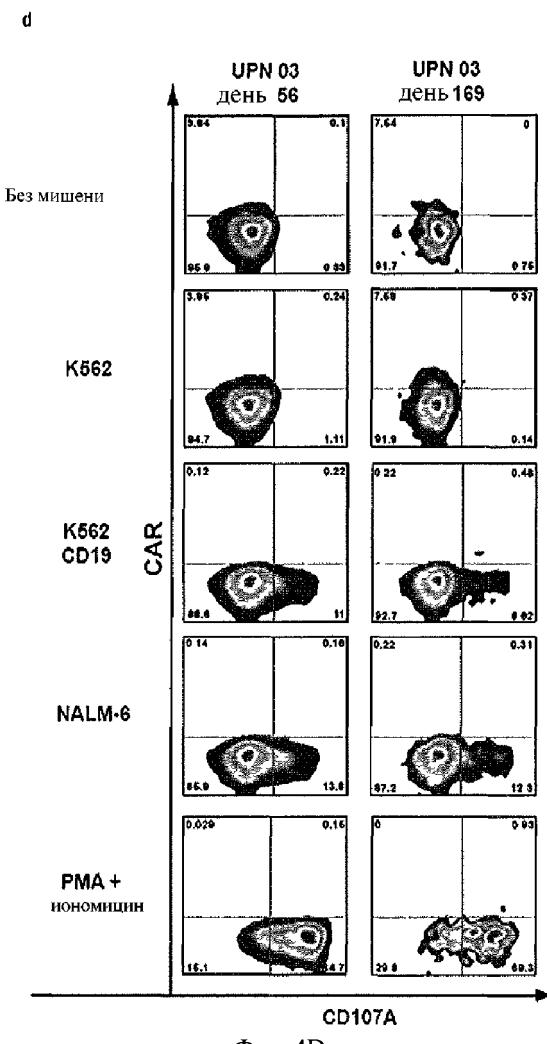
Фиг. 4А



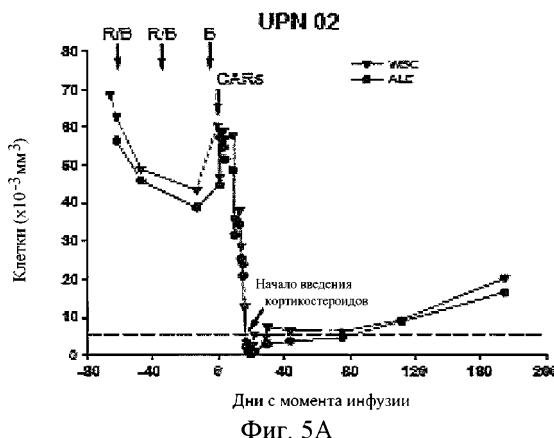
Фиг. 4В



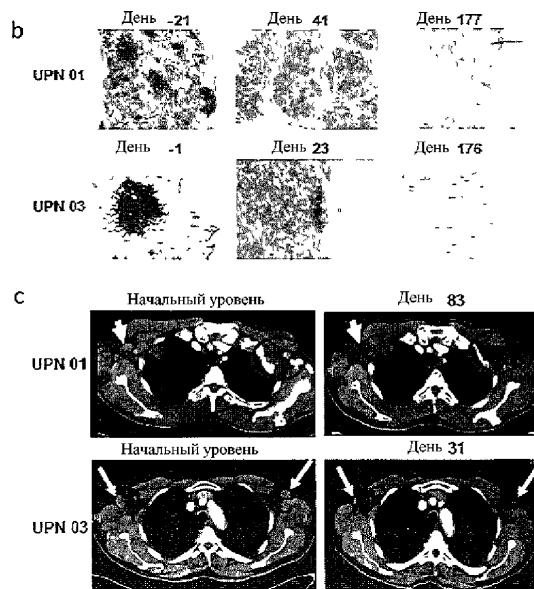
Фиг. 4С



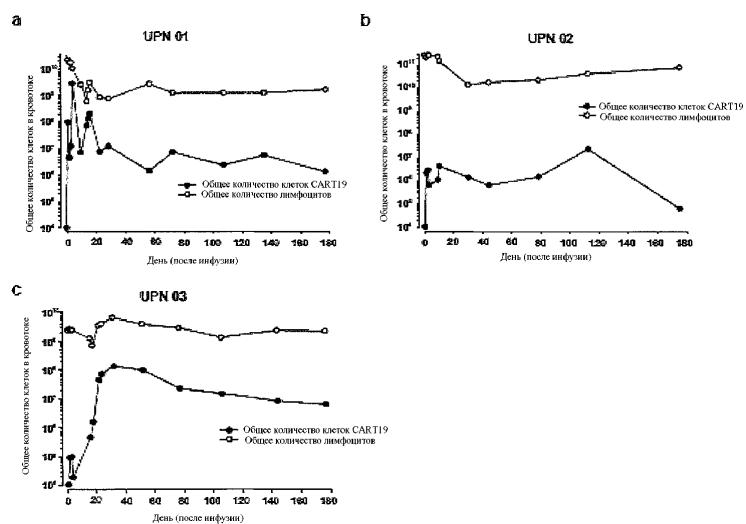
Фиг. 4D



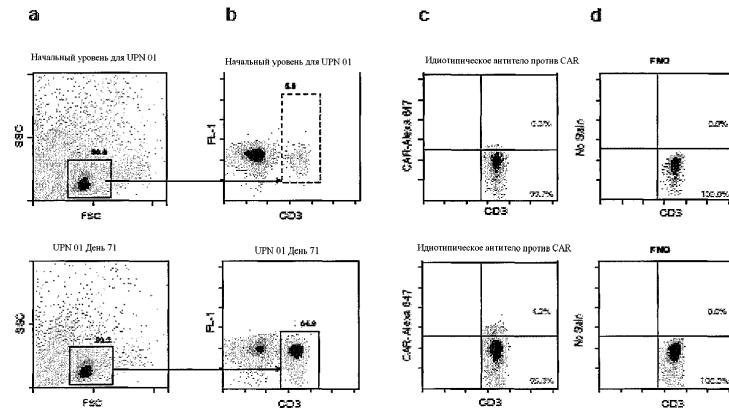
Фиг. 5A



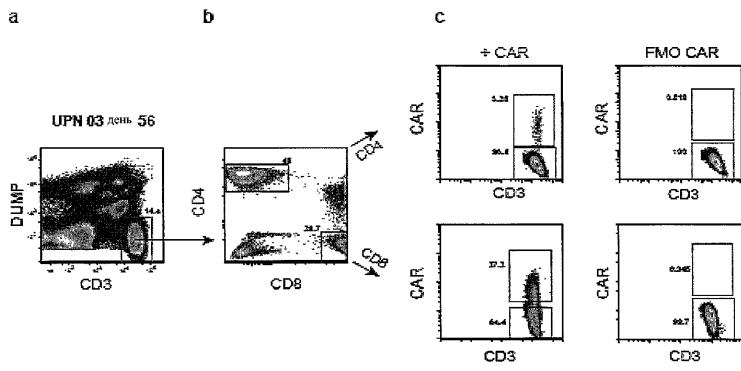
Фиг. 5В-5С



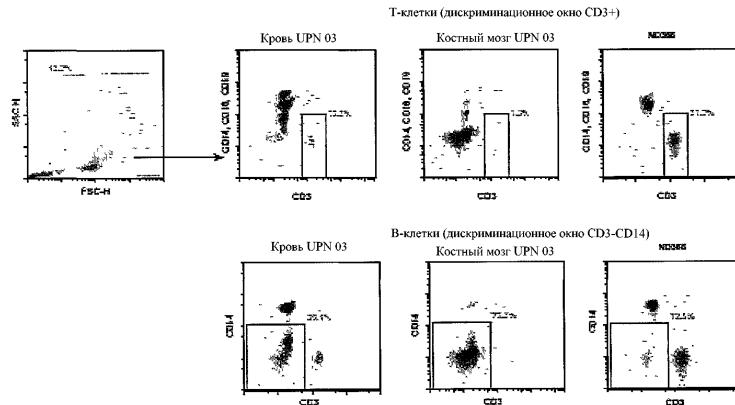
Фиг. 6



Фиг. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

UPN индивидуума	Возраст/пол/ кардиотип	Предыдущая терапия	Начальный уровень общей опухолевой массы CLL	Общая доза CART19 (клетки/кг)	Ответ в день +30 (Длительность)		
01	65/М Нормальный	Флударабин x 4 цикла (2002) Ритуксимаб/флударабин x 4 цикла (2005) Алентузумаб x 12 нед (2006) Ритуксимаб (2 курса 2008-2009) R-CVP x 2 цикла (2009)/Лимфаденома (2009) PCR x 2 цикла (5/18-6/18/2010) Бендамустин x 1 цикл (7/3-8/1/10) перед инф.CART19	Костный мозг (день исследования) Гиперплазический 70% CLL 2,4x10 <sup>9</sup> клеток CLL (день -14) 1,7x10 <sup>9</sup> клеток CLL (день -1)	Кровь (день исследования) Нет данных 6,2x10 <sup>9</sup> -1,6x10 <sup>9</sup> клеток CLL (день -37)	1,1x10 <sup>9</sup> (1,6x10 <sup>7</sup> /кг)	CR (8+ мес)	
02	77/М del(17)(p13) <sup>3</sup>	Алентузумаб x 15 нед (6/2007) Алентузумаб x 18 нед (3/2009) Бендамустин/Ритуксимаб: 7/1/2010 (цикла 1) 7/28/2010 (цикла 2) 8/26/2010 (цикла 3) перед инф.CART19	Гиперплазический >95% CLL 3,2x10 <sup>9</sup> клеток CLL (день -47)	2,75x10 <sup>11</sup> Клеток CLL (день -1)	1,2x10 <sup>9</sup> -2,0x10 <sup>9</sup> Клеток CLL (день -24)	5,8x10 <sup>7</sup> (1,0x10 <sup>7</sup> /кг)	PR (5 мес)
03	64/М del(17)(p13) <sup>3</sup>	R-Флударабин x 2 цикла (2002) R-Флударабин x 4 цикла (10/06-1/07) R-Бендамустин x 1 цикл (2/09) Бендамустин x 3 цикла (3-5/09) Алентузумаб x 11 нед Пейнотин/имунофлазмид (9/10/10) перед инф.CART19	Гиперплазический 40% CLL 8,8x10 <sup>9</sup> клеток CLL (день -1)	Нет данных	3,3x10 <sup>10</sup> -5,5x10 <sup>10</sup> Клеток CLL (день -10)	1,4x10 <sup>7</sup> (1,46x10 <sup>6</sup> /кг)	CR (7+ мес)

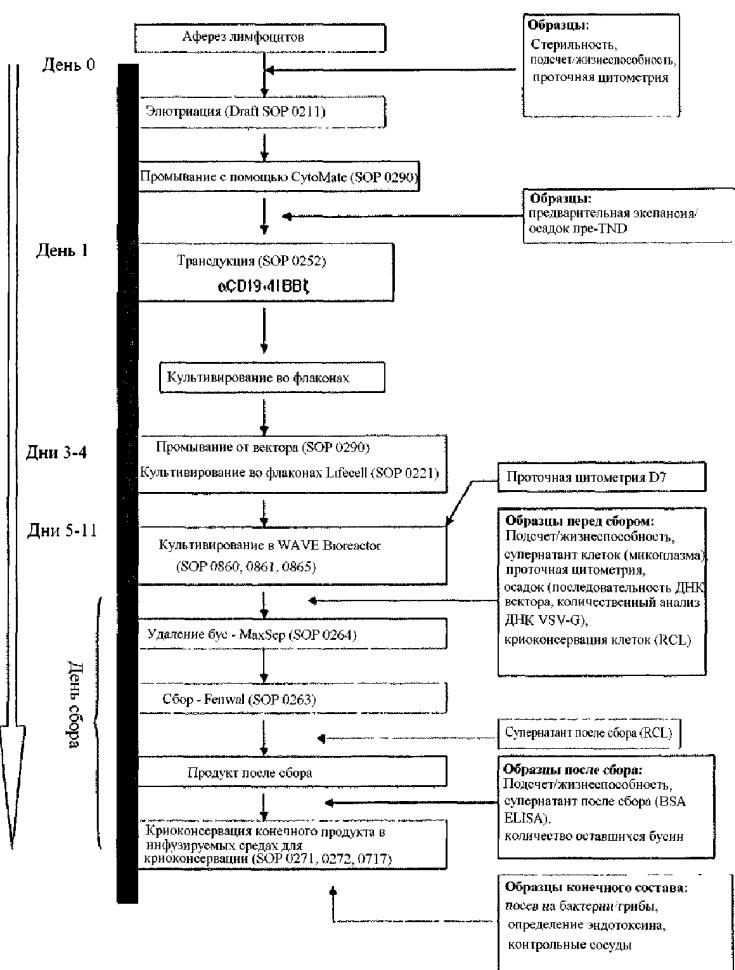
1. UPN 02 кардиотип (Номенклатура ISCN): 45,XY del(1)(q25).-del(1)(p12)(2;20)(p13;q11.2)(t(3;5)(p13;q35);add(9p22);del(13)(q14q34))-14,del(17)(p13)(cp24)

2. UPN 03 кардиотип (Номенклатура ISCN): 46,XY del(17)(p12)[18]44-46,idem,del(17)(17)(p11.2;q11.2)(cp14)40-45,XY -17(cp3)

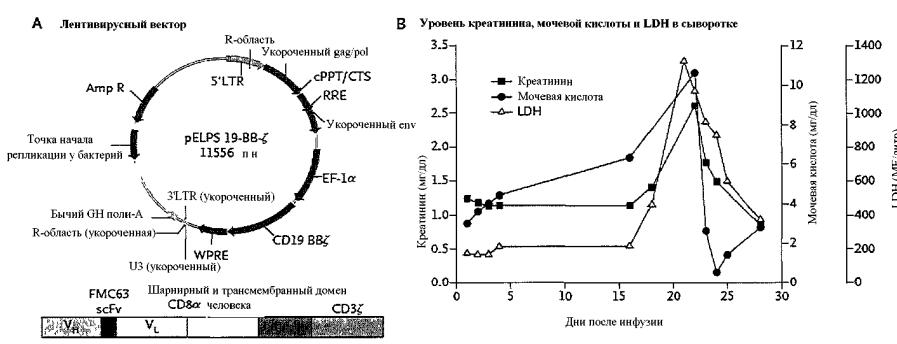
3. См. способы определения общей опухолевой массы в дополнительных материалах

ФИГ. 10

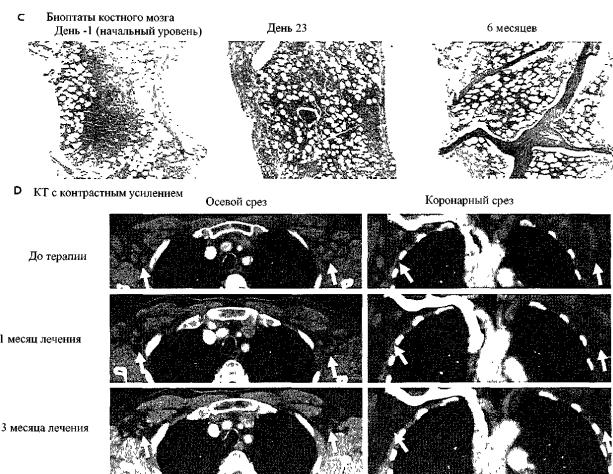
## Способ получения CART19



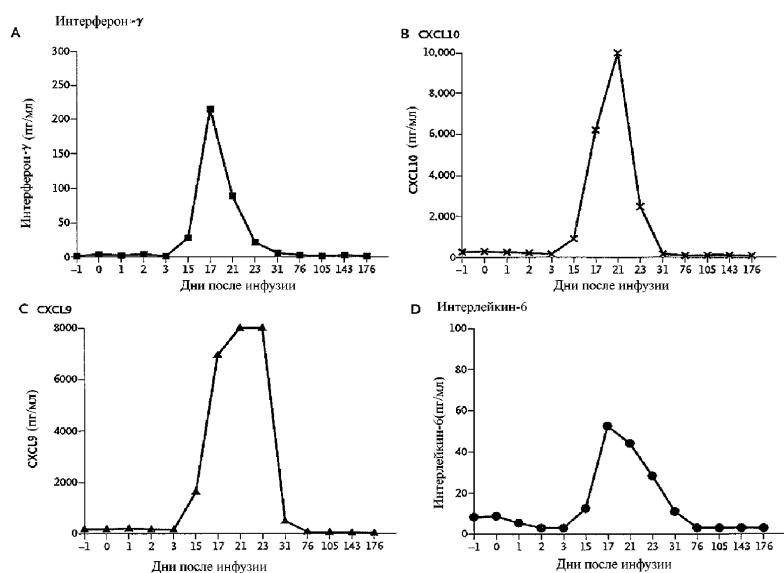
Фиг. 11



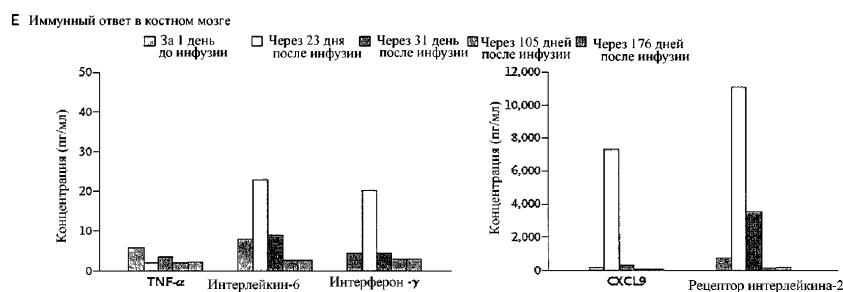
Фиг. 12А-12В



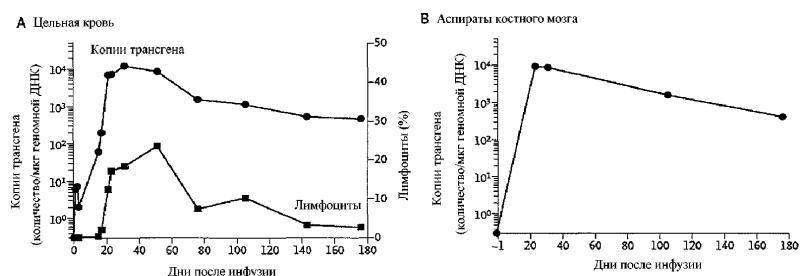
Фиг. 12C-12D



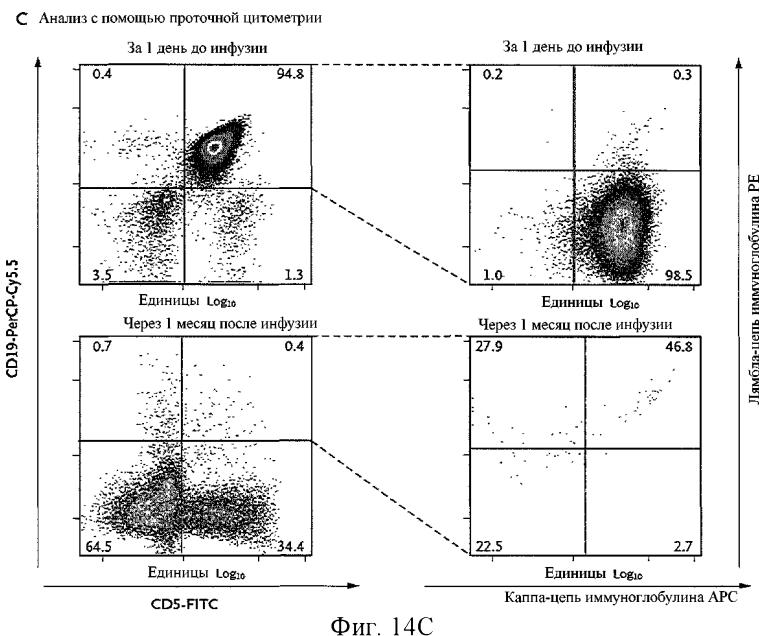
Фиг. 13A-13D



Фиг. 13E



Фиг. 14A-14B



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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