

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290028** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.05.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.06.11

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ
ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ И ИНГИБИТОРОМ БЕЛКА СЕМЕЙСТВА BCL2,
СПОСОБСТВУЮЩЕГО ВЫЖИВАНИЮ**

(31) **62/860,748; 62/890,594**

(32) **2019.06.12; 2019.08.22**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/037333**

(87) **WO 2020/252218 2020.12.17**

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

(72) Изобретатель:

**Портс Майкл, Томас Эван Пол, Амин
Рупеш, Дубовски Джейсон, Дубови
Рональд, Брахмандам Арчана (US)**

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

(57) Представлены способы, применения и готовые изделия для комбинированной терапии, включающей иммунотерапию и клеточную терапию, такую как адоптивная клеточная терапия, например Т-клеточная терапия, и использование ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например ингибитора BCL2, для лечения субъектов, страдающих или подозреваемых в заболевании раком, и ассоциированные с ними способы, применения и готовые изделия. Т-клеточная терапия включает клетки, которые экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR).

A1

202290028

202290028

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572151EA/032

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИЕЙ И ИНГИБИТОРОМ БЕЛКА СЕМЕЙСТВА BCL2, СПОСОБСТВУЮЩЕГО ВЫЖИВАНИЮ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительных заявок США: 62/860,748, поданной 12 июня 2019 г., озаглавленной «COMBINATION THERAPY OF A CELL-MEDIATED CYTOTOXIC THERAPY AND AN INHIBITOR OF A PROSURNIVAL BCL2 FAMILY PROTEIN» и 62/890,594, поданной 22 августа 2019 г., озаглавленной «COMBINATION THERAPY OF A CELL-MEDIATED CYTOTOXIC THERAPY AND AN INHIBITOR OF A PROSURNIVAL BCL2 FAMILY PROTEIN», содержание которых полностью включено посредством ссылки для всех целей.

Включение списка последовательностей посредством ссылки

Настоящая заявка подается вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей представлен в виде файла под названием 735042021340SeqList.TXT, созданного 8 июня 2020 г. и имеющего размер 35272 байта. Информация в электронном формате списка последовательностей полностью включена посредством ссылки.

Область техники

Настоящее описание в некоторых аспектах относится к способам и применению комбинированной терапии, включающей терапию, такую как иммунотерапия или клеточная терапия, *например*, Т-клеточная терапия, и использование ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, *например*, ингибитора BCL2, для лечения субъектов с раком, таким как лейкозы и лимфомы, и родственные способы, применения и готовые изделия. Т-клеточная терапия включает клетки, которые экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR).

Уровень техники

Доступны различные стратегии для иммунотерапии и клеточной терапии для лечения рака, например, адоптивная клеточная терапия, включая те, которые включают введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, специфичные для представляющего интерес заболевания или расстройства, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие адоптивные иммунные клеточные и адоптивные Т-клеточные терапии. Подгруппы раков резистентны или развивают резистентность к таким способам лечения. Поэтому необходимы улучшенные методы, например, для преодоления этой резистентности и повышения эффективности таких способов. Предлагаются способы и применения, которые отвечают таким потребностям.

Сущность изобретения

В настоящем документе представлены способы и применения, включающие

комбинированную терапию для лечения субъектов, страдающих или подозреваемых в наличии рака, такого как хронический лимфолейкоз (CLL), неходжкинская лимфома (NHL) или их подтип. В некоторых вариантах осуществления, раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL). Способы и другие варианты осуществления обычно относятся к комбинациям, включающим введение субъекту терапии, которой является иммунотерапия или клеточная терапия, и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2. В некоторых аспектах представленные способы и применения включают введение Т-клеточной терапии, такой как CAR-экспрессирующие Т-клетки, содержащие антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, экспрессируемым на В-клетках.

В настоящем документе предложен способ лечения рака, включающий введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным с, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, достаточной для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора в период времени между точно или примерно 1 днем до и точно или примерно 14 днями после начала введения цитотоксической терапии и/или до того, как пиковые уровни цитотоксической терапии будут определены в крови субъекта после введения цитотоксической терапии.

В настоящем документе предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, страдающему раком, ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, достаточной для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора в период времени между точно или примерно 1 днем до или точно или примерно 14 днями после начала введения цитотоксической терапии и/или во время до того, как пиковые уровни цитотоксической терапии будут обнаруживаться в крови субъекта после введения цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках.

В настоящем документе предложен способ лечения рака, включающий введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным с, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период точно или примерно 7 дней до и точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В настоящем документе предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, страдающему раком, ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, где ингибитор вводят по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 7 дней до и точно или примерно 14

дней после начала введения цитотоксической терапии, при этом цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака.

В настоящем документе предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках, где субъекту вводят или он нуждается во введении ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в течение периода времени по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 7 дней до и точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 7 дней до и точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 3 дня до и точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период времени между точно или примерно 1 днем до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых из вариантов осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора после проведения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии. Также в настоящем документе представлена композиция, включающая цитотоксическую терапию для использования при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным с, экспрессируемым, или присутствующим на клетках рака; и композиция предназначена для использования в комбинации с ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии. В настоящем документе предложена композиция, включающая ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, для использования в производстве лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего раком, где композиция предназначена для использования в сочетании с цитотоксической терапией, которой является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках; и композиция предназначена для применения по схеме дозирования,

включающей начало введения композиции в период времени точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является клеточная терапия, экспрессирующая рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор предназначен для использования по схеме дозирования, включающей начало введения композиции в период времени точно или примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор предназначен для использования по схеме дозирования, включающей начало введения композиции точно или примерно через 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс.

Также в настоящем документе представлен набор, включающий (i) ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, и/или цитотоксическую терапию, которой является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и (ii) инструкции по применению набора для лечения субъекта, страдающего раком, где в инструкциях указано: ингибитор предназначен для использования в сочетании с цитотоксической терапией; и ингибитор следует вводить в период времени точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является клеточная терапия, включающая Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, инструкции указывают, что ингибитор следует вводить в период времени точно или примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, инструкции указывают, что ингибитор следует вводить примерно через 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в течение 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в течение 3 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора во время или после того, как клеточная смерть, индуцированная активацией (AICD) клеток клеточной терапии достигла пика после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в момент времени, когда клеточная смерть, индуцированная активацией (AICD) клеток клеточной терапии достигает пика после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора после того, как клеточная смерть, индуцированная активацией (AICD) клеток клеточной

терапии достигает пика после начала введения клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одну дозу ингибитора по схеме дозирования вводят одновременно с цитотоксической терапией и/или в тот же день, что и цитотоксическую терапию. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора достаточна для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора в период времени между точно или примерно 1 днем и точно или примерно 14 днями после начала введения цитотоксической терапии и/или в период времени до того, как пиковые уровни цитотоксической терапии будут определены в крови субъекта после проведения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или не вводили ритуксимаб и/или ибрутиниб в течение 7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия способна вызывать или приводит к клеточно-опосредованной цитотоксичности одной или нескольких клеток рака. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия способна или опосредует опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз одной или нескольких клеток рака.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является иммунотерапия. В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапией является рекрутинговая Т-клеточная терапия, способная стимулировать активность Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE).

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает клетки, которые являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), эндогенной Т-клеточной терапии, терапии натуральными киллерами (NK), трансгенной TCR терапии и экспрессирующей рекомбинантный рецептор клеточной терапии, которой необязательно является экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR) клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является экспрессирующая рекомбинантный рецептор клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR) клеточная терапия.

В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, введение клеточной терапии включает введение от точно или от примерно 1×10^5 до 5×10^8 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); от точно или от примерно 1×10^5

до 2×10^8 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС); от точно или от примерно 1×10^6 до 1×10^8 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС); или от 1×10^6 до 5×10^7 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС).

В некоторых вариантах осуществления, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, от точно или примерно 5×10^5 до точно или примерно 1×10^7 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, или от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^7 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 5×10^5 до точно или примерно 1×10^7 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^7 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает или обогащена Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетками являются CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетками являются CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетками являются CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетками являются CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы клеток включает введение CD4+ и CD8+ Т-клеток, каждах из CD4+ и CD8+ Т-клеток, индивидуально, включая рецептор, необязательно CAR, который специфически связывается с антигеном, где введение включает введение множество отдельных композиций, множество отдельных композиций, включающих первую композицию, включающую или обогащенную CD8+ Т-клетками, и вторую композицию, включающую или обогащенную CD4+ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, доза CD4+ и CD8+ Т-клеток включает определенное отношение клеток CD4+, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, к

клеткам CD8+, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или клеток CD4+ к клеткам CD8+, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1; и/или CD4+ Т-клетки, включая рецептор в одной из первой и второй композиций, и CD8+ Т-клетки, включая рецептор в другой из первой и второй композиций, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1; и/или CD4+ Т-клетки, включая рецептор, и CD8+ Т-клетки, включая рецептор, вводимые в первой и второй композициях, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или находится между приблизительно 1:3 и приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение составляет или составляет приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает естественные киллеры (NK) или обогащена ими. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает клетки, полученные из iPS.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение от точно или примерно 1×10^5 до 5×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих CAR Т-клеток, 5×10^6 до 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, от 5×10^7 до 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^5$ экспрессирующих CAR клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^6$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^7 клеток, экспрессирующих CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^7$ клеток, экспрессирующих CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^7 клеток, экспрессирующих CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^8 клеток, экспрессирующих CAR, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^8$ клеток, экспрессирующих CAR, или по меньшей мере, или по меньшей мере примерно 5×10^8 клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение точно или примерно 5×10^7 Т-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия

включает введение точно или примерно 1×10^8 клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, CAR включает внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, включающий ITAM. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является опухолевый антиген или он экспрессируется на раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления, антиген выбран из $\alpha\nu\beta 6$ интегрина ($\alpha\nu\beta 6$ интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1В (STAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, С-С мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека А1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека А2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства А (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-А1, MAGE-А3, MAGE-А6, MAGE-А10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1

(WT-1). В некоторых вариантах осуществления, антиген связан со злокачественным образованием В-клеток, при этом антиген необязательно экспрессируется на В-клетках человека. В некоторых вариантах осуществления, В-клеточным антигеном является CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD19.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующий домен является или содержит сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующий домен является или содержит сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи и костимулирующий сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает аутологичные клетки от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ включает сбор биологического образца от субъекта, включая аутологичные клетки, до начала введения ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, биологическим образцом от субъекта является или содержит образец цельной крови, образец лейкоцитов, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец нефракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкафереза. В некоторых вариантах осуществления, биологическим образцом от субъекта является или содержит образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления, биологическим образцом от субъекта является или содержит продукт афереза. В некоторых вариантах осуществления, биологическим образцом от субъекта является или содержит продукт лейкафереза.

В некоторых вариантах осуществления, во время начала введения цитотоксической терапии субъект демонстрирует (i) поддающееся измерению заболевание, необязательно лимфатические узлы более 1,5 сантиметра в наибольшем поперечном диаметре (GTD), или поддающееся оценке или измерению заболевание в периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенке. В некоторых вариантах осуществления, во время начала введения цитотоксической терапии субъект демонстрирует (i) поддающееся измерению заболевание, необязательно лимфатические узлы более 1,5 сантиметра в наибольшем поперечном диаметре (GTD) или поддающееся оценке или измерению

заболевание в периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенке. В некоторых вариантах осуществления, во время начала введения цитотоксической терапии субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови, превышающее или равное 10^{-4} . В некоторых вариантах осуществления, во время начала введения связывающей терапии субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови, превышающее или равное 10^{-4} .

В некоторых вариантах осуществления во время начала введения цитотоксической терапии субъект демонстрирует (i) поддающееся измерению заболевание, необязательно лимфатические узлы более 1,5 сантиметра в наибольшем поперечном диаметре (GTD), или поддающееся оценке или измерению заболевание в периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенке; и (ii) минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови больше или равное 10^{-4} . В некоторых вариантах осуществления, в момент начала введения перекрывающей терапии субъект демонстрирует (i) измеримое заболевание, необязательно лимфатические узлы более 1,5 сантиметра в наибольшем поперечном диаметре (GTD) или поддающееся оценке или измерению заболевание в периферической крови (PB), костном мозге (BM), печени или селезенке; и (ii) минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови больше или равное 10^{-4} .

В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия завершается за 2-7 дней до начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина и циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в количестве примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$, необязательно, точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в количестве примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней, или противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в количестве примерно 500 мг/м^2 . В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в количестве точно или примерно 300 мг/м^2 и флударабина в количестве примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней; и/или противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в количестве точно или примерно 500 мг/м^2 и флударабина в количестве примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в количестве примерно 300 мг/м^2 и флударабина в количестве примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в количестве примерно 500 мг/м^2 и флударабина в количестве примерно 30 мг/м^2 ежедневно

в течение 3 дней.

В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно за 3 дня до начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно за 2 дня до начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно за 1 день до начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит одновременно с началом введения ингибитора или в тот же день. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит не более чем через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии, необязательно, где начало введения ингибитора происходит в пределах 1 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в течение примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит между примерно 1 днем и примерно 7 днями после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 3 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 4 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 5 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 6 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит примерно через 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает субтерапевтическое количество ингибитора; схема дозирования ингибитора не является достаточной для уменьшения опухолевой массы у субъекта или снижает опухолевую массу менее чем на 10% при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией; и/или схема дозирования ингибитора не приводит к полному или частичному ответу в группе субъектов, леченных аналогичным образом, или приводит к такому ответу не более чем у 10% таких субъектов при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного применения с цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора содержит субтерапевтическое количество ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора не является достаточной для уменьшения

опухолевой массы у субъекта или уменьшения опухолевой массы менее чем на 10% при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора не приводит к полному или частичному ответу в группе субъектов, леченных аналогичным образом, или приводит к такому ответу не более чем у 10% таких субъектов при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного применения с цитотоксической терапией.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает дозирование один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 150 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 100 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 50 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 40 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 150 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 100 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 50 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 150 мг, от точно или примерно 50 мг и до точно или примерно 100 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 100 мг и до точно или примерно 150 мг, от точно или примерно 150 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 150 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 150 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 150 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 150 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 150 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 200 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 200 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 200 мг и до точно или

примерно 350 мг, от точно или примерно 200 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 200 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 250 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 300 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 300 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 300 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 350 мг и до точно или примерно 400 мг, и от точно или примерно 350 мг и до точно или примерно 800 мг, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 20 мг до точно или примерно 100 мг, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, однократная суточная доза составляет от точно или примерно 20 мг до точно или примерно 400 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 200 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 400 мг, включительно.

В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 100 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 50 мг до точно или примерно 100 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 20 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 40 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 100 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 300 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 400 мг. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает однократное суточное дозирование, и количество однократной суточной дозы составляет 200 мг в течение, по меньшей мере, примерно 11 недель. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает однократное суточное дозирование, и количество однократной суточной дозы составляет 200 мг, вводимое, по меньшей мере, в течение примерно 12 недель после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят по схеме увеличения дозы перед введением схемы дозирования ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, предшествующим или предыдущим лечением ингибитором является схема увеличения дозы, которая включает введение возрастающих количеств ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления, увеличивающееся количество ингибитора составляет вплоть до количества однократной суточной дозы. В некоторых вариантах осуществления, предшествующее или предыдущее лечение ингибитором вводят во момент времени между сбором клеток, например Т-клеток, таких как аутологичные клетки от субъекта и перед введением субъекту противолимфомной терапии в качестве переходной терапии перед введением цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, сбор клеток, например Т-клеток, таких как аутологичные клетки, осуществляют аферезом или лейкоаферезом. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором вводят по схеме увеличения дозы, где схема увеличения дозы включает введение возрастающих доз ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту возрастающими дозами до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 100 мг. В некоторых вариантах осуществления, возрастающие дозы включают первую дозу, которая составляет примерно 20 мг в сутки, вторую дозу, которая составляет примерно 50 мг в сутки, и третью дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту возрастающими дозами до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 200 мг. В некоторых вариантах осуществления, возрастающие дозы включают первую дозу, которая составляет примерно 20 мг в сутки, вторую дозу, которая составляет примерно 50 мг в сутки, третью дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки, и четвертую дозу, которая составляет примерно 200 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту возрастающими дозами до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 400 мг. В некоторых вариантах осуществления, возрастающие дозы включают первую дозу, которая составляет примерно 20 мг в сутки, вторую дозу, которая составляет примерно 50 мг в сутки, третью дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки, четвертую дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки, четвертую дозу, которая составляет примерно 200 мг в сутки, и пятую дозу, которая составляет примерно 400 мг. В некоторых вариантах осуществления, последнюю увеличивающуюся дозу по графику возрастания дозы вводят один раз в сутки в течение недели и до точно или примерно конца переходной терапии. В некоторых вариантах осуществления, каждую возрастающую дозу (например, первую, вторую, третью) вводят один раз в день в течение недели, а последнюю возрастающую дозу вводят один раз в день в течение недели или до конца переходной терапии. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, за 1 день до введения противолимфомной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает, до введения цитотоксической терапии, введение субъекту противолимфомного агента или терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили ингибитором белка семейства Bcl-2, способствующего выживанию, необязательно, где субъекта ранее лечили венетоклаксом. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором вводят в период времени между сбором аутологичных клеток и до противолимфомной

терапии. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, точно или примерно за 3 дня, или, по меньшей мере, точно или примерно за 4 дня до введения противолимфочной терапии и/или, по меньшей мере, за некоторое время до того, пока концентрация ингибитора в кровотоке субъекта уменьшится примерно на три или примерно четыре периода полужизни и/или, по меньшей мере, время, пока ингибитор не будет удален из кровотока субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, BFL1, MCL1 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, представляют собой BCL2, BCLXL и/или BCLW. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, представляют собой BCL2, BCLXL, BCLW и/или BFL1. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, представляют собой BCL2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, с полумаксимальной ингибирующей концентрацией (IC₅₀) менее или менее примерно 1000 нМ, 900 нМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ или менее или менее примерно 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор выбран из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является навитоклакс. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, раком является гематологическое злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, раком является злокачественное образование В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, раком является миелома, лейкоз или лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является миелома. В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская лимфома (NHL) или В-врупноклеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является неходжкинская лимфома (NHL). В некоторых вариантах осуществления, NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является первичная В-клеточная лимфома средостенная (PMBCL) или фолликулярная лимфома (FL),

необязательно, фолликулярная лимфома 3В степени (FL3В). В некоторых вариантах осуществления, раком является первичная В-клеточная лимфома средостения (PMBCL). В некоторых вариантах осуществления, раком является фолликулярная лимфома (FL). В некоторых вариантах осуществления, раком является фолликулярная лимфома 3В степени (FL3В).

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к лечению, потерпел неудачу и/или не смог перенести лечение одним или несколькими предшествующими видами терапии для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления, рак является резистентным к лечению только цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, рак является резистентным к лечению одним только ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию белка семейства BCL2, способствующего выживанию, таргетируемого ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию BCL2. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию BCLXL. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию MCL1. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию BFL1.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение до 6 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора один раз в сутки в течение примерно до 6 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение периода времени, по меньшей мере, 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение до 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора один раз в сутки в течение, по меньшей мере, примерно 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора один раз в сутки в течение примерно до 12 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора один раз в сутки в течение примерно до 24 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора по схеме дозирования прекращают, если субъект демонстрирует клиническую ремиссию.

В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора по схеме дозирования прекращают в конце периода времени, если субъект демонстрирует клиническую ремиссию. В некоторых вариантах осуществления, срок составляет 3 месяца. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает продолжение введения схемы дозирования ингибитора, если в конце периода времени у субъекта не проявляется клиническая ремиссия. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает продолжение введения схемы дозирования ингибитора, если в конце периода времени субъект демонстрирует частичный ответ (PR). В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает продолжение введения схемы дозирования ингибитора, если в конце периода времени субъект демонстрирует стабильное заболевание (SD). В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает продолжение введения схемы дозирования ингибитора, если в конце периода времени субъект демонстрирует минимальную остаточную болезнь (MRD), большую или равную 10^{-4} . В некоторых вариантах осуществления, срок составляет 3 месяца.

В некоторых вариантах осуществления, способ увеличивает цитотоксическую активность цитотоксической терапии по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора; и/или способ увеличивает цитолитическую гибель одной или нескольких раковых клеток, необязательно через опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз, по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полного ответа (CR), который является длительным или устойчивым, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90, или 95% субъектов, достигших CR в течение точно или более 6 месяцев, или точно или более 9 месяцев; и/или где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR к шести месяцам, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение точно или более 3 месяцев и/или точно или более 6 месяцев и/или более девяти месяцев; и/или, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение в соответствии с этим способом, достигают объективного ответа (OR), необязательно, где OR является длительным или длительным у, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR в течение точно или более 6 месяцев, или точно или более 9 месяцев; и/или где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, остаются в ответе или выживают в течение точно или более 3 месяцев и/или точно или более 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек.

В настоящем документе предложен способ лечения цитотоксической терапией, где способ включает (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, страдающего или

подозреваемого в наличии рака; (b) выбор субъекта для лечения цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, ниже контрольного значения гена; и (c) введение выбранному пациенту цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и связывает антиген, связанный, экспрессируемый или присутствующий на раковых клетках. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является клеточная терапия, экспрессирующая рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор гена, способствующего выживанию, не вводят субъекту во время или после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор гена, способствующего выживанию, не вводят субъекту в течение 7 дней, 14 дней или 28 дней после введения цитотоксической терапии.

В настоящем документе предложен способ выбора субъекта, страдающего раком, для лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, где этот способ включает (a) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где: (i) уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию; (ii) субъект должен получать цитотоксическую терапию, которой является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и (iii) биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и (b) выбор субъекта, страдающего раком, для лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию выше контрольного значения гена, где ингибитор вводят по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является клеточная терапия, экспрессирующая рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период точно или примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период точно или примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, если субъект не выбран для лечения ингибитором, способ включает введение субъекту только цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, если субъект выбран для лечения ингибитором, способ дополнительно включает введение субъекту ингибитора и цитотоксической терапии.

В настоящем документе предложен способ идентификации субъекта, страдающего

раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, где способ включает (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где: (i) уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию; (ii) субъект является кандидатом на введение дозы цитотоксической терапии, которой является иммунотерапия или клеточная терапия, и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и (iii) биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и (b) идентификацию субъекта как больного раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является клеточная терапия, экспрессирующая рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, если у субъекта идентифицирован рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, способ дополнительно включает введение альтернативного лечения идентифицированному субъекту, где альтернативное лечение выбирают из следующих: комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность цитотоксической терапии; повышенная доза цитотоксической терапии; и/или химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность Т-клеточной терапии, необязательно, где дополнительным агентом является ингибитор иммунных контрольных точек, модулятор метаболического пути, антагонист аденозинового рецептора, ингибитор киназы, антитело против TGFbeta или антитело против TGFbetaR, цитокин и/или ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, альтернативное лечение содержит повышенную дозу цитотоксической терапии по сравнению с дозой цитотоксической терапии, вводимой субъекту, у которого выявлен рак, резистентный к лечению цитотоксической терапией не прогнозируемый. В некоторых вариантах осуществления, повышенная доза цитотоксической терапии содержит увеличенное количество клеток цитотоксической терапии по сравнению с дозой цитотоксической терапии, введенной субъекту, у которого идентифицирован рак, который, по прогнозам, не является резистентным к лечению цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является химиотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления,

химиотерапевтическим агентом является циклофосфамид, доксорубин, преднизон, винкристин, флударабин, бендамустин и/или ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления, если у субъекта идентифицирован рак, резистентность которого к лечению цитотоксической терапией не прогнозируется, способ включает введение субъекту только цитотоксической терапии. В любом из представленных вариантов осуществления, способ дополнительно включает введение идентифицированному субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% от среднего уровня или количества одного или нескольких генов в (a) популяции субъектов, не имеющих рак, или (b) популяция субъектов, страдающих раком и которым вводили терапию, у которых проявлялся частичный ответ (PR) или полный ответ (CR) после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, у популяции субъектов, страдающих раком, наблюдается PR или CR в течение, по меньшей мере, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, оценивают в биологическом образце перед тем, как субъекту вводят противолимфомную терапию, необязательно в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до 3 дней до, 2 дней до, 1 дня до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часов до или 1 часа до введения субъекту противолимфомной терапии.

В настоящем документе предложен способ определения чувствительности субъекта, страдающего раком, к цитотоксической терапии, где способ включает (a) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, страдающего раком, где: (i) уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию; (ii) биологический образец получают от субъекта в первый раз до того, как субъекту вводят цитотоксическую терапию, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и связывает антиген, связанный с, экспрессируемый или присутствующий в клетки рака; и (iii) субъект должен получать лечение цитотоксической терапией; (b) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии, где: (i) уровнем или количеством одного или более генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемых одним или несколькими генами, способствующих выживанию; (ii) биологический образец получают во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии; и (iii) субъекту вводили цитотоксическую терапию до оценки на стадии (b); и (c) определение того, что субъект реагирует на терапию, если уровень или

количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, во второй раз ниже, чем уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в первый раз.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов, способствующих выживанию, выбраны из группы, состоящей из гена семейства MYC, p53 и энхансера гомолога zeste 2 (EZH2). В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является ген семейства MYC. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является p53. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является EZH2.

В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, ингибитор вводят в сочетании с цитотоксической терапией в соответствии с любым из представленных в настоящем документе комбинированных способов, которые включают введение цитотоксической терапии и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

В настоящем документе также предложен способ лечения рака, включающий (1) введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетки и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессированным или присутствующим на клетках рака; и (2) введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В настоящем документе также предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, страдающему раком, ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, где ингибитор вводят по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетками и специфически связывающаяся с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака.

Также предложен способ лечения рака у субъекта, где способ включает введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетками и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, где субъекту вводят или необходимо вводить ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в течение периода времени по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает

начало введения ингибитора после введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в течение 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в течение 3 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит не более чем через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в течение 1 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора во время или после того, как клеточная смерть индуцированная активацией, (AICD) клеток клеточной терапии достигла пика после начала введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одну дозу ингибитора по схеме дозирования вводят одновременно с цитотоксической терапией и/или в тот же день, что и цитотоксическую терапию.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или не вводили ритуксимаб и/или ибрутиниб в течение 7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия способна вызывать или приводит к клеточно-опосредованной цитотоксичности одной или нескольких клеток рака. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия способна или опосредует опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз одной или нескольких клеток рака.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия содержит клетки, которые являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрации опухоли лимфоцитами (TIL), терапии трансгенным TCR и клеточной терапии, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, от точно или примерно 5×10^5 до точно или примерно 1×10^7 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, или от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^7 общих Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общих Т-клеток, все включительно.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия содержит или

обогащена CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ или CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия содержит или обогащена CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки клеточной терапии содержат определенное соотношение Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4⁺, к Т-клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор CD8⁺, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия содержит введение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где Т-клетки каждой дозы содержат рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном, где введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включают первую композицию, включающую или обогащенную CD8⁺ Т-клетками, и вторую композицию, включающую или обогащенную CD4⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ Т-клетки, включая рекомбинантный рецептор в одной из первой и второй композиций, и CD8⁺ Т-клетки, включая рекомбинантный рецептор в другой из первой и второй композиций, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или от точно или приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ Т-клетки, включая рекомбинантный рецептор, и CD8⁺ Т-клетки, включая рекомбинантный рецептор, вводимые в первой и второй композициях, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет приблизительно 1:3 и приблизительно 3:1. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является CAR.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение от точно или примерно 1×10^5 до 5×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих CAR Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, от 5×10^7 до 1×10^8 общих Т-клеток, экспрессирующих CAR, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия включает введение точно или примерно 1×10^8 клеток, экспрессирующих CAR.

В некоторых вариантах осуществления, антиген является опухолевый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антиген выбран из $\alpha\nu\beta 6$ интегрина ($\alpha\nu\beta 6$ интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (STAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, С-С мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123,

CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита B, лейкоцитарного антигена человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), c-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана A (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1). В некоторых вариантах осуществления, антиген связан со злокачественным образованием В-клеток, при этом антиген необязательно экспрессируется на В-клетках человека. В некоторых вариантах осуществления, В-клеточным антигеном является CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igkappa, Iglambda, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD19.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, включая внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи и костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область

содержит сигнальный домен CD28.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает, до введения цитотоксической терапии, введение субъекту противолимфомного агента или терапии. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия завершается за 2-7 дней до начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в дозе примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 2-4 дней; или где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации примерно 500 мг/м^2 . В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят в течение 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации точно или примерно 300 мг/м^2 и флударабина в дозе примерно 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации точно или примерно 500 мг/м^2 и флударабина в дозе примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает субтерапевтическое количество ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора является не достаточной для уменьшения опухолевой массы у субъекта или уменьшения опухолевой массы чем на 10% при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора не приводит к полному или частичному ответу в группе субъектов, леченных аналогичным образом, или приводит к такому ответу не более чем у 10% таких субъектов при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного применения с цитотоксической терапией.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает дозировку один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления, однократная суточная доза составляет от точно или примерно 20 мг до 400 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, суточная доза составляет от точно или примерно 20 мг до 200 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 50 мг до точно или примерно 100 мг, включительно. В некоторых вариантах осуществления, однократная суточная доза составляет точно или примерно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократная суточная доза составляет точно или примерно 100 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократная суточная доза составляет точно или примерно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления, однократная суточная доза составляет точно или примерно 400 мг.

В некоторых вариантах осуществления, перед введением схемы дозирования ингибитора субъекта ранее лечили ингибитором белка семейства Bcl-2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором вводят во время между сбором аутологичных клеток от субъекта и до введения субъекту противолимфомной терапии, в качестве переходной терапии перед назначением цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, сбор осуществляют аферезом или лейкоаферезом. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором вводят по графику увеличения дозы, где график увеличения дозы содержит введение возрастающих доз ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту возрастающими дозами до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 100 мг. В некоторых вариантах осуществления, возрастающие дозы включают первую дозу, которая составляет примерно 20 мг в сутки, вторую дозу, которая составляет примерно 50 мг в сутки, и третью дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления, каждую повышающуюся дозу вводят один раз в сутки в течение недели и/или последнюю повышающую дозу вводят один раз в сутки в течение недели и до конца переходной терапии. В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, за 1 день до введения противолимфомной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, предыдущее лечение ингибитором прекращают за: по меньшей мере, точно или примерно 3 дня, или, по меньшей мере, точно или примерно 4 дня до введения противолимфомной терапии; по меньшей мере, в течение некоторого времени, пока концентрация ингибитора в кровотоке субъекта не снизится примерно на три периода полужизни или примерно на четыре периода полужизни; или, по меньшей мере, в течение некоторого времени, пока ингибитор не будет удален из кровотока субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими белками семейства BCL2, способствующими выживанию, являются BCL2, BCLXL и/или BCLW. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор выбран из группы, состоящей из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, раком является гематологическое злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, раком является злокачественное образование В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, раком является миелома, лейкоз или лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская

лимфома (NHL), В-крупноклеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является неходжкинская лимфома (NHL). В некоторых вариантах осуществления, NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома.

В некоторых вариантах осуществления, субъекта имеет рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым к лечению, потерпел неудачу и/или не смог перенести лечение одним или несколькими предшествующими видами терапии для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления, рак демонстрирует сверхэкспрессию белка семейства BCL2, способствующего выживанию, таргетируемого ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора один раз в сутки в течение периода времени, по меньшей мере, 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает продолжение введения схемы дозирования ингибитора, если в конце периода времени у субъекта не наблюдается клиническая ремиссия, например, если субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) или минимальное остаточное заболевание (MRD) больше или равное 10^{-4} . В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора по схеме дозирования прекращают в конце периода времени, если субъект демонстрирует клиническую ремиссию. В некоторых вариантах осуществления, срок составляет 3 месяца.

В некоторых вариантах осуществления, способ увеличивает цитотоксическую активность цитотоксической терапии по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, способ увеличивает цитолитическую гибель. В некоторых вариантах осуществления, цитолитическая гибель увеличивается посредством опосредованного перфорином и/или гранзимом апоптоза одной или нескольких раковых клеток по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полного ответа (CR), который является длительным или устойчивым, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90, или 95% субъектов, достигших CR в течение точно или более 6 месяцев, или точно или более 9 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR через шесть месяцев, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение более или более 3 месяцев и/или в течение более 6 месяцев и/или более девяти месяцев. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают объективного ответа (OR). В

некоторых вариантах осуществления, OR является длительным, или является длительным у, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR в течение точно или более 6 месяцев, или точно или более 9 месяцев. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, остаются в ответе или выживают в течение более или более 3 месяцев и/или более или более 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек.

В настоящем документе предложен способ лечения цитотоксической терапией, включающий: (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, являются уровень или количество белка или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию; (b) выбор субъекта для лечения цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, ниже контрольного значения гена, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетками и специфически связывается с антигеном, связанным, экспрессируемым ими или присутствующим на раковых клетках; и (с) проведение выбранному пациенту цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор гена, способствующего выживанию, не вводится субъекту во время или после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор не вводят в течение 7 дней, 14 дней или 28 дней после проведения цитотоксической терапии.

В настоящем документе предложен способ выбора субъекта, страдающего раком, для введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, включающий: (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии рака, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект должен получать введение цитотоксической терапии, то есть Т-клеточную терапию, включающую или обогащенную Т-клетками и которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и при этом биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и (b) отбор субъекта для лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию выше контрольного значения гена.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение выбранному субъекту ингибитора в сочетании с цитотоксической терапией.

В настоящем документе предложен способ идентификации субъекта, страдающего

раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, включая: (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект является кандидатом на введение дозы цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетками и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и (b) идентификацию субъекта как больного раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

В некоторых вариантах осуществления, субъект идентифицирован как имеющий рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, дополнительно включая введение альтернативного лечения идентифицированному субъекту, где альтернативное лечение выбирают из следующего: комбинированное лечение, включая цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность цитотоксической терапии; повышенная доза цитотоксической терапии; и/или химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, дополнительным агентом является ингибитор иммунной контрольной точки, модулятор метаболического пути, антагонист рецептора аденозина, ингибитор киназы, анти-TGF β антитело или анти-TGF β R антитело, цитокин или ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию, и ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно содержит введение выбранному субъекту ингибитора в сочетании с цитотоксической терапией.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% от среднего уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в (а) популяции субъектов, не имеющих рак или (b) популяции субъектов, имеющих рак и которым вводили цитотоксическую терапию, которые продолжают демонстрировать частичный ответ (PR) или полный ответ (CR) после введения терапии.

В некоторых вариантах осуществления, популяция субъектов, страдающих раком, продолжает демонстрировать PR или CR, по меньшей мере, через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более после

проведения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, оценивают в биологическом образце перед тем, как проводить противолимфому терапию субъекту, необязательно в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до, 3 дней до, 2 дней до, 1 день до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часа до или 1 час до введения субъекту противолимфому терапии.

В настоящем документе предложен способ определения чувствительности субъекта, страдающего раком, к цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетками и которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках, способ, включающий: (а) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию является уровень или количество белка или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где биологический образец получают от субъекта в первый раз до того, как субъекту вводят цитотоксическую терапию, и где субъект должен получать лечение с помощью цитотоксической терапии; (b) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, обеспечивающими выживание, где биологический образец получают во второй раз после введения цитотоксической терапии субъекту, и где субъекту вводили цитотоксическую терапию до оценки на стадии (b); и (c) определение того, что субъект отвечает на терапию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, во второй раз ниже, чем уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в первый раз.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает, до оценки на стадии (b), введение субъекту цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец получают от субъекта за некоторое время до того, как субъекту будет назначена противолимфому терапия. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец получают в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до, 3 дней до, 2 дней до, 1 дня до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часа до или 1 час до введения субъекту противолимфому терапии.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов, способствующих выживанию, выбирают из следующего: ген семейства *тус*, *p53* и энхансер гомолога 2 *zeste* (*EZH2*). В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является или содержит ген семейства *тус*. В некоторых вариантах осуществления, ген семейства *тус* содержит один

или несколько из с-мус, l-мус и n-мус. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генами, способствующими выживанию, являются или содержат p53. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генами, способствующими выживанию, являются или содержат EZH2.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия содержит клетки, которые являются аутологичными к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрацией опухоли лимфоцитами (TIL), терапии трансгенным TCR и клеточной терапии, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия включает дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия содержит или обогащена CD3+, CD4+, CD8+ или CD4+ и CD8+ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия содержит или обогащена CD4+ и CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, CD4+ и CD8+ Т-клетки цитотоксической терапии содержат определенное отношение Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+, к Т-клеткам, экспрессирующим CD8+ CAR, и/или Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный CD4+, к Т-клеткам, экспрессирующим CD8+ CAR, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, включая внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи и костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая область содержит сигнальный домен CD28.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят в сочетании с цитотоксической терапией в соответствии с любым из представленных способов.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором гена, способствующего выживанию, является ингибитор белка семейства BCL2, где ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими белками семейства BCL2, способствующими выживанию, являются BCL2, BCLXL и/или BCLW.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор выбран из группы, состоящей из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина. В

некоторых вариантах осуществления, ингибитором является венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, раком является гематологическое злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, раком является злокачественное образование В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, раком является миелома, лейкоз или лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская лимфома (NHL), В-крупноклеточная лимфом. В некоторых вариантах осуществления, раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является неходжкинская лимфома (NHL). В некоторых вариантах осуществления, NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив после ремиссии после лечения, или он стал невосприимчивым, не достиг успеха и/или не переносит лечение одним или несколькими предшествующими способами лечения рака. В некоторых вариантах осуществления, биологическим образцом является биопсия опухоли. В некоторых вариантах осуществления, образцом является биопсия лимфатического узла. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек.

Краткое описание чертежей

На **ФИГ. 1А** показана жизнеспособность клеток CD19-экспрессирующих клеточных линий лимфомы и лейкоза человека, совместно культивируемых с анти-CD19 CAR Т-клетками при увеличивающихся соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням (Е:Т).

На **ФИГ. 1В** показан размер сфероидов, образованных из линии клеток RL неходжкинской лимфомы (NHL) с течением времени, при совместном культивировании с CD19-таргетными CAR Т-клетками при соотношениях Е:Т 0,25:1, 0,5:1 и 1:1.

На **ФИГ. 2** показано кратное изменение количества клеток в экспрессирующих CD19 линиях клеток-мишеней лейкоза и лимфомы человека, совместно культивируемых в течение 120 часов с CD19-таргетными CAR Т-клетками при соотношении Е:Т 2,5:1.

На **ФИГ. 3** показана жизнеспособность Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 CAR, обработанных в течение 96 часов типовым ингибитором BCL2.

На **ФИГ. 4А** показано количество клеток CD19-экспрессирующих клеточных линий лимфомы человека, культивируемых отдельно, с CD19-таргетными CAR Т-клетками при соотношении Е:Т 2,5:1, с типовым ингибитором BCL2 или с обоими.

На **ФИГ. 4В** показано количество CD19-экспрессирующих клеток-мишеней лимфомы Granta-519, культивируемых отдельно, с анти-CD19 CAR Т-клетками при субоптимальном соотношении Е:Т, равном 1:1, с типовым ингибитором BCL2 или с обоими.

На **ФИГ. 5А** показано количество клеток в RL-клетках, культивируемых отдельно, с CD19-таргетными CAR Т-клетками при соотношении Е:Т 1:1, с типовым ингибитором

BCL2 или с обоими.

На **ФИГ. 5B** показан объем опухоли RL сфероидов, культивируемых отдельно, с CD19-таргетными CAR T-клетками при соотношении E:T 1:1, с типовым ингибитором BCL2 или с обоими.

На **ФИГ. 5C** показан объем опухоли RL сфероидов, культивируемых отдельно или с CD19-таргетными CAR T-клетками в течение 9 дней, в присутствии возрастающих концентраций типового ингибитора BCL2.

На **ФИГ. 6A** показано количество RL клеток, культивированных в течение 8 дней отдельно или с анти-CD19 CAR T-клетками (соотношение E:T 1:1), которые ранее подвергались хронической стимуляции путем инкубации с гранулами, покрытыми анти-идиотипическими антителами, в присутствии или отсутствии типового ингибитора BCL2.

На **ФИГ. 6B** показан объем опухоли RL сфероидов, культивируемых в течение 8 дней отдельно или с анти-CD19 CAR T-клетками (соотношение E:T 1:1), которые ранее подвергались хронической стимуляции путем инкубации с гранулами, покрытыми анти-идиотипическими антителами в присутствии или в отсутствии типового ингибитора BCL2.

На **ФИГ. 7** показаны данные экспрессии генов биопсий опухоли от 36 пациентов с DLBCL, включенных в клиническое испытание CAR T-клеточной терапии, CD19-таргетной. Гипотетический порог установлен исходя из предположения, что через 3 месяца после введения клеточной терапии 30% субъектов (11/36) не ответят, и 70% субъектов (25/36) ответят. Показаны фактические ответы, обозначенные как полный ответ (CR), частичный ответ (PR), прогрессирующее заболевание (PD) или статус недоступен (Не доступно).

На **ФИГ. 8A** показана экспрессия BCL2, выраженная в виде средней интенсивности флуоресценции (MFI), анти-CD19 CAR-экспрессирующих T-клеточных композиций, полученных от трех здоровых доноров-людей, по сравнению с контролем флуоресценции с комбинацией определяемых меток без одной (FMO).

На **ФИГ. 8B** показана доля клеток CAR+ каспазы 3+ среди CD19 CAR T-клеточных композиций, полученных от трех здоровых доноров-людей (каждая точка представляет отдельного донора), после хронической стимуляции путем инкубации с гранулами, покрытыми анти-идиотипическими антителами, и воздействия возрастающих концентраций типового ингибитора BCL2.

На **ФИГ. 8C** и **8D** показаны жизнеспособность клеток и кинетика размножения CD19-таргетных CAR T-клеток, соответственно, после хронической стимуляции путем инкубации с гранулами, покрытыми анти-идиотипическими антителами, и воздействия типового ингибитора BCL2.

На **ФИГ. 9** показаны клетки-мишени мантийноклеточной лимфомы (MCL) JeKo-1, культивируемые отдельно, с CD19-таргетными CAR T-клетками, с типовым ингибитором BCL2 или с обоими.

На **ФИГ. 10** показаны IC₅₀ типового ингибитора BCL2 против анти-CD19 CAR T-

клеток в культуре с 5%, 10% или 20% сывороткой.

На **ФИГ. 11А** и **11В** показаны опухолевая масса и масса тела, соответственно, мышей NOD scid gamma (NSG), которым инъецировали клетки MCL JeKo-1 в день -7 и ежедневно лечили типовым ингибитором BCL2 с дня 0 по день 21.

На **ФИГ. 12А-12С** показаны опухолевая нагрузка (ФИГ. 12А) и выживаемость у мышей NSG, которым инъецировали клетки MCL JeKo-1 в день -7 и лечили типовым ингибитором BCL2 ежедневно с дня 0 до дня 21 (ФИГ. 12В), анти-CD19 CAR T-клетки в день -1 и день 0 (ФИГ. 12С) или в оба дня (ФИГ. 12С).

На **ФИГ. 13** показано количество CD4⁺ CAR⁺ и CD8⁺ CAR⁺ клеток в крови мышей NSG, которым инъецировали клетки MCL JeKo-1 и лечили CD19-таргетными CAR T-клетками, в присутствии или в отсутствие типового ингибитора BCL2, в день 7, 13 и 19.

На **ФИГ. 14А** и **14В** показано количество CD3⁺ CAR⁺ T-клеток и клеток-мишеней RL, соответственно, после 6-дневного совместного культивирования. Различные концентрации типового ингибитора BCL2 были представлены при совместном культивировании при его иницировании или через 24, 48 или 72 часа после начала совместного культивирования.

Подробное описание

В настоящем документе представлены комбинированные терапии для лечения субъекта, страдающего раком, включающие введение иммунотерапии или клеточной терапии (например, T-клеточной терапии, такой как CAR-T клетки) для лечения рака, и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2. В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапия или клеточная терапия включает любую такую терапию, которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака. В конкретных вариантах осуществления, иммунотерапия или клеточная терапия является или содержит терапию, которая приводит к опосредованной цитолитическим эффектором гибели раковых клеток, например, путем апоптоза клеток-мишеней (далее «цитотоксическая терапия»). Среди представленных вариантов осуществления, представлена комбинированная терапия, включающая введение иммунотерапии, затрагивающей функцию или активность T-клеток, такой как T-клеточная рекрутинговая терапия или T-клеточная терапия (например, T-клетками, экспрессирующими CAR), и введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является T-клеточная терапия, такая как CAR-T-клетки. В конкретных вариантах осуществления, предлагаемые комбинированные терапии и способы улучшают ответы на иммунотерапию или клеточную терапию за счет активности ингибитора, повышающего восприимчивость раковых клеток, таких как опухолевые клетки, к апоптозу, тем самым делая клетки более чувствительными к опосредованной цитолитическим эффектором гибели.

Также представлены комбинации и готовые изделия, такие как наборы, которые содержат композицию, содержащую терапию, и/или композицию, содержащую ингибитор

белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклакс или навитоклакс, и применение таких композиций и комбинаций для лечения или профилактики рака, такого как злокачественное образование В-клеток.

Клеточные терапии, такие как терапии на основе Т-клеток, например, адоптивная Т-клеточная терапия (включая те, которые включают введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, специфичные для представляющего интерес рака, такие как антигенные химерные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие адоптивные иммунно-клеточные и адоптивные Т-клеточные терапии) могут быть эффективными при лечении заболеваний и нарушений, таких как злокачественные образования В-клеток. Сконструированная экспрессия рекомбинантных рецепторов, таких как химерные антигенные рецепторы (CAR), на поверхности Т-клеток позволяет перенаправить специфичность Т-клеток. В клинических исследованиях, CAR-Т-клетки, например, анти-CD19 CAR-Т-клетки, вызвали стойкие, полные ответы как у пациентов с лейкозом, так и у пациентов с лимфомой (Porter et al. (2015) *Sci Transl Med.*, 7:303ra139; Kochenderfer (2015) *J. Clin. Oncol.*, 33: 540-9; Lee et al. (2015) *Lancet*, 385:517-28; Maude et al. (2014) *N Engl J Med*, 371:1507-17).

В определенных контекстах, доступные подходы к адоптивной клеточной терапии не всегда могут быть полностью удовлетворительными. В некоторых контекстах, оптимальная эффективность может зависеть от способности вводимых клеток распознавать и связываться с мишенью, *например*, антигеном-мишенью, и проявлять различные эффекторные функции, включая цитотоксическую гибель раковых клеток и секрецию различных факторов, таких как цитокины. Однако в некоторых случаях, определенные раковые клетки демонстрируют резистентность к определенным терапиям, таким как иммунотерапия и клеточная терапия. В частности, приведенные в настоящем документе результаты демонстрируют, что некоторые виды рака резистентны к гибели, опосредованной CAR-Т-клетками, в то время как другие более чувствительны.

В некоторых аспектах, представленные способы, комбинации и применения представлены для или достигают улучшенных или более длительных ответов или эффективности по сравнению с альтернативными способами, такими как альтернативные способы, включающие только введение иммунотерапии или клеточной терапии, но не в комбинации с ингибитором белка семейства BCL2, обеспечивающего выживание (например, венетоклакса). В некоторых вариантах осуществления, способы являются выгодными благодаря введению ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакса) незадолго до (например, в пределах 7 дней) или одновременно с введением иммунотерапии или клеточной терапии (например, Т-клеточной терапии, такой как как CAR-Т-клетки), тем самым сенсibiliзируя опухоль и/или делая опухоль менее резистентной или более чувствительной к лечению иммунотерапией или клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, представленных способов, цитотоксической терапией является клеточная терапия (например, Т-клеточная терапия, такая как CAR-Т-клетки), и, кроме того, определено, что

благоприятный эффект сенсбилизации опухоли и/или того, что опухоль стала менее резистентной к или более чувствительной к лечению клеточной терапией, может достигаться путем начала введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакса), в промежутке времени даже после начала введения клеточной терапии, чтобы минимизировать или избежать пагубного воздействия ингибитора на клетки клеточной терапии. В частности, приведенные в настоящем документе наблюдения демонстрируют, что ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакс), особенно если его вводить в слишком высокой дозировке, может усугублять клеточную смерть, индуцированную активацией (AICD), при клеточной терапии. Однако, отсрочка введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакса), до того момента, когда AICD находится или достигнет своего пика или уменьшится после достижения пика, может избежать пагубного воздействия на клетки клеточной терапии при значительном улучшении, например, синергетическом увеличении, опосредованного Т-клетками уничтожения опухоли клетками клеточной терапии (например, CAR-Т-клетками).

Представленные способы основаны на наблюдениях, что некоторые виды рака, резистентные к опосредованной CAR-Т-клеткам гибели, демонстрируют высокую экспрессию способствующего выживанию супрессора опухолей p53 и других генов, участвующих в путях клеточного цикла, способствующего выживанию. В настоящем документе определено, что присутствие ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс, улучшает опосредованную Т-клетками гибель раковых клеток с помощью Т-клеточной терапии (например, CAR-Т-клеток), особенно при раковых заболеваниях, которые демонстрируют резистентность после воздействия только Т-клеточной терапии (например, CAR-Т-клетками). Такие результаты наблюдаются с низкими дозами ингибитора, который не проявлял никакой активности в отношении опухоли при введении отдельно. Эти результаты свидетельствуют о том, что введение ингибиторов белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в том числе в субтерапевтических дозах, может улучшать ответы на определенные эффектор-опосредованные иммунотерапии, такие как рекрутеры Т-клеток или Т-клеточные терапии.

Кроме того, в настоящем документе определено, что присутствие ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс, увеличивает восприимчивость раковых клеток к опосредованной Т-клетками гибели с помощью Т-клеточной терапии (например, CAR Т-клеток), например, среди злокачественных образований, которые демонстрируют резистентность к гибели клеток, опосредованной только Т-клеточной терапией (например, CAR Т-клетками), даже если начало введения ингибитора происходит после или сразу же после введения Т-клеточной терапии (например, CAR Т-клетками). Таким образом, в некоторых случаях, цитотические эффекты ингибитора BCL2, например венетоклакса, и Т-клеточной терапии (например,

CAR-T-клеток) могут быть синергическими, приводя к гибели клеток, в других случаях резистентных к лечению только Т-клеточной терапией. В некоторых случаях, введение ингибитора, например венетоклакса, может сенсibilизировать резистентные в других случаях раковые клетки к опосредованной CAR Т-клеткам гибели, когда его вводят в течение или примерно через 7 дней после введения клеточной терапии. Например, как показано в примере 9, в отсутствие венетоклакса опухолевые клетки были относительно резистентны к гибели клеток, опосредованной CAR Т-клетками. Хотя терапевтическая доза венетоклакса, вводимая одновременно или через 24 часа, снижает количество и активность CAR-T-клеток, терапевтическая доза венетоклакса, вводимая через 48 или 72 часа после начала совместного культивирования опухолевых клеток и CAR-T-клеток, способна сенсibilизировать опухолевые клетки к опосредованной CAR-T-клетками гибели без видимого вредного воздействия на CAR-T-клетки. Эти результаты неожиданно показали, что существует временное окно после начала клеточной терапии (например, CAR-T-клетками), в течение которого можно избежать или минимизировать отрицательное воздействие на клетки клеточной терапии ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса, даже при терапевтических дозах, при сохранении способности ингибитора увеличивать восприимчивость опухоли к Т-клеточной терапии. Эти результаты показывают, что введение ингибиторов белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, например, в пределах или примерно через 7 дней после введения Т-клеточной терапии, в том числе в терапевтических дозах, может улучшить ответ на Т-клеточную терапию, не оказывая значительных вредных эффектов на Т-клетки.

Венетоклак (ABT-199) является низкомолекулярным ингибитором (SMI), который блокирует активность белка В-клеточной лимфомы 2 (BCL2). Венетоклак одобрен для использования при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL), малом лимфоцитарном лейкозе (SLL) и в комбинации с азациитидином, децитабином или цитарабином в низких дозах при впервые диагностированном остром миелоидном лейкозе (AML) у взрослых в возрасте, по меньшей мере, 75 лет, или которые имеют сопутствующие заболевания, которые не позволяют использовать интенсивную индукционную химиотерапию. Навитоклак (ABT-263), другой ингибитор BCL2, способствующего выживанию, является SMI, который блокирует активность белков BCL2, В-экстракрупноклеточной лимфомы (BCLXL) и BCL2-подобного белка 2 (BCLW). Другие ингибиторы BCL2 включают, но не ограничены ими, ABT-737, AT-101/GDC-0199 (Госсипол), апогоссипол, TW-37, G3139 (Генасенс), GX15-070 (обатоклак), сабутоклак, HA14-1, антимицин А, ВН3I-1, YC137, маритоклак, клитоцин, UMI-77, WENI-539 и 544563.

Члены семейства BCL2 включают как про-апоптотические, так и анти-апоптотические белки, и являются балансом передачи сигналов между этими двумя группами, который может определять, является ли клетка более сенсibilизированной или более резистентной к апоптозу. В некоторых случаях, сверхэкспрессия одного или нескольких белков семейства BCL2, способствующих выживанию (например, BCL2),

может приводить к усилению анти-апоптотической передачи сигналов и резистентности к гибели клеток. Например, в некоторых случаях, сверхэкспрессия BCL2 может быть вызвана транслокацией (14;18) (q32;q21). В некоторых случаях, сверхэкспрессия BCL2 может быть вызвана амплификацией гена, кодирующего белок BCL2. Резистентность к гибели клеток может, в некоторых случаях, возникать, когда передача сигналов способствующих выживанию (анти-апоптотических) белков BCL2 (например, BCL2, BCLXL, BCLB, BCLW, BFL1, MCL1) превосходит передачу сигналов про-апоптотических белков BCL2 (например, BAX, BAK, BIK, BIM, NOXA, PUMA), например, когда сверхэкспрессируется один или несколько белков BCL2, способствующего выживанию. В некоторых аспектах, сверхэкспрессия одного или нескольких белков семейства BCL2, способствующих выживанию, может поддерживать и увеличивать выживаемость раковых клеток. В некоторых аспектах, повышенная экспрессия белков семейства BCL2, способствующих выживанию, блокирует про-апоптотические белки семейства BCL2 и ингибирует внутренний (митохондриальный) путь апоптоза раковой клетки.

Среди представленных вариантов осуществления, способы включают комбинированную терапию терапии, которая нацелена на или направлена на уничтожение клеток рака, например цитотоксической терапии, такой как терапия CAR T-клетками, и ингибитора белка семейства BCL2. В некоторых аспектах, ингибитор ингибирует активность белка семейства BCL2, который является белком семейства BCL2, способствующим выживанию (анти-апоптотическим), таким как BCL2, В-экстракрупноклеточная лимфома (BCLXL), BCL2-родственный белок A1 (BFL1), BCL2-подобный белок 2 (BCLW), BCL2-подобный белок 10 (BCLB), индуцированный белок дифференциации клеток миелоидного лейкоза (MCL1) или их комбинации. В некоторых аспектах, раком является рак, при котором сверхэкспрессируется белок семейства BCL2, обеспечивающий выживание. В некоторых аспектах, ингибитор не ингибирует или не снижает активность белка семейства BCL2, который является про-апоптотическим белком семейства BCL2, такого как BCL2-ассоциированный X (BAX), BCL2 антагонист/киллер 1 (BAK), DIVA, BCLXS, BCL2взаимодействующий киллер (BIK), BCL2-подобный белок 11 (BIM), BCL2-ассоциированный агонист клеточной смерти (BAD) или их комбинации. В некоторых аспектах, раком является рак, при котором про-апоптотический белок семейства BCL2 недоэкспрессируется или его активность ингибируется.

В некоторых аспектах сверхэкспрессия белка семейства BCL2, способствующего выживанию, вовлечена в ряд раков, включая рак мочевого пузыря, рак мозга, рак груди, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак почек, рак кожи и гематологические злокачественные образования, такие как лейкозы и лимфомы (см., например, WO 2005/049593; WO2005/024636). В некоторых случаях, сверхэкспрессия или aberrантная экспрессия одного или нескольких белков семейства BCL2, способствующих выживанию, является механизмом, лежащим в основе лейкозов, лимфом и солидных опухолей, посредством чего сверхэкспрессия подавляет про-апоптотическую передачу сигналов,

способствуя выживанию раковых клеток (см., например, Campbell, K.J. и Tait, S.W.G. (2018) *Open Biol.*, 8:180002). Во многих случаях, существующие способы применения ингибиторов белка семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как ингибиторы BCL2, например венетоклакс, включают применение ингибиторов в качестве терапевтических средств для лечения множества раков. Например, венетоклакс показан для лечения некоторых определенных раков, таких как В-клеточные лимфомы, в дозе от 400 до 800 миллиграммов в сутки после периода наращивания и в течение периода времени, который может длиться от месяцев до лет.

Однако сообщения показывают, что некоторые ингибиторы белков семейства BCL2, способствующих выживанию, могут оказывать вредное воздействие, включая прямую цитотоксичность, на Т-клетки (Karlsson et al. (2013) *Cancer Gene Ther.*, 20:386-93). Кроме того, известно, что BCL2 участвует и регулирует выживание Т-клеток (Wilson et al. (2010) *Lancet Oncol.*, 11:70261-8). Исследование влияния навитоклакса, ингибитора BCL2, BCLXL и BCLW, на Т-клетки показало, что воздействие навитоклакса индуцирует относительное и абсолютное снижение CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-клеток в периферической крови мышей (Cippa et al., (2012) *Cell Death и Disease*, 3:e299). В клиническом испытании фазы I навитоклакса (NCT00406809) сообщалось, что пациенты в испытании показали относительно быстрое и существенное снижение Т-клеток (среднее снижение на 241 CD3+ клеток/мкл) после 14 дней воздействия лекарственного средства на навитоклакс в дозе 200 миллиграммов/сутки или более, которая сохранялась во время последних посещений пациентов, происходивших в среднем через 89 дней после воздействия лекарственного средства (Wilson et al. (2010) *Lancet Oncol.*, 11:70261-8).

Эти сообщения указывают на то, что комбинация Т-клеточной терапии и ингибитора семейства BCL2 не может быть жизнеспособной терапевтической стратегией, особенно при терапевтических дозах ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В частности, такие наблюдения показывают, что комбинация ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, и CAR-Т-клеточной терапии может привести к потере CAR-Т-клеток. Поскольку пролиферация и выживаемость CAR Т-клеток *in vivo* являются постоянной проблемой в области Т-клеточной терапии, добавление агента, который является цитотоксичным для Т-клеток, такого как ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, было бы неблагоприятным, так как это снизит эффективность CAR Т-клеточной терапии за счет уменьшения пролиферации и выживаемости CAR-экспрессирующих Т-клеток.

Кроме того, CAR-экспрессирующая Т-клеточная терапия может привести к клеточной гибели, вызванной активацией (AICD). В частности, сообщения показывают, что CAR-Т-клетки могут быть склонны к аномальной экспрессии Fas, FasL, DR5 и TRAIL, например, при избыточной стимуляции Т-клеток, что приводит к запрограммированной смерти клеток. (Tschumi et al., *J. Immunother. Cancer* (2018) 71:6). С этой целью, комбинированное лечение ингибитором BCL2 (например, венетоклаксом), который блокирует передачу анти-апоптотических сигналов, может усугубить

запрограммированную смерть клеток, наблюдаемую в CAR T-клетках. Несмотря на это, приведенные в настоящем документе наблюдения показывают, что комбинация терапии, например, цитотоксической терапии, включая T-клеточную терапию, такую как CAR-T-клеточная терапия, является предпочтительной даже при терапевтических дозах ингибитора, способного оказывать вредное воздействие на CAR-T-клетки. Когда ингибитор (например, венетоклак) вводят в то время, когда индуцированная активацией гибель CAR T-клеток достигла пика (например, через 2-7 дней после введения CAR T-клеток), не только не наблюдается вредное воздействие на CAR T-клетки, но CAR T-клетки демонстрирует сильные противоопухолевые эффекты (см. пример 9). В некоторых аспектах, способы являются выгодными благодаря введению ингибитора BCL2 в терапевтической дозе после введения T-клеточной терапии (например, в пределах или примерно через 7 дней после введения T-клеточной терапии), такой как доза, в которой ожидается, что ингибитор будет оказывать вредное воздействие на T-клетки, включая жизнеспособность T-клеток. В некоторых аспектах, представленные способы и применения обеспечивают или достигают улучшенных или более длительных ответов или эффективности по сравнению с некоторыми альтернативными способами.

Кроме того, приведенные в настоящем документе наблюдения показывают, что комбинация терапии, например цитотоксической терапии, включая T-клеточную терапию, такую как терапия CAR-T-клетками, является преимущественной даже при субтерапевтических или более низких дозах ингибитора. Приведенные в настоящем документе результаты также показывают, что определенные дозы ингибитора не влияют на жизнеспособность T-клеток. В некоторых аспектах, способы являются преимущественными благодаря введению ингибитора BCL2 в субтерапевтической дозе, такой как доза, в которой только ингибитор предположительно не снизит или не снизит опухолевую массу у субъекта. В некоторых аспектах, представленные способы и применения обеспечивают или достигают улучшенных или более длительных ответов или эффективности по сравнению с некоторыми альтернативными способами. В некоторых аспектах, предлагаемые способы усиливают или модулируют цитотоксическую активность, например, посредством апоптоза, опосредованного перфорином и/или гранзимом, в отношении одной или нескольких клеток рака T-клеток против раковых клеток, например, ассоциированного с введением T-клеточной рекрутинговой терапии или T-клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующими T-клетками). В некоторых вариантах осуществления, наблюдения в настоящем документе показывают, что ингибитор белка семейства BCL2, обеспечивающий выживание, такой как ингибитор BCL2, например венетоклак, может улучшать активацию цитотоксичности, опосредованной CAR T-клетками, в терапевтических и/или субтерапевтических дозах. Представленные данные показывают, что комбинированная терапия ингибитором в способах, включающих T-клетки, например, включающих введение адаптивной T-клеточной терапии, обеспечивает улучшенную функцию T-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, комбинация клеточной терапии (например,

введения сконструированных Т-клеток) с ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, ингибитором BCL2 и/или ингибитором MCL1, улучшает или усиливает одну или несколько функций и/или эффектов Т-клеточной терапии, таких как цитотоксичность и/или терапевтические результаты, например способность убивать или уменьшать массу опухоли или другого заболевания или клетки-мишени.

В некоторых аспектах, такие эффекты наблюдаются, несмотря на то, что опухоль или заболевание или сама клетка-мишень не чувствительна, резистентна и/или иным образом недостаточно чувствительна к терапии, например цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия, включая Т-клеточную рекрутинговую терапию или Т-клеточную терапию (например, CAR Т-клетки), или к дозе ингибитора, когда каждый из них вводят отдельно. В некоторых вариантах осуществления, рак не чувствителен или стал резистентным к лечению терапией для лечения рака, которая направлена или нацелена на уничтожение рака, например цитотоксической терапией, такой как иммунотерапия, включая Т-клеточную рекрутинговую терапию или Т-клеточную терапию (например, CAR-Т-клеточную терапию). В некоторых вариантах осуществления, рак не чувствителен или стал резистентным к такой терапии из-за того, что клетки рака подавляют про-апоптотическую передачу сигналов. Например, в некоторых вариантах осуществления, рак не чувствителен или стал резистентным к CAR Т-клеткам, таргетирующим рак-ассоциированный антиген, например CD19. В некоторых вариантах осуществления, предлагаемая комбинированная терапия обеспечивает синергические эффекты и активность по сравнению с терапией, включающей только введение терапии, например цитотоксической терапии, или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, вводимого по той же схеме дозирования, например дозе и частоте.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы, применения и комбинированные терапии включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в сочетании с терапией для лечения рака, которая направлена на или нацелена на уничтожение рака, например цитотоксической терапией, такой как иммунотерапия, включая Т-клеточную рекрутинговую терапию или Т-клеточную терапию (например, CAR Т-клеточную терапию) у субъекта, которому уже вводили ингибитор или другой ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия, способы и применения включают продолжающееся введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в сочетании с Т-клеточной терапией (например, CAR+ Т-клетками) субъекту, который ранее получал введение ингибитора, например, венетоклакса, но в отсутствие (или не в комбинации с) терапии для лечения рака, которая направлена или нацелена на уничтожение рака, например цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия, включая Т-клеточную рекрутинговую терапию или Т-клеточную терапию (например, CAR-Т-клеточную

терапию). В некоторых вариантах осуществления, способы комбинированной терапии включают или вовлекают введение более низкой дозы ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, по сравнению с предыдущим лечением.

В некоторых вариантах осуществления, способы и комбинации приводят к улучшению опосредованной Т-клетками цитотоксичности против раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы и комбинации приводят к улучшениям опосредованной Т-клетками цитотоксичности против раковых клеток, необязательно за счет увеличения апоптоза, опосредованного перфорином и/или гранзимом. Такие улучшения, в некоторых аспектах, достигаются без ущерба или без существенного ухудшения одного или нескольких других желаемых свойств функциональности, например функциональности CAR-Т-клеток, пролиферации и/или жизнестойкости. В некоторых вариантах осуществления, комбинация с ингибитором, улучшая цитотоксичность Т-клеток, не снижает способность клеток становиться активированными, секретировать один или несколько желаемых цитокинов, увеличиваться и/или размножаться, например, по данным анализа *in vitro* по сравнению с такими клетками, культивированными в тех же условиях, но в отсутствие ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления, представленные варианты включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, до или одновременно с или сразу после введения терапии для лечения рака, которая направлена на или нацелена на уничтожение рака, например, цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия, включая Т-клеточную рекрутинговую терапию или Т-клеточную терапию (например, CAR Т-клеточную терапию) по схеме дозирования, которая продолжается до тех пор, пока не будет проведена терапия. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят одновременно и по схеме дозирования для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора во период времени от точно или примерно 1 дня до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии и/или во течение времени до того, как пиковые уровни цитотоксической терапии станут определяемыми в крови субъекта после введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в период между точно или примерно 7 днями и до точно или примерно 14 днями после начала введения цитотоксической терапии, точно или примерно 3 дня до и точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии, или точно или примерно 1 день до и точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии. В конкретных вариантах осуществления, введение ингибитора в представленных способах комбинированной терапии начинают между точно или примерно 1 дня до и точно или примерно 1 дня после начала введения цитотоксической терапии, например, точно или примерно за день до, в тот же день или в день после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, представленные варианты осуществления

включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклак, после введения цитотоксической терапии (например, CAR T-клеточной терапии) по схеме дозирования. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, происходит после введения цитотоксической терапии, например, примерно через 1 день после и примерно через 7 дней после введения терапия для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, не начинают до тех пор, пока не будет достигнут пик клеточной смерти, вызванной активацией (AICD) клеток при цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, осуществляется не ранее примерно 1 дня и примерно 7 дней, от примерно 2 дней до примерно 6 дней, или от примерно 3 дней до примерно 5 дней после введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в период между точно или примерно 1 день после или точно или примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в период между точно или примерно 2 дня после и точно или примерно 6 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит в период между точно или примерно 3 днями после и точно или примерно 5 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно на 1 день после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит точно или примерно через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит точно или примерно через 3 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит точно или примерно через 4 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит точно или примерно через 5 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит точно или примерно через 6 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, начало введения ингибитора происходит точно или примерно через 7 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых случаях комбинированная терапия включает введение ингибитора вплоть до точно или примерно 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 или более после того,

как субъекту ввели терапию, например цитотоксическую терапию. В некоторых аспектах, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклак, вводят в течение не более трех месяцев после введения терапии для лечения рака, которая направлена или нацелена на уничтожение рака, например цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия, включая Т-клеточную рекрутинговую терапию или Т-клеточную терапию (например, CAR Т-клеточную терапию). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят в сочетании с Т-клеточной терапией (например, CAR-Т-клетками), и введение ингибитора продолжают по схеме дозирования, которая включает продолжение введения ингибитора до момента, по истечении которого клетки Т-клеточной терапии достигают пиковых уровней у субъекта и/или персистируют в субъекте. В некоторых аспектах, преимущества представленных вариантов осуществления также включают возможность модулировать дозировку или введение ингибитора, например венетоклакса, или отменить или прервать введение ингибитора, например венетоклакса, в зависимости от переносимости у субъекта. В некоторых аспектах, представленные варианты осуществления, например, включающие комбинированное лечение с использованием ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса, могут помочь снизить опухолевую массу и/или снизить резистентность раковых клеток к определенным цитотоксическим терапиям, таким как клеточная терапия, например CAR Т клеточная терапия.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы могут усиливать CAR-Т-клеточную терапию, которая, в некоторых аспектах, может улучшить результаты лечения субъектов, у которых рак является резистентным или рефракторным к другим терапиям, является агрессивным раком или раком высокого риска, и/или который демонстрирует или может демонстрировать относительно более низкую скорость ответа на CAR-Т-клеточную терапию при введении без ингибитора. В некоторых аспектах, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в соответствии с представленными способами, может повысить активность CAR-экспрессирующих клеток для лечения рака, например, В-клеточного злокачественного образования, такого как CLL или NHL, например DLBCL или SLL, за счет увеличения цитотоксичности Т-клеток за счет снижения резистентности раковых клеток к CAR-Т-клеточной терапии, необязательно за счет увеличения апоптоза раковых клеток, опосредованного перфорином и/или гранзимом. В некоторых аспектах, улучшается противоопухолевая активность вводимых CAR+ Т-клеток против клеток лимфомы человека.

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ

В настоящем документе представлены способы комбинированной терапии для лечения заболевания или состояния, такого как пролиферативное заболевание (например, рак), которые включают введение субъекту комбинированной терапии, состоящей из 1) ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакса) и 2) цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия или клеточная

терапия, например Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, белком семейства BCL2, способствующим выживанию, является белок семейства BCL2, который обладает способностью способствовать выживанию и/или ослаблять про-апоптотическую передачу сигналов.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия, такая как адоптивная иммуноклеточная терапия, включающая Т-клетки (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), которые специфически распознают и/или связываются с антигеном, связанным с, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака. Также представлены комбинации и готовые изделия, такие как наборы, которые содержат композицию, включающую Т-клеточную терапию, и/или композицию, содержащую ингибитор белков семейства BCL2, способствующих выживанию, и применения таких композиций и комбинаций для лечения или профилактики состояний или заболеваний, таких как рак, включая гематологические злокачественные образования.

В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение ингибитора (например, венетоклакса) до, одновременно с, во время, во время курса (включая однократно и/или периодически в течение курса) и/или после введения (например, начала введения) цитотоксической терапии, где терапия специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где ингибитор вводят по схеме дозирования, достаточной для достижения стационарной концентрации ингибитора в период времени примерно 7 дней до и примерно 14 дней после начала введения терапии, и/или где ингибитор вводят в период времени до того, как пиковый уровень терапии будет определяем в крови субъекта после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, стационарная концентрация относится к времени, в которое или в течение которого концентрация агента, такого как соединение, остается стабильной или постоянной у субъекта при продолжающемся лечении или дозировании. В некоторых вариантах осуществления, стационарная концентрация может включать или быть представлена концентрацией агента или соединения, достигающей плато при продолжении лечения или дозирования субъекта. В некоторых вариантах осуществления, стационарная концентрация может описывать состояние, в котором количество агента или соединения, вводимого при дозировании, эквивалентно количеству агента или соединения, покидающего тело субъекта между каждой дозой, т. е. скорость входа равна скорости выхода.

В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение ингибитора (например, венетоклакса) до, одновременно с, во время, во время курса (включая однократно и/или периодически в течение курса) и/или после введения (например, начала введения) цитотоксической терапии, где терапия специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где ингибитор вводят по схеме дозирования, достаточной для достижения стационарной концентрации ингибитора в течение примерно 7 дней до и примерно 14

дней после начала введения терапии.

В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение ингибитора (например, венетоклакса) до, одновременно с, во время, во время курса (включая однократно и/или периодически в течение курса) и/или после введения (например, начала введения) цитотоксической терапии, где терапия специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где ингибитор вводят за некоторое время до того, как пиковый уровень терапии будет определен в крови субъекта после введения терапии.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор (например, венетоклакс) достигает стационарной концентрации (C_{ss}), когда его вводят в течение примерно четырех периодов полужизни ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, «период полужизни» относится к количеству времени, которое требуется для уменьшения вдвое начальной концентрации агента или соединения в плазме/крови субъекта или начального общего количества агента или соединения в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достигает стационарной концентрации при ежедневном введении в течение примерно 2 дней, примерно 3 дней, примерно 4 дней или примерно 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достигает стационарной концентрации при ежедневном введении в течение примерно 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, стабильная концентрация достигается, когда концентрация ингибитора в плазме субъекта или общее количество ингибитора в организме субъекта является относительно стабильным при продолжении дозирования.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в виде единственного агента терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту в виде терапии одним агентом (например, монотерапии) в комбинации с цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, введение в виде монотерапии состоит только из одного типа лечения для лечения заболевания или состояния, если не указано иное. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, представлен в качестве монотерапии, так что не предусмотрено другого лечения для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, представлен в качестве монотерапии с иммунотерапией или клеточной терапией, так что не представлено никакого другого лечения для лечения заболевания или состояния, кроме предоставления (1) ингибитора и (2) иммунотерапии или клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или он не получал введение ритуксимаба и/или ибрутиниба одновременно с, во время или во время курса цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или он не получал введение ритуксимаба и/или ибрутиниба в течение примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является

адоптивная клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия является или содержит терапию инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапию трансгенным TCR или клеточную терапию, экспрессирующую рекомбинантный рецептор (необязательно Т-клеточную терапию), которая необязательно является клеточная терапия, экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, терапия таргетирует CD19 или является В-клеточной таргетной терапией. В некоторых вариантах осуществления, клетки и схемы дозирования для введения клеток могут включать любые, как описано в следующем подразделе В в разделе «Введение иммунотерапии или клеточной терапии».

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия способна опосредовать и/или индуцировать собственный митохондриально-опосредованный апоптотический путь клетки. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия способна опосредовать и/или индуцировать апоптотический путь клетки, опосредованный перфорином и/или гранзимом. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки резистентны к эндогенным путям апоптоза. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор сенсibiliзирует клетки к апоптозу через эндогенные пути апоптоза. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор сенсibiliзирует клетки к апоптозу, опосредованному или индуцированному цитотоксической терапией. В некотором смысле, ингибитор снижает апоптотическую резистентность клеток к цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксической терапией является адоптивная клеточная терапия (например, Т-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, адоптивная клеточная терапия содержит клетки, которые являются аутологичными к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые являются аутологичными к субъекту, сконструированы для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления, субъекту предоставляются аутологичные CAR-экспрессирующие Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая терапия, такая как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки) или Т-клеточная рекрутинговая терапия, и ингибитор представлены в виде фармацевтических композиций для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективные количества одного или обоих агентов для комбинированной терапии, *например*, Т-клетки для адоптивной клеточной терапии и ингибитор, как описано. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции содержат субтерапевтически эффективные количества одного или обоих агентов для комбинированной терапии, *например*, Т-клеток для адоптивной клеточной терапии и ингибитора, как описано. В некоторых вариантах осуществления, агенты составлены для введения в виде отдельных фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления, любая из представленных в настоящем документе фармацевтических композиций может быть составлена в виде дозированных форм,

подходящих для каждого пути введения.

В некоторых вариантах осуществления, комбинированную терапию, которая содержит введение цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, включающей сконструированные клетки, такой как CAR-Т-клеточная терапия) и ингибитора, вводят субъекту или пациенту, страдающему раком или подверженному риску рака. В некоторых аспектах, способы лечат, *например*, облегчают один или несколько симптомов заболевания или состояния, например, например, через уменьшение опухолевой массы при раке, экспрессирующем антиген, распознаваемый иммунотерапией или клеточной терапией, например, распознаваемый сконструированными Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние, которое лечат, может быть любым, при котором экспрессия антигена ассоциирована с и/или вовлечена в этиологию болезненного состояния или нарушения, такого как рак, *например*, вызывает, обостряет или иным образом участвует в таком заболевании, состоянии или нарушении. Примеры заболеваний и состояний могут включать заболевания или состояния, ассоциированные со злокачественными образованиями или трансформацией клеток (*например*, раком). Типовые антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, включают любой из антигенов, описанных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, экспрессируемый на сконструированных клетках комбинированной терапии, включая химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с раком.

В некоторых вариантах осуществления, антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, таким как рак, выбран из группы, состоящей из ROR1, антигена созревания В-клеток (BCMA), tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA, и поверхностного антигена гепатита В, антифолатного рецептора, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, 3 или 4, димеров erbB, EGFR vIII, FBP, FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетихолина, GD2, GD3, сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPCR5D), HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, молекулы L1-клеточной адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, преимущественно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, IL-13 рецептора а2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолиевой кислоты, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лиганды NKG2D, CD44v6, двойного антигена, и антигена, ассоциированного с универсальной меткой, раково-тестикулярного антигена, мезотелина, MUC1, MUC16, PSCA, лигандов NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, сопряженного с G-белком рецептора 5D (GPCR5D), онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простатспецифического антигена, PSMA, Her2/неу, рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, эфиринаB2, CD123, c-Met, GD-2,

О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138 и патоген-специфического антигена. В некоторых вариантах осуществления, антиген ассоциирован с универсальной меткой или является универсальной меткой.

В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является рак или пролиферативное заболевание. В некоторых вариантах осуществления, раком или пролиферативным заболеванием является опухоль, такая как солидная опухоль, лимфома, лейкоз, опухоль крови, метастатическая опухоль или другой рак или тип опухоли. В некоторых вариантах осуществления, раком является гематологическое злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, раком является В-клеточная злокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз или лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз, такой как хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), который может включать малую лимфоцитарную лимфому (SLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ALL). В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз, такой как острый миелогенный лейкоз (AML). В некоторых вариантах осуществления, раком является лейкоз, такой как хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ). В некоторых вариантах осуществления, раком является миелодиспластический синдром (MDS). В некоторых вариантах осуществления, раком является множественная миелома. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома, такая как неходжкинская лимфома (NHL). В некоторых вариантах осуществления, NHL является подтип NHL, такой как диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, NHL является подтип NHL, такой как SLL.

В некоторых вариантах осуществления, индикатор общего состояния Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) может использоваться для оценки или выбора субъектов для лечения, например субъектов, у которых были плохие результаты после предшествующих терапий (см., например, Oken et al. (1982) *Am J Clin Oncol.* 5:649-655). Шкала общего состояния ECOG описывает уровень функционирования пациента с точки зрения его способности заботиться о себе, повседневной активности и физических способностей (например, ходьба, работа и т. д.). В некоторых вариантах осуществления, общее состояние ECOG 0, указывает, что субъект может осуществлять нормальную активность. В некоторых аспектах, субъекты с общим состоянием ECOG 1 демонстрируют некоторые ограничения в физической активности, но субъект полностью амбулаторный. В некоторых аспектах, пациенты с общим состоянием ECOG 2 более чем на 50% амбулаторные. В некоторых случаях, субъект с общим состоянием ECOG 2 также может быть способен к самообслуживанию; см., например, Sørensen et al., (1993) *Br J*

Cancer 67(4) 773-775. Критерии, отражающие общее состояние ECOG, описаны в **Таблице 1** ниже:

Таблица 1. Критерии общего состояния ECOG	
Оценка	Общее состояние ECOG
0	Полностью активен, способен без ограничений выполнять все действия, предшествующие заболеванию
1	Ограничены физически напряженной деятельностью, но передвигаются амбулаторно и могут выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую домашнюю работу, работу в офисе.
2	Амбулаторный и способный к самообслуживанию, но неспособный выполнять какую-либо работу; находится на ногах примерно 50% времени бодрствования
3	Способен только к ограниченному самообслуживанию; прикован к постели или креслу более 50% времени бодрствования.
4	Полностью недееспособен; не может заниматься самообслуживанием; полностью прикован к кровати или креслу
5	Мертв

Антигены, таргетированные рецепторами (например, CAR), в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные со злокачественными образованиями В-клеток, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или содержит CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD19.

В частности, среди представленных вариантов осуществления, находятся способы лечения субъектов с CLL или SLL. В некоторых вариантах осуществления представленных способов, субъекты имеют высокую степень риска CLL или SLL. В некоторых вариантах осуществления представленных способов, субъекты имеют высокую степень риска CLL. В некоторых вариантах осуществления представленных способов, субъекты имеют высокую степень риска SLL. В некоторых вариантах осуществления, субъекты являются популяцией субъектов с высоким риском CLL (или SLL), получившими интенсивное предварительное лечение, все которые получали одну или несколько предшествующих терапий, включая ибрутиниб.

В некоторых вариантах осуществления, к субъектам с CLL относятся пациенты с диагнозом CLL с назначением лечения на основе инструкций International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) и поддающимся клиническому измерению заболеванием (поражение костного мозга лимфоцитами >30%, лимфоцитоз периферической крови >5×10⁹/л, и/или измеримые лимфатические узлы, и/или печень, или

спленомегалия). В некоторых вариантах осуществления, к субъектам с SLL относятся пациенты с диагнозом SLL на основании лимфаденопатии и/или спленомегалии и $<5 \times 10^9$ CD19+CD5+ клональных В-лимфоцитов/л [<5000 /мкл] в периферической крови при постановке диагноза поддающегося измерению заболевания, определяемого как, по меньшей мере, одно поражение $>1,5$ см в наибольшем поперечном диаметре, и которое является подтвержденным биопсией SLL.

В некоторых случаях, существующие стратегии лечения для субъектов высокого и очень высокого риска могут включать флударабин, циклофосфамид и ритуксимаб (FCR), ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК) (например, ибрутиниб) и/или трансплантацию аллогенных стволовых клеток. (Puiggros et al., BioMed Research International, Volume 2014 (2014), Article ID 435983). Многие из существующих способов лечения включают перорально-таргетные лекарственные средства которые имеют, для некоторых пациентов с CLL, улучшенные результаты лечения. Тем не менее, некоторые пациенты проявляют непереносимость или резистентность к терапии и/или не могут достичь полного ответа с неопределяемым MRD (uMRD). В некоторых аспектах, пациенты с прогрессирующим заболеванием после лечения доступными терапиями имеют плохие результаты. Например, в некоторых аспектах, пациенты, получившие лечение от CLL, показывают плохие долгосрочные результаты. Например, в некоторых случаях, рефракторные (R/R) субъекты с CLL высокого риска демонстрируют плохую выживаемость после прекращения приема ибрутиниба (Jain et al. (2015) Blood 125(13):2062-2067). Существует потребность в улучшенных способах лечения CLL, и, в некоторых аспектах, в способах, подходящих для лечения CLL с высоким и/или очень высоким риском, и/или субъектов, у которых возник рецидив или которые стали рефракторными к множеству предшествующих терапий.

Хронический лимфолейкоз (CLL) обычно является переменным заболеванием. Некоторые субъекты с CLL могут выжить без лечения, в то время как другим может потребоваться немедленное вмешательство. В некоторых случаях, субъекты с CLL могут быть классифицированы на группы, которые могут определять прогноз заболевания и/или рекомендованную стратегию лечения. В некоторых случаях, эти группы могут быть «низкого риска», «среднего риска», «высокого риска» и/или «очень высокого риска», и пациенты могут быть классифицированы как таковые в зависимости от ряда факторов, включающих, но не ограниченных ими, генетические аномалии и/или морфологические или физические характеристики. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, которых лечат в соответствии со способом, классифицируются или идентифицируются на основе риска CLL. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является пациент с CLL высокого риска.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы и применения обеспечивают или достигают улучшенных или более длительных ответов или эффективности по сравнению с определенными альтернативными способами, например, в определенных группах леченных субъектов, например, у пациентов с лейкозом, таким как CLL или SLL, в том числе с заболеваниями высокого риска. В некоторых вариантах

осуществления, способы являются предпочтительными благодаря применению Т-клеточной терапии, такой как композиция, включающая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки, например анти-CD19 CAR+ Т-клетки, и ингибитор белка BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакс). В некоторых вариантах осуществления, способы также включают, перед Т-клеточной терапией, противолимфомную терапию, например, такую как циклофосфамид, флударабин или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, к леченым субъектам относятся субъекты, у которых случился рецидив после начальной ремиссии на ибрутинибе, или которые являются рефракторными или не переносят лечение ибрутинибом. В конкретных вариантах осуществления, к леченым субъектам относятся субъекты, у которых произошел рецидив после ремиссии или которые являются рефракторными или не переносят одну или несколько дополнительных предшествующих терапий в дополнение к ибрутинибу, например, 1, 2, 3, 4, 5 или более предшествующих терапий. В некоторых вариантах осуществления, пациенты имеют рецидив или рефракторны к обеим схемам предшествующего лечения ибрутинибом и венетоклаксом. В некоторых вариантах осуществления, у субъектов, которые рефракторны к такому лечению, наблюдается прогрессирование после одной или нескольких предшествующих терапий. В некоторых вариантах осуществления, субъекты, получавшие лечение, включая тех, которые получали одну или несколько предшествующих терапий (например, ибрутиниб и/или венетоклакс), включают субъектов с цитогенетикой высокого риска, включая мутацию TP53, сложный кариотип (т.е., по меньшей мере, три хромосомных изменения) и del17(p).

В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, субъект страдает CLL или подозревается в наличии CLL; или субъект идентифицирован или выбран как имеющий CLL. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, субъект имеет CLL или подозревается в наличии CLL. В некоторых вариантах осуществления любого из представленных способов, субъект идентифицирован или выбран как страдающий CLL. В некоторых вариантах осуществления, CLL является рецидивирующим или рефракторным CLL. В частности, CLL обычно считается неизлечимым, и пациенты часто в конечном итоге рецидивируют или становятся невосприимчивыми к доступным терапиям (Dighiero и Hamblin (2008) *The Lancet*, 371:1017-1029).

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет SLL или подозревается в наличии SLL; или субъект идентифицирован или выбран как имеющий SLL. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет SLL или подозревается в SLL. В некоторых вариантах осуществления, субъект идентифицирован или выбран как имеющий SLL. В некоторых вариантах осуществления, SLL является рецидивирующим или рефракторным SLL.

В некоторых вариантах осуществления, перед введением дозы сконструированных Т-клеток субъекта лечили одной или несколькими предшествующими терапиями CLL или

SLL, отличными от терапии, например дозы клеток, экспрессирующих CAR, или противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, перед введением дозы сконструированных Т-клеток, субъекта лечили одним или несколькими предшествующими терапиями CLL, отличными от терапии, например дозы клеток, экспрессирующих CAR, или противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, до введения дозы сконструированных Т-клеток, субъекта лечили одним или несколькими предшествующими терапиями SLL, отличными от терапии, например дозы клеток, экспрессирующих CAR, или противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько предшествующих терапий включают, по меньшей мере, две предшествующие терапии, необязательно три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или более.

В некоторых вариантах осуществления, во время или непосредственно перед введением дозы клеток, субъект имеет рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, потерпел неудачу и/или не перенес лечение одной или несколькими предшествующими терапиями CLL. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, потерпел неудачу и/или не перенес лечение двумя или несколькими предшествующими терапиями. В некоторых вариантах осуществления, во время или непосредственно перед введением дозы клеток субъект имел рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, потерпел неудачу и/или не перенес лечение тремя или несколькими предшествующими терапиями. В некоторых вариантах осуществления, предшествующие терапии выбраны из ингибитора киназы, необязательно, ингибитора тирозинкиназы Брутона (ВТК), необязательно ибрутиниба; венетоклакса; комбинированной терапии, включающей флударабин и ритуксимаб; радиационной терапии; и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT). В некоторых вариантах осуществления, предшествующие терапии включают ибрутиниб и/или венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, предшествующие терапии включают ибрутиниб и венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, предшествующая терапия включает ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления, предшествующая терапия включает венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имел рецидив после ремиссии после лечения, стал рефракторным к неудачному лечению и/или не перенес ибрутиниб и/или венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, субъект имел рецидив после ремиссии после лечения, стал рефракторным к неудачному лечению и/или не перенес ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления, субъект имел рецидив после ремиссии после лечения, стал рефракторным к неудачному лечению и/или не перенес венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, субъект имел рецидив после ремиссии после лечения, стал рефракторным к лечению и/или не перенес ибрутиниб и венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта, которого ранее лечили ингибитором белка семейства Bcl-2, способствующим выживанию (например, венетоклаксом) до предложенных способов не было непереносимости к венетоклаксу. В

некоторых вариантах осуществления, субъекта лечили ингибитором белка семейства Bcl-2 способствующего выживанию (например, венетоклаксом) в течение 6 месяцев до применения предложенных способов, например, до получения противолимфомной терапии или до введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекта лечили ингибитором белка семейства Bcl-2 способствующего выживанию (например, венетоклаксом) в течение 6 месяцев до применения предложенных способов, и он не страдает прогрессирующим заболеванием (PD). В некоторых вариантах осуществления, субъект не проявлял прогрессирующее заболевание во время лечения ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, субъекта лечили ингибитором белка семейства Bcl-2, способствующего выживанию (например, венетоклаксом) в течение 6 месяцев до применения предложенных способов, и у него не было прогрессирования заболевания во время лечения ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта отсутствует непереносимость ингибитора (например, венетоклакса) сразу после сбора аутологичных клеток у субъекта и/или непосредственно перед введением субъекту противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта отсутствует непереносимость ингибитора (например, венетоклакса) во время начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта нет мутации в BCL2 сразу после сбора аутологичных клеток у субъекта и/или непосредственно перед введением субъекту противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта нет мутации в BCL2 на момент начала введения цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует поддающееся измерению заболевание или поддающееся оценке или измерению заболевание периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенки сразу после сбора аутологичных клеток у субъекта и/или непосредственно перед введением противолимфомной терапии субъекту. В некоторых вариантах осуществления, во время начала цитотоксической терапии субъект демонстрирует поддающееся измерению заболевание или поддающееся оценке или поддающееся измерению заболевание периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенки. В некоторых вариантах осуществления, поддающееся измерению заболевание является или включает лимфатические узлы с наибольшим поперечным диаметром (GTD) более 1,0 сантиметра. В некоторых вариантах осуществления, поддающееся измерению заболевание является или включает лимфатические узлы с наибольшим поперечным диаметром (GTD) более 1,5 сантиметров. В некоторых вариантах осуществления, поддающееся измерению заболевание является или включает лимфатические узлы более 2,0 сантиметров в наибольшем поперечном диаметре (GTD).

В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови, превышающее или равное 10^{-4} сразу после сбора аутологичных клеток у субъекта и/или непосредственно перед введением субъекту противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления,

во время начала цитотоксической терапии, субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови, превышающее или равное 10^{-4} .

В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует поддающееся измерению заболевание или поддающееся оценке или измерению заболевание периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенки и минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови, превышающее или равное 10^{-4} сразу после сбора аутологических клеток у субъекта и/или непосредственно перед введением субъекту противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, во время начала введения цитотоксической терапии субъект демонстрирует поддающееся измерению заболевание или поддающееся оценке или измерению заболевание периферической крови (PB), костного мозга (BM), печени или селезенки и минимальное остаточное заболевание (MRD) в периферической крови большее или равное 10^{-4} . В некоторых вариантах осуществления, поддающееся измерению заболевание является или содержит лимфатические узлы с наибольшим поперечным диаметром (GTD) более 1,0 сантиметра. В некоторых вариантах осуществления, поддающееся измерению заболевание является или содержит лимфатические узлы с наибольшим поперечным диаметром (GTD) более 1,5 сантиметров. В некоторых вариантах осуществления, поддающееся измерению заболевание является или содержит лимфатические узлы с наибольшим поперечным диаметром (GTD) более 2,0 сантиметров.

В некоторых вариантах осуществления, во время или до введения дозы клеток: субъект имеет или был идентифицирован как имеющий одну или несколько цитогенетических аномалий, необязательно связанных с CLL высокого риска, необязательно выбранных из: сложного кариотипа или цитогенетических аномалий, del 17p, не мутантного гена IGVH и мутации TP53; субъект имеет или был идентифицирован как страдающий CLL высокого риска. В некоторых вариантах осуществления, во время или до начала введения цитотоксической терапии, него субъект имеет или был идентифицирован как имеющий одну или несколько цитогенетических аномалий. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько цитогенетических аномалий ассоциированы с CLL высокого риска. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько цитогенетических аномалий выбирают из сложного кариотипа или цитогенетических аномалий, del 17p, не мутантного гена IGVH и мутации TP53. В некоторых вариантах осуществления, во время или до начала введения цитотоксической терапии, субъект имеет или был идентифицирован как страдающий CLL высокого риска.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или был идентифицирован как имеющий статус ECOG 0 или 1; и/или субъект не имеет статус ECOG >1. В некоторых вариантах осуществления, во время или непосредственно перед введением дозы сконструированных клеток или противолимфомной терапии у субъекта нет трансформации Рихтера CLL или SLL.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, страдающего лимфомой или лейкозом, или В-клеточной злокачественной опухолью,

такой как В-крупноклеточная лимфома или неходжкинская лимфома (NHL).

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают лечение конкретной группы или подгруппы субъектов, например субъектов, идентифицированных как имеющие заболевание высокого риска, например NHL высокого риска или В-крупноклеточную лимфому высокого риска. В некоторых аспектах, способы лечат субъектов, имеющих форму В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL) агрессивной и/или с плохим прогнозом, такую как NHL, которая имеет рецидив или является рефракторной (R/R) к стандартной терапии и/или имеет плохой прогноз.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет В-клеточную злокачественную опухоль, такую как В-клеточная лимфома и/или неходжкинская лимфома (NHL). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет В-клеточную злокачественную опухоль, такую как В-крупноклеточная лимфома, например, рецидивирующая/рефракторная (P/P) В-крупноклеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет В-крупноклеточную лимфому, такая как диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL) (например, DLBCL, не определенная иным образом (NOS; *de novo* или трансформированная из вялотекущей) или другой DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет первичную В-клеточную лимфому средостения (PMBCL) или фолликулярную лимфому, такую как фолликулярная лимфома 3В степени (FL3В). В некоторых аспектах В-клеточная лимфома является или включает диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому или РВМСL. В некоторых аспектах, субъект имеет DLBCL, которой является DLBCL, не определенная иначе (NOS). В некоторых вариантах осуществления, лимфомой, такой как DLBCL, является *de novo*. В некоторых вариантах осуществления, лимфома, такая как DLBCL, трансформирована из другой вялотекущей лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, лимфома, такая как DLBCL, трансформирована из фолликулярной лимфомы (tFL).

В некоторых вариантах осуществления, способы включают лечение субъекта, который имеет показатель общего состояния по Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 0-1 или 0-2. В некоторых вариантах осуществления, субъекты имеют оценку Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) от 0 до 2. В некоторых вариантах осуществления, субъекты не исключаются на основании оценки ECOG, равной 2. В некоторых вариантах осуществления, способы лечат популяцию с плохим прогнозом или пациентов с DLBCL или субъектов, которые, как правило, плохо отвечают на терапии или конкретные эталонные терапии, например, субъектов, имеющих одну или несколько, например, две или три, хромосомных транслокации (например, так называемую «двойную» или «тройную» лимфому; имеющую транслокации локусов MYC/8q24, обычно в сочетании с геном t(14;18) (q32;q21) bcl-2 или/и хромосомной транслокацией BCL6/3q27; см., например, Xu et al. (2013) *Int J Clin Exp Pathol.* 6(4): 788-794), и/или пациента с рецидивом, например, рецидивом в течение 12 месяцев после введения аутологичного трансплантата стволовых клеток (ASCT), и/или пациента, который был

признан хеморефракторным.

В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили терапией или терапевтическим агентом, таргетирующим заболевание или состояние, например В-крупноклеточную лимфому или NHL, до введения терапии, например, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), например, аллогенной HSCT или аутогенной HSCT. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта был плохой прогноз после лечения стандартной терапией и/или не удалось одно или несколько направлений предыдущей терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекта лечили или он ранее получал, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или примерно 1, 2, 3 или 4 другие терапии для лечения заболевания или нарушения, такого как В-крупноклеточная лимфома или NHL, отличные от противолимфомной терапии и/или терапии, например, дозой клеток, экспрессирующих антигенный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, субъекта лечили или он ранее получал терапию, которая включает антрациклин, CD20-таргетный агент и/или ибрутиниб.

В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее лечили химиотерапией или радиационной терапией. В некоторых аспектах, субъект является рефракторным или невосприимчивым к другой терапии или терапевтическому агенту. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает хроническим или рецидивирующим заболеванием, например, после лечения другой терапией или терапевтического вмешательства, включая химиотерапию или радиацию.

В некоторых вариантах осуществления, субъектом является такой, который соответствует критериям трансплантации, например, соответствует критериям трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), *например*, аллогенной HSCT. В некоторых таких вариантах осуществления, субъект ранее не получал трансплантат, несмотря на соответствие критериям, до введения терапии, такой как клеточная терапия, содержащая сконструированные клетки (например, CAR-T-клетки) или композиция, содержащая клетки, субъекту, как представлено в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления, субъект ранее перенес трансплантацию аллогенных стволовых клеток (SCT). В некоторых таких вариантах осуществления, субъект ранее не подвергался трансплантации аллогенных стволовых клеток (SCT). В некоторых вариантах осуществления, субъекта ранее не исключали на основании предшествующей трансплантации аллогенных стволовых клеток (SCT).

В некоторых вариантах осуществления, субъектом является такой, который не соответствует критериям трансплантации, например, не соответствует критериям трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), *например*, аллогенной HSCT.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет лимфому, которая ассоциирована с или включает вовлечение центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет лимфому, ассоциированную с или

включающую вовлечение центральной нервной системы (ЦНС), и субъекта ранее лечили противосудорожным средством, таким как леветирацетам. В некоторых вариантах осуществления, субъекты не исключаются на основании вторичного вовлечения центральной нервной системы (ЦНС).

В некоторых вариантах осуществления, от субъектов не требуется минимальное абсолютное количество лимфоцитов (ALC) для афереза.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение клеток субъекту, выбранному или идентифицированному как имеющий В-крупноклеточную лимфому высокого риска или NHL высокого риска. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует одну или несколько цитогенетических аномалий, например, ассоциированных со злокачественными образованиями В-клеток, такими как В-клеточная лимфома высокого риска или NHL высокого риска. В некоторых вариантах осуществления, субъект выбирается или идентифицируется на основании наличия заболевания или состояния, характеризуемого или определяемого как агрессивная NHL, диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), первичная В-крупноклеточная лимфома средостения (PMBCL), насыщенная Т-клетками/гистоцитами В-крупноклеточная лимфома (TCHRBCL), лимфома Беркитта (BL), мантийноклеточная лимфома (MCL) и/или фолликулярная лимфома (FL). В конкретных вариантах осуществления, субъект, которого лечат с использованием способов, представленных в настоящем документе, включает субъектов с агрессивной В-крупноклеточной лимфомой или агрессивной NHL, в частности, с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL), не определенной другим образом (NOS; de novo или трансформированной из вялотекущей), первичной В-клеточной лимфомой средостения (PMBCL) или фолликулярной лимфомой 3В степени (FL3В). В конкретных вариантах осуществления, субъект, которого лечат с использованием способов, представленных в настоящем документе, включает субъектов с DLBCL, трансформированной из фолликулярной лимфомы (FL) или другой вялотекущей лимфомы. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет DLBCL, трансформированную из лимфомы маргинальной зоны (MZL) или хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (например, болезни Рихтера). В некоторых вариантах осуществления, субъект с трансформацией из CLL может демонстрировать синдром Рихтера (RS), определяемый как трансформация CLL в агрессивную лимфому, чаще всего диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) (см., например, Parikh et al. Blood 2014 123:1647-1657). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет мантийноклеточную лимфому (MCL). В некоторых вариантах осуществления, субъекты имеют мантийноклеточную лимфому (MCL), которая оказалась неэффективной (рецидивирующей/рефракторной, R/R) после ≥ 1 предшествующих линий терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет подтвержденную MCL, экспрессирующую циклин D1 с R/R заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет плохой показатель общего состояния. В некоторых аспектах, популяция, подлежащая лечению, включает субъектов,

имеющих показатель общего состояния Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), который находится в пределах от 0 до 2. В других аспектах любого из вариантов осуществления, субъекты, подлежащие лечению, включают ECOG 0-1 или не включают ECOG 2 субъектов. В некоторых аспектах любого из вариантов осуществления, пациенты, которых лечат, потерпели неудачу при двух или нескольких предшествующих терапиях. В некоторых вариантах осуществления, субъект не имеет DLBCL, трансформированную из лимфомы маргинальной зоны (MZL) или хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (например, болезни Рихтера). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет особенности, которые коррелируют с плохой общей выживаемостью. В некоторых вариантах осуществления, субъект никогда не достигал полного ответа (CR), никогда не получал трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT), является рефракторным к 1 или нескольким терапиям второй линии, имеет первичное рефракторное заболевание и/или имеет показатель общего состояния ECOG 2 или оценку ECOG от 0 до 1.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, подлежащий лечению, включает группу субъектов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL), de novo или трансформированной из вялотекущей лимфомы (не определенной другим образом, NOS), первичной В-крупноклеточной лимфомой средостения (PMBCL) и фолликулярной лимфомой степени 3b (FL3B) после неудачного лечения 2 линиями терапии, и оценкой ECOG 0-2. В некоторых вариантах осуществления, и субъект необязательно может быть ранее лечен трансплантацией аллогенных стволовых клеток (SCT). В некоторых вариантах осуществления, субъект, подлежащий лечению, включает группу субъектов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (DLBCL), de novo или трансформированной из вялотекущей лимфомы (не определенной другим образом, NOS), первичной В-крупноклеточной лимфомы средостения (PMBCL) и фолликулярной лимфомы 3b степени (FL3B) после неудачного лечения 2 линиями терапии, и оценкой ECOG 0-2. В некоторых вариантах осуществления, субъект необязательно может ранее лечиться трансплантацией аллогенных стволовых клеток (SCT). В некоторых вариантах осуществления, субъекта не выбирают для лечения или исключают из лечения, если субъект имеет плохой показатель общего состояния (например, ECOG 2) и/или имеет DLBCL, трансформированную из лимфомы маргинальной зоны (MZL) или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL, болезнь Рихтера). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, субъекта выбирают для лечения, если у субъекта имеется диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), de novo или трансформированная из вялотекущей лимфомы (NOS), первичная В-крупноклеточная лимфома средостения (PMBCL) и фолликулярная лимфома степени 3b (FL3B) после неудачного лечения 2 линиями терапии и оценкой ECOG 0 или 1, и субъекта, возможно, ранее лечили с помощью трансплантации аллогенных стволовых клеток (SCT), но у него нет DLBCL, трансформированной из лимфомы маргинальной зоны (MZL) или хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL, болезни Рихтера).

В некоторых вариантах осуществления, рак характеризуется сверхэкспрессией или

аберрантной экспрессией одного или нескольких белков семейства BCL2, способствующих выживанию. В некоторых вариантах, осуществления, рак характеризуется сверхэкспрессией или аберрантной экспрессией BCL2. В некоторых случаях, сверхэкспрессия BCL2 может быть вызвана (14;18)(q32;q21) транслокацией. В некоторых случаях, сверхэкспрессия BCL2 может быть вызвана амплификацией гена, кодирующего белок BCL2. В некоторых вариантах осуществления, рак характеризуется сверхэкспрессией или аберрантной экспрессией BCLXL, MCL1 и/или BFL1. В некоторых вариантах осуществления, рак характеризуется мутацией в одном или нескольких генах, кодирующих белок семейства BCL2, способствующий выживанию. В некоторых вариантах осуществления, рак характеризуется мутацией в гене, кодирующем белок BCL2. В некоторых случаях, мутацией является (14;18)(q32;q21) транслокация. В некоторых вариантах осуществления, рак является резистентным к лечению иммунотерапией или клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, рак является резистентным к лечению клеточной терапией, такой как Т-клеточная терапия, экспрессирующая CAR. В некоторых вариантах осуществления, рак является резистентным к лечению CD19-таргетной CAR-Т-клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор сенсibiliзирует рак к лечению иммунотерапией или клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор сенсibiliзирует рак к лечению клеточной терапией, такой как Т-клеточная терапия, экспрессирующая CAR. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор сенсibiliзируют рак к лечению с помощью CD19-таргетной CAR-Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, раком или пролиферативным заболеванием является не гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является солидный рак или опухоль. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак мозга. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак прямой кишки. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак головы и/или шеи. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак легких. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак яичников. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак почек. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак кожи.

В некоторых вариантах осуществления, комбинированную терапию, представленную в настоящем документе, проводят у субъекта, который ранее получал лечение ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например ингибитором BCL2, таким как венетоклак, но в отсутствие терапии Т-клетками. (например, CAR+ Т-клетками) или Т-клеточной рекрутинговой терапией. В некоторых случаях, после такого предыдущего лечения субъект является рефракторным к и/или

развивает резистентность, рецидивирует после ремиссии, не достигает полного ответа после получения такого предыдущего лечения в течение, по меньшей мере, 6 месяцев и/или проявляет агрессивное заболевание и/или признаки рака с высоким риском. Таким образом, понятно, что представленная комбинированная терапия может быть проведена у субъекта, который ранее получал введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например ингибитора BCL2, такого как венетоклакс. Ссылка на время введения ингибитора в настоящем описании относится к времени его введения относительно иммунотерапии или иммунотерапевтического агента, например Т-клеточной терапии (например, CAR+ Т-клеток) или Т-клеточной рекрутинговой терапии, в соответствии с представленными способами комбинированной терапии, и не исключает возможности того, что субъекту дополнительно ранее вводили ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например ингибитор BCL2, такой как венетоклакс.

Для профилактики или лечения заболевания, подходящая доза ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, и/или иммунотерапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки) или Т-клеточная рекрутинговая терапия, может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, конкретного ингибитора, клеток и/или рекомбинантных рецепторов, экспрессированных на клетках, тяжести и течения заболевания, способа введения, того, вводится ли ингибитор и/или иммунотерапия, *например*, Т-клеточная терапия в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, частоты введения, истории болезни субъекта и ответа на клетки, и суждения лечащего врача. Композиции и клетки в некоторых вариантах осуществления подходящим образом вводят субъекту однократно или в течение ряда курсов лечения. Описаны типовые схемы дозирования и схемы для представленной комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапию, *например*, Т-клеточную терапию, и ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, вводят как часть дополнительного комбинированного лечения, которое можно вводить одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством. В некоторых контекстах, иммунотерапия, *например*, сконструированные Т-клетки, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки, вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что иммунотерапия усиливает эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят до одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапию, *например*, сконструированные Т-клетки, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки, вводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, способы комбинированной терапии дополнительно включают противолимфомную терапию, такую как введение химиотерапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия дополнительно включает введение другого терапевтического агента, такого как противораковый агент,

ингибитор контрольной точки или другой иммуномодулирующий агент. Применения включают применения комбинированной терапии в таких способах и лечениях, и применения таких композиций при приготовлении лекарственного средства для проведения таких способов комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы и применения, таким образом, лечат заболевание, состояние или нарушение, такое как рак или пролиферативное заболевание, у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапию, *например*, Т-клеточную терапию, и ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, вводят без какого-либо другого комбинированного лечения. В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапию, *например*, Т-клеточную терапию, и ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, вводят без какого-либо другого комбинированного лечения, такого как ибрутиниб и/или ритуксимаб.

До, во время или после введения иммунотерапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия) и/или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, биологическую активность иммунотерапии, *например*, биологическую активность сконструированных клеточных популяций в некоторых вариантах осуществления измеряют, *например*, любым из ряда известных способов. Параметры для оценки включают способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени, жизнестойкость и другие показатели активности Т-клеток, например, измеренные с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, такого как анализы, описанные ниже в разделе III ниже. В некоторых вариантах осуществления, биологическую активность клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток, измеряют путем анализа уничтожения цитотоксических клеток, экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, пролиферации или размножения, например, при повторной стимуляции с антигеном. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют путем оценки бремени заболевания и/или клинического исхода, такого как уменьшение массы опухоли или нагрузки. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют путем оценки наличия нейтропении у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, введение одного или обоих агентов комбинированной терапии и/или любое повторное введение терапии может быть определено на основании результатов анализов до, во время, во время курса или после введения одного или обоих агентов комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, комбинированный эффект ингибитора в комбинации с клеточной терапией может быть синергетическим по сравнению с лечением, включающим только ингибитор, или монотерапией с клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, комбинированный эффект субтерапевтически эффективного количества ингибитора в комбинации с клеточной терапией может быть синергическим по сравнению с лечением, включающим только ингибитор, или монотерапией клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, комбинированный эффект субтерапевтически эффективного количества ингибитора в

комбинации с субтерапевтически эффективным количеством клеточной терапии может быть синергическим по сравнению с лечением, включающим только ингибитор, или монотерапией клеточной терапией. Например, в некоторых вариантах осуществления, представленные в настоящем документе способы, композиции и готовые изделия приводят к увеличению или улучшению желаемого терапевтического эффекта, например усилению или улучшению уменьшения или ингибирования одного или нескольких симптомов, связанных с раком.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор увеличивает размножение, пролиферацию или цитотоксичность сконструированных Т-клеток, таких как CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, увеличение размножения, пролиферации или цитотоксичности наблюдается *in vivo* при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления, увеличение количества сконструированных Т-клеток, например CAR-Т-клеток, увеличивается более чем или более чем примерно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз или более. В некоторых вариантах осуществления, повышение цитотоксичности сконструированных Т-клеток, например CAR-Т-клеток, против раковых клеток увеличивается более чем или более чем примерно в 1,2 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз, 8,0 раз, 9,0 раз, 10,0 раз или более.

А. ВВЕДЕНИЕ ИНГИБИТОРА БЕЛКА СЕМЕЙСТВА BCL2, СПОСОБСТВУЮЩЕГО ВЫЖИВАНИЮ

Представленные способы комбинированной терапии, комбинации, наборы и применения включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакса), который можно вводить до, после, во время, одновременно или почти одновременно, последовательно и/или периодически с введением иммунотерапии или клеточной терапии, *например*, введением Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или введение которых может начинаться до введения Т-клеточной терапии и продолжаться до начала введения Т-клеточной терапии или после начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, белком семейства BCL2, способствующим выживанию, является белок семейства BCL2, который обладает способностью способствовать выживанию и/или ослаблять про-апоптотическую передачу сигналов. В некоторых вариантах осуществления, белком семейства BCL2, способствующим выживанию, является белок семейства BCL2, который является анти-апоптотическим. В некоторых вариантах осуществления, белком семейства BCL2, способствующим выживанию, является белок семейства BCL2, который обладает способностью способствовать выживанию раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления, белком семейства BCL2, способствующим выживанию, является белок семейства BCL2, который обладает способностью подавлять про-апоптотическую передачу сигналов раковых клеток.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором в комбинированной терапии является ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например,

венетоклакс), который в некоторых случаях, участвует в регуляции и распространении анти-апоптотической (способствующей выживанию) передачи сигналов в клетке, например, через внутренний путь апоптоза клетки. В некоторых случаях, белки семейства BCL2, обеспечивающие выживание, участвуют в передаче апоптотических сигналов, включая передачу анти-апоптотических (способствующих выживанию) сигналов через внутренний путь апоптоза клетки через митохондрии. В некоторых случаях, белки семейства BCL2, обеспечивающие выживание, участвуют в анти-апоптотической (способствующей выживанию) передаче сигналов через опосредованный гранзимом и/или перфорином апоптоз в митохондриях. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклаксом) является ингибитор одного или нескольких белков семейства BCL2, способствующих выживанию, включая BCL2, В-экстракрупноклеточную лимфому (BCLXL), белок A1, родственник BCL2 (BFL1), BCL2-подобный белок 2 (BCLW), BCL2-подобный белок 10 (BCLB) и белок, индуцированный дифференциацией клеток миелоидного лейкоза (MCL1).

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор (например, венетоклакс) взаимодействует с доменом гомологии BCL2 (BH). В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является миметик BH3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является миметик BH3, который занимает BH3-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является миметик BH3, который занимает BH3-связывающий домен и/или вытесняет про-апоптотические белки BH3 из BCL2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор блокирует или снижает взаимодействие между BCL2 и белками, имеющими домен BH3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор занимает BH3-связывающий домен, чтобы заблокировать или снижать гетеродимеризацию белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как BCL2 или BCLXL, с про-апоптотическим белком семейства BCL2, таким как BAD, BAX или BAK. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор снижает или блокирует фосфорилирование BCL2.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор (например, венетоклакс) снижает передачу сигналов, способствующих выживанию (анти-апоптотических). В некоторых случаях, снижение передачи сигналов, способствующих выживанию, снижает апоптотический порог клетки. В некоторых случаях, апоптоз достигается внутренним, митохондриально-опосредованным путем апоптоза. В некоторых случаях, снижение передачи сигналов, способствующих выживанию, и/или снижение порога апоптоза сенсibiliзирует клетку к гибели клеток и/или увеличивает гибель клеток. В некоторых случаях, снижение передачи сигналов, способствующих выживанию, и/или снижение апоптотического порога сенсibiliзирует клетку к гибели клеток от одного или нескольких других агентов и/или увеличивает гибель клеток от одного или нескольких других агентов. В некоторых случаях, снижение передачи сигналов, способствующих выживанию, и/или снижение порога апоптоза достигается за счет индукции BAX и/или

ВАК-зависимого апоптоза. В некоторых случаях, снижение передачи сигналов, способствующих выживанию, и/или снижение апоптотического порога сенсibiliзирует клетку к гибели клеток с помощью цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия или клеточная терапия (например, Т-клеточная терапия, экспрессирующая CAR). В некоторых случаях, снижение передачи сигналов, способствующих выживанию, и/или снижение апоптотического порога сенсibiliзирует клетку к путям гибели клеток, таргетируемым CAR Т-клетками, включая опосредованные перфорином и гранзимом пути (Benmabarek et al. (2019) *Intl. J. Mol. Sci.* (20):1283).

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакс) является селективным ингибитором BCL2. В некоторых вариантах осуществления, селективным ингибитором BCL2 является соединение или агент, такой как ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, который может быть предоставлен по схеме дозирования (например, доза и/или продолжительность), которая снижает или блокирует активность BCL2 и/или передачу сигналов в большей степени, чем у других белков семейства BCL2, способствующих выживанию (например, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1). В некоторых случаях, селективный ингибитор BCL2 снижает или блокирует активность передачи сигналов и/или активности BCL2, когда предоставляется по схеме дозирования, но не снижает или не блокирует передачу сигналов и/или активность других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, когда предоставляется по той же схеме дозирования. В некоторых случаях, селективные ингибиторы BCL2 оказывают минимальное или не оказывают никакого воздействия на активность и/или передачу сигналов других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, при условии их введения по схеме дозирования.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, является не селективный ингибитор BCL2. В некоторых вариантах осуществления, не селективным ингибитором BCL2 является соединение или агент, такой как ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, который снижает или блокирует активность более чем одного белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых случаях, неселективным ингибитором BCL2 является соединение или агент, такой как ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, который может быть предоставлен по схеме дозирования (например, доза и/или продолжительность), которая снижает или блокирует активность и/или передачу сигналов белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например BCL2, и дополнительно снижает или блокирует активность и/или передачу сигналов одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию (например, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1). В некоторых случаях, не селективный ингибитор BCL2 снижает или блокирует активность и/или передачу сигналов белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, BCL2), при введении по схеме дозирования, и также снижает или блокирует передачу сигналов и/или активность одного

примерно 0,01 нМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 10 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора один или несколько других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 0,1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора для одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 1,0 нМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 0,1 нМ. В некоторых вариантах осуществления, константа ингибирования (K_i) ингибитора одного или нескольких других белков семейства BCL2, способствующих выживанию, таких как BCLXL, BCLW, BCLB и/или MCL1, составляет менее примерно 0,01 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, IC_{50} , K_d и/или K_i измеряют или определяют с помощью анализа *in vitro*. Анализы для оценки или количественного определения или измерения активности ингибиторов протеинтирозинкиназы, как описано, известны в данной области техники. Такие анализы можно проводить *in vitro*, и они включают анализы для оценки способности агента ингибировать конкретную биологическую или биохимическую функцию. В некоторых вариантах осуществления, могут быть выполнены исследования активности киназы. Белковые тирозинкиназы катализируют перенос концевой фосфатной группы от аденозинтрифосфата (АТФ) к гидроксильной группе тирозинового остатка самой киназы или другого белкового субстрата. В некоторых вариантах осуществления, киназная активность может быть измерена путем инкубации киназы с субстратом (например, ингибитором) в присутствии АТФ. В некоторых вариантах осуществления, измерение фосфорилированного субстрата конкретной киназой можно оценивать с помощью нескольких репортерных систем, включая колориметрическое, радиоактивное и флуориметрическое определение. (Johnson, S.A. & T. Hunter (2005) *Nat. Methods* 2:17.) В некоторых вариантах осуществления, ингибиторы можно оценить на предмет их аффинности к конкретной киназе или киназам, например, с помощью анализов конкурентного связывания лиганда (Ma et al., *Expert Opin Drug Discov.* 2008 Jun; 3(6):607-621) Из этих анализов можно рассчитать полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC_{50}). IC_{50} является это

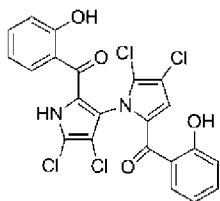
концентрацией, которая снижает биологический или биохимический ответ или функцию на 50% от максимума. В некоторых случаях, например, в исследованиях активности киназы, IC_{50} является концентрацию соединения, которая требуется для подавления активности целевой киназы на 50%. В некоторых случаях, константа диссоциации (K_d) и/или константа ингибирования (значения K_i) могут быть определены дополнительно или альтернативно. IC_{50} и K_d можно рассчитать любым количеством способов, известных в данной области техники. Константа ингибирования (значения K_i) может быть рассчитана из значений IC_{50} и K_d в соответствии с уравнением Ченга-Пруссоффа: $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$, где L является концентрацией ингибитора (Biochem Pharmacol 22: 3099-3108, 1973). K_i является концентрацией не меченого ингибитора, которая может вызвать заполнение 50% присутствующих сайтов связывания, в отсутствие лиганда или других конкурентов.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является малая молекула.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитором является ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые описаны в патенте США № 9,174,982, патенте США № 8,546,399, патенте США № 7,030,115, патенте США № 7,390,799, патенте США № 7,709,467, патенте США № 8,624,027, патенте США № 7,906,505, патенте США № 6,720,338, опубликованной заявке PCT WO 13/096060, опубликованной заявке PCT WO 02/097053, опубликованной заявке США US 2016/0220573, патенте США № 7,354,928, опубликованной заявке США 2015/0056186 и опубликованной заявке PCT WO 05/049594, каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует MCL1, такой как маритоклакс. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует BCL2, BCLXL и BCLW, такой как навитоклакс. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует BCL2, такой как венетоклакс.

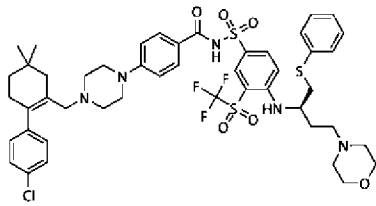
В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует или снижает активность BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, BFL1 и/или MCL1. В некоторых случаях, ингибитор ингибирует или снижает активность MCL1, например маритоклакс. В некоторых случаях, ингибитор индуцирует протеасомную деградацию MCL1. В некоторых случаях, ингибитор вызывает накопление MCL1. В некоторых случаях, ингибитором является маритоклакс. В некоторых случаях, ингибитор имеет структуру



или ее фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемические смеси, включая их композиции.

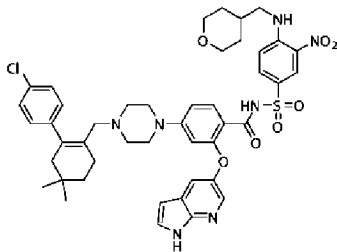
В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует или снижает активность BCL2, BCLXL и BCLW, такой как навитоклакс. В некоторых случаях

ингибитором является навитоклак. В некоторых случаях, ингибитор имеет структуру



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемические смеси, включая их композиции, для лечения субъектов с раком.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор ингибирует или снижает активность BCL2, такой как венетоклак. В некоторых случаях ингибитором является венетоклак. В некоторых случаях ингибитор имеет структуру



или их фармацевтически приемлемую соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемические смеси, включая их композиции.

Типовые ингибиторы белка семейства BCL2, способствующего выживанию включают, но не ограничиваются ими, венетоклак (ABT-199), навитоклак (ABT-263), ABT-737, AT-101/GDC-0199 (Госсипол), апогоссипол, TW-37, G3139 (Генасенс), GX15-070 (обатоклак), сабутоклак, HA14-1, антимицин А, ВН3I-1, YC137, маритоклак (маринопирирол А), клитоцин, UMI-77, WENI-539 и 544563.

1. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

В некоторых вариантах осуществления способов комбинированной терапии, комбинаций, наборов и применений, представленных в настоящем документе, комбинированная терапия может вводиться в одной или нескольких композициях, *например*, фармацевтической композиции, содержащей ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, *например*, ингибитор BCL2, и/или в виде цитотоксической терапии, *например*, Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, композиция, *например*, фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклак, может включать носители, такие как разбавитель, адъювант, эксципиент или носитель, с которыми вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклак, и/или клетки. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» by E. W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество ингибитора белка

семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс, обычно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для правильного введения пациенту. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, особенно для растворов для инъекций. Фармацевтические композиции могут содержать один или несколько из разбавителей, адьювантов, антиадгезивов, связующих агентов, покрытий, наполнителей, ароматизаторов, красителей, смазывающих агентов, глидантов, консервантов, моющих средств, сорбентов, эмульгирующих агентов, фармацевтических наполнителей, буферных агентов pH или подсластителей, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может быть жидкой, твердой, лиофилизированным порошком, гелем и/или их комбинацией. В некоторых аспектах, выбор носителя частично определяется конкретным ингибитором и/или способом введения.

Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничены ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (*например*, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG), стабилизаторы и/или консерванты. Композиции, содержащие ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклакс, также можно лиофилизировать.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции могут быть составлены для введения любым путем, известным специалистам в данной области, включая внутримышечную, внутривенную, внутрикожную, внутриочаговую, внутрибрюшинную инъекцию, подкожное, внутриопухолевое, эпидуральное, назальное, пероральное, вагинальное, ректальное, местное, локальное, ушное, ингаляционное, буккальное (*например*, сублингвальное) и трансдермальное введение или любой путь. В

некоторых вариантах осуществления, также рассматриваются другие способы введения. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляется болюсной инфузией, инъекцией, *например*, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перibuльбарной инъекцией или тыльной окологсклеральной доставкой. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляется парентерально, внутрилегочно и интраназально, и, если желательно для местного лечения, внутриочаговым введением. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриаартериальное, внутривентральное или подкожное введение.

В некоторых вариантах осуществления, композиции также можно вводить с другими биологически активными агентами последовательно, периодически или в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления, введение также может включать системы с контролируемым высвобождением, включая составы с контролируемым высвобождением и устройство с контролируемым высвобождением, например, с помощью насоса. В некоторых вариантах осуществления, введение является пероральным.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклак, обычно составляют и вводят в виде единичных дозированных форм или множественных дозированных форм. Каждая стандартная доза содержит заранее определенное количество терапевтически активного ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем, наполнителем или разбавителем. В некоторых вариантах осуществления, стандартные дозированные формы включают, но не ограничиваются ими, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии, а также пероральные растворы или суспензии, а также масляные водные эмульсии, содержащие подходящие количества ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. Стандартные дозированные формы могут включать ампулы и шприцы или индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Стандартные дозированные формы можно вводить дробно или кратно. В некоторых вариантах осуществления, формой множественной дозы является множество идентичных стандартных дозированных форм, упакованных в один контейнер, для введения в отдельной единичной дозированной форме. Примеры форм с множественными дозами включают флаконы, бутылки с таблетками или капсулами или бутылки с пинтами или галлонами.

2. ДОЗИРОВАНИЕ

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемый способ комбинированной терапии включает введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, и цитотоксическую терапию, такую как иммунотерапия или клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки).

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, до, после, во время, во время курса, одновременно, почти одновременно, последовательно, одновременно и/или периодически с началом цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, представленные варианты включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклакса, до введения терапии и продолжают до начала введения терапии или после начала проведения терапии. В некоторых вариантах осуществления, «одновременно» означает, что введение ингибитора и введение цитотоксической терапии в комбинированной терапии перекрывают друг друга, в том смысле, что, по меньшей мере, одна доза ингибитора перекрывается с одной дозой цитотоксической терапии, и/или что начало введения ингибитора происходит в одно и то же время (*например*, в тот же день и/или одновременно) с началом введения цитотоксической терапии, и/или что введение ингибитора и начало цитотоксической терапии находятся в пределах от примерно трех до примерно четырех периодов полужизни ингибитора (*например*, от 2 до 5 дней). В некоторых вариантах осуществления, «одновременно» относится к схемам введения, при которых ингибитор присутствует у субъекта в стационарной концентрации (C_{ss}) в то же время, когда цитотоксическая терапия была введена субъекту, но еще не достигла пикового увеличения.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, в период времени примерно 7 дней до или примерно 14 дней после начала цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, в период времени между примерно 3 днями до или примерно 14 днями после начала цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, в период времени от примерно 1 дня до или примерно 14 дней после начала цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия

(например, CAR-экспрессирующие Т-клетки).

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемые способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, в период времени от примерно 1 дня до или примерно 8 дней после начала цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки).

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, одновременно (например, в тот же день или одновременно) с началом цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки).

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, в течение не более 14 дней после начала введения цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки).

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы комбинированной терапии включают начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклакса, в течение примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклак, вводят множественными дозами с регулярными интервалами до, во время, во время курса и/или после периода введения цитотоксической терапии (например, Т-клеточной терапии, например, терапии CAR-Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления, способ включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклак, до введения цитотоксической терапии, необязательно в течение 7 дней до начала введения терапии, необязательно в течение 3 дней до начала введения терапии, необязательно в течение 1 дня до начала введения терапии.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, после введения цитотоксической терапии (например, CAR-Т-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, способ включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, после введения цитотоксической терапии (например, CAR-Т-клеточной терапии), необязательно в течение 14 дней после начала введения цитотоксической терапии, необязательно в течение 11 дней после начала введения цитотоксической терапии, необязательно в течение 7 дней после начала введения цитотоксической терапии, необязательно в течение 3 дней после начала введения цитотоксической терапии,

CAR-T-клеточной терапии). В некоторых аспектах, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, происходит примерно через 3 дня после введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых аспектах, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, происходит примерно через 4 дня после введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых аспектах, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, происходит примерно через 5 дней после введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых аспектах, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, происходит примерно через 6 дней после введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых аспектах, начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, происходит примерно через 7 дней после введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии).

В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать начало введения ингибитора (например, венетоклакса) после начала введения цитотоксической терапии, на пике или после пика клеточной смерти, индуцированной активацией (AICD) клеток цитотоксической терапии (например, CAR T-клеток). В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать начало введения ингибитора (например, венетоклакса) после начала введения цитотоксической терапии, на пике клеточной смерти, индуцированной активацией (AICD) клеток цитотоксической терапии (например, CAR T-клеток). В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать начало введения ингибитора (например, венетоклакса) после начала введения цитотоксической терапии, после пика клеточной смерти, индуцированной активацией (AICD) клеток цитотоксической терапии (например, CAR T-клеток).

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает продолжение введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, до и после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в пределах примерно 7 дней до и примерно 14 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 3 дней до и в течение примерно 14 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в пределах примерно 1 дня до и примерно 14 дней

после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 14 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 11 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 7 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 6 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 5 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 4 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 3 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение примерно 2 дней после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в течение приблизительно 1 дня после начала цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, одновременно с началом цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, одновременно с проведением цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят в течение периода времени, например, до определенного момента времени или до тех пор, пока не будет достигнут конкретный результат.

В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) до или примерно через 3 месяца после того, как субъект

получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) в течение, по меньшей мере, примерно 3 месяцев после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) до или примерно через 6 месяцев после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) в течение, по меньшей мере, примерно 6 месяцев после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) до или примерно через 12 месяцев после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) в течение, по меньшей мере, примерно 12 месяцев после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) до или примерно через 24 месяца после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии. В некоторых случаях, комбинированная терапия включает введение ингибитора (например, венетоклакса) в течение, по меньшей мере, примерно 24 месяцев после того, как субъект получил введение терапии, например цитотоксической терапии.

В некоторых случаях, прием ингибитора прекращают примерно через 3 месяца после введения цитотоксической терапии, если субъект демонстрирует желаемый ответ (например, полный ответ). В некоторых случаях, прием ингибитора прекращают примерно через 3 месяца после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, прием ингибитора прекращают примерно через 6 месяцев после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, прием ингибитора прекращают примерно через 12 месяцев после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, прием ингибитора прекращают примерно через 24 месяца после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, результатом является желаемый терапевтический ответ, как описано ниже и в Разделе III.

В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят, по меньшей мере, примерно или примерно через 3 месяца после начала введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят, по меньшей мере, примерно или примерно через 6 месяцев после начала введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего

выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят, по меньшей мере, примерно или примерно через 9 месяцев после начала введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят, по меньшей мере, примерно или примерно через 12 месяцев после начала введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят, по меньшей мере, примерно или примерно через 24 месяца после начала введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии). В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, продолжают и/или дополнительно вводят в течение более 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии (например, CAR-T-клеточной терапии) и до достижения желаемого терапевтического результата (например, полного ответа). В некоторых случаях, желаемый терапевтический результат (например, полный ответ) достигается в течение 6 после начала CAR-T-клеточной терапии. В некоторых случаях, желаемый терапевтический результат (например, полный ответ) достигается в течение 12 после начала введения CAR-T-клеточной терапии. В некоторых случаях, желаемый терапевтический результат (например, полный ответ) достигается в течение 24 после начала введения CAR-T-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят несколько раз в нескольких дозах. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят несколько раз в течение периода времени, например, до определенного момента времени или до достижения определенного результата. В некоторых случаях, результатом является желаемый терапевтический ответ, как описано ниже и в Разделе III.

Желаемые терапевтические результаты, такие как лечение рака, включают, но не ограничиваются ими, уменьшение размера опухоли, объема, метастазирования, доли бластов в костном мозге или молекулярно определяемого злокачественного образования В-клеток и/или улучшение прогноза или выживания, или другого симптома, связанного с опухолевой массой. Желаемые терапевтические результаты, такие как лечение рака, могут дополнительно включать способность ингибитора индуцировать апоптоз в раковых клетках и/или увеличение апоптоза раковых клеток. Способы идентификации и определения того, достигается ли желаемый терапевтический результат для лечения рака, включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в Разделе III.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, через день,

каждые три дня, два раза в неделю, один раз в неделю или один раз в месяц до, одновременно и/или после начала введения цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят один раз в сутки до, одновременно и/или после начала введения цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят один раз в сутки после начала введения цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят множественными дозами с регулярными интервалами до, во время, во время курса и/или после периода введения цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят в одной или нескольких дозах с регулярными интервалами до введения цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят в одной или нескольких дозах через регулярные промежутки времени после введения цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько доз ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, могут применяться одновременно с введением дозы цитотоксической терапии (*например*, Т-клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия). В некоторых вариантах осуществления, такие способы могут включать введение ингибитора до, одновременно с, во время, во время курса (включая один раз и/или периодически в течение курса) и/или после введения (например, начала введения) цитотоксической терапии (*например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления, введение может включать последовательное или периодическое введение ингибитора и/или цитотоксической терапии, *например* Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение может включать последовательные или периодические введения ингибитора и/или иммунотерапии или клеточной терапии, *например* Т-клеточной терапии один раз в сутки.

В некоторых вариантах осуществления, начало введения цитотоксической терапии происходит в то время, когда ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, достиг стационарной концентрации (C_{ss}). В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 7 дней до и примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка

семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 3 дней до и примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 1 дня до и примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 7 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 3 дней после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способы введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию приводят к достижению ингибитором стационарной концентрации (C_{ss}) в течение примерно 1 дня после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достиг стационарной концентрации (C_{ss}) в период времени до того, как пиковый уровень цитотоксической терапии будет определен в крови субъекта после введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достигает стационарной концентрации, когда его вводят в течение примерно четырех периодов полужизни ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, период полужизни ингибитора составляет от примерно 10 часов до примерно 30 часов. В некоторых вариантах осуществления, период полужизни ингибитора составляет от примерно 14 часов до примерно 26 часов. В некоторых вариантах осуществления, период полужизни ингибитора составляет от примерно 14 часов до примерно 18 часов. В некоторых вариантах осуществления, период полужизни ингибитора составляет от примерно 16 часов до примерно 19 часов. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достигает стационарной концентрации при ежедневном введении в течение примерно 2 дней, примерно 3 дней, примерно 4 дней или примерно 5 дней. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достигает стационарной концентрации при ежедневном введении в течение примерно 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор достигает стационарной концентрации при ежедневном введении в течение примерно 4 дней. В некоторых вариантах осуществления, стабильная концентрация достигается, когда концентрация ингибитора в плазме субъекта или общее количество ингибитора в организме субъекта является относительно стабильным при продолжении дозирования.

В некоторых вариантах осуществления, доза, частота, продолжительность, время

и/или порядок введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклакса, определяется на основании конкретных пороговых значений или критериев результатов стадии скрининга и/или оценки результатов лечения, описанных в настоящем документе, например, в Разделе III.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение цитотоксической терапии субъекту, которому ранее вводили терапевтически эффективное количество или одну или несколько доз ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение цитотоксической терапии субъекту, которому ранее вводили субтерапевтически эффективное количество или одну или несколько доз ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят субъекту перед введением субъекту дозы клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько доз ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, вводят одновременно с началом введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, вводят после начала введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят за достаточное время до иммунотерапии или клеточной терапии, так что терапевтический эффект комбинированной терапии увеличивается. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс, до введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, после введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакса, до начала введения Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, продолжают вводить и/или вводят дополнительно после прекращения или паузы во время противопролиферативной терапии, например, до или после начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, отменяют перед противопролиферативной терапией на период времени, равный от примерно трех до примерно четырех периодов полужизни ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, способ включает продолжающееся введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, продолжение и/или дальнейшее введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например

венетоклакса, включает введение множественных доз ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс, не продолжают вводить или не вводят дополнительно после начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию до и после начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования включает введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, одновременно с проведением клеточной терапии. В некоторых случаях, клеточной терапией является Т-клеточная терапия, например Т-клетками, экспрессирующими CAR.

В некоторых случаях, ингибитор вводят в терапевтически эффективном количестве. В некоторых случаях, терапевтически эффективное количество обеспечивает желаемый терапевтический результат, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Желаемые терапевтические результаты, такие как лечение рака, включают, но не ограничиваются ими, уменьшение размера опухоли, объема, метастазирования, доли бластов в костном мозге или молекулярно определяемого злокачественного образования В-клеток и/или улучшение прогноза или выживанию или другого симптома, связанного с опухолевой массой. Желаемые терапевтические результаты, такие как лечение рака, могут дополнительно включать способность ингибитора индуцировать апоптоз в раковых клетках и/или увеличение апоптоза раковых клеток. В некоторых случаях, терапевтически эффективное количество вызывает к нейтропению, такую как легкая, умеренная или тяжелая нейтропения. В некоторых случаях, легкая нейтропения определяется как абсолютное количество нейтрофилов 1000 до 15000/мкл. В некоторых случаях, умеренная нейтропения определяется как абсолютное количество нейтрофилов 500 до 1000/мкл. В некоторых случаях, тяжелая нейтропения определяется как абсолютное количество нейтрофилов менее 500/мкл. Способы идентификации и определения того, достигается ли желаемый терапевтический результат для лечения рака, включают, но не ограничиваются ими, любые способы, описанные в Разделе III. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в дозе от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 20 мг или примерно 200 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно или примерно 150 мг, от точно или примерно 20 мг или примерно 100 мг, от точно или примерно 20 мг до точно или примерно 50 мг, от точно или примерно 20 мг до точно или примерно 40 мг, от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 40 мг до точно или примерно 300 мг, от точно

в течение, по меньшей мере, двух лет.

В некоторых случаях, ингибитор (например, венетоклакс) можно вводить субъекту в течение от одной недели до двух лет, от одной недели до одного года, от одной недели до 6 месяцев, от одной недели до 3 месяцев, от одной недели до пяти недель, от одной недели до четырех недель, от одной недели до трех недель или от одной недели до двух недель после начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, после начала введения цитотоксической терапии, ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в течение, по меньшей мере, одной недели, по меньшей мере, двух недель, по меньшей мере, трех недель, по меньшей мере, четырех недель, по меньшей мере, пяти недель, по меньшей мере, 6 недель, по меньшей мере, двух месяцев, по меньшей мере, трех месяцев, по меньшей мере, шести месяцев, по меньшей мере, одного года или, по меньшей мере, двух лет. В некоторых вариантах осуществления, после начала введения цитотоксической терапии ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в течение примерно трех недель. В некоторых вариантах осуществления, после начала введения цитотоксической терапии ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в течение примерно трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, после начала введения цитотоксической терапии ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в течение примерно шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления, после начала введения цитотоксической терапии ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в течение примерно двенадцати месяцев. В некоторых вариантах осуществления, после начала введения цитотоксической терапии ингибитор (например, венетоклакс) вводят субъекту в течение примерно двадцати четырех месяцев.

В некоторых случаях, ингибитор вводят в субтерапевтически эффективном количестве. В некоторых случаях, в контексте введения субтерапевтически эффективное количество относится к количеству, менее эффективному в дозировках и/или в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, такого как лечение заболевания, состояния или нарушения и/или фармакокинетический или фармакодинамический эффект лечения по сравнению с «терапевтически эффективным количеством» того же агента. В некоторых случаях, субтерапевтически эффективное количество не обеспечивает или не достигает меньшего, чем желаемый терапевтический результат, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. В некоторых случаях, желаемым терапевтическим результатом является уменьшение размера опухоли, объема, метастазов, доли бластов в костном мозге или молекулярно определяемого злокачественного образования В-клеток и/или улучшения прогноза или выживанию или других симптомов, связанных с опухолевой массой. В некоторых случаях, желаемым терапевтическим результатом является способность ингибитора индуцировать апоптоз раковых клеток и/или увеличивать апоптоз раковых клеток. В некоторых случаях, субтерапевтически эффективное количество приводит к легкой или умеренной нейтропении. В некоторых случаях, субтерапевтически эффективное количество не

приводит к тяжелой нейтропении. В некоторых случаях, легкую нейтропению определяют как абсолютное количество нейтрофилов от 1000 до 15000/мкл. В некоторых случаях, умеренную нейтропению определяют как абсолютное количество нейтрофилов от 500 до 1000/мкл. В некоторых случаях, тяжелую нейтропению определяют как абсолютное количество нейтрофилов менее 500/мкл.

Способы идентификации и определения того, достигается ли желаемый терапевтический результат для лечения рака, включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в Разделе III. Субтерапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес субъекта, а также популяция вводимых клеток.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в субэффективных количествах, например субтерапевтически эффективных количествах. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклакса, сконструированных клеток (*например*, клеточной терапии) или композиции в субэффективных количествах, *например*, в субтерапевтически эффективных количествах. В некоторых случаях, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, вводят в субтерапевтических количествах, т.е. по схеме дозирования (например, доза и/или продолжительность) меньше, чем схема дозирования, обычно прописываемая клиницистами для достижения терапевтического или профилактического результата.

В некоторых случаях, ингибитор вводят в стационарной дозе (например, один раз в сутки) от примерно 20 миллиграммов в сутки до примерно 100 миллиграммов в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе от примерно 20 мг в сутки до примерно 40 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе от примерно 20 мг в сутки до примерно 50 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в стационарной дозе (например, один раз в сутки) от примерно 40 миллиграммов в сутки до примерно 100 миллиграммов в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе от примерно 40 до примерно 50 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в стационарной дозе (например, один раз в сутки) от примерно 50 миллиграммов в сутки до примерно 100 миллиграммов в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе не более примерно 20 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе примерно 20 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе не более примерно 40 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе примерно 40 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе не более примерно 50 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе примерно 50 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе не более примерно 100 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе примерно 100 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе не более примерно 200 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе примерно 200 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе не более примерно 400 мг в сутки.

В некоторых случаях, ингибитор вводят в дозе примерно 400 мг в сутки.

В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от двух недель до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от четырех недель до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от шести недель до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от двух месяцев до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от трех месяцев до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от шести месяцев до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от двенадцати месяцев до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение от восемнадцати месяцев до двадцати четырех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, двух недель. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, трех недель. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, четырех недель. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, шести недель. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, двух месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, двенадцати месяцев. В некоторых вариантах осуществления, стационарная доза (например, однократная суточная доза) вводится субъекту в течение, по меньшей мере, двадцати четырех месяцев.

Предыдущее введение ингибитора белка семейства BCL-2, способствующего выживанию, например, увеличение дозы

В любом из способов, представленных в настоящем документе, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию (например, венетоклакс) вводят по схеме увеличения дозы до введения схемы дозирования ингибитора, представленной в

настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, схема увеличения дозы включает введение возрастающих доз ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает начало введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклак, до начала введения цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор, например венетоклак, вводят перед введением цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR Т-клетки), по схеме увеличения дозы, например, после сбора аутологичных клеток у субъекта, подлежащего лечению, и до проведения противопролиферативной терапии (в дальнейшем «переходная терапия»). В некоторых аспектах, ингибитор можно вводить до введения субъекту противопролиферативной терапии, как описано в Разделе I.C. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклак, вводят дополнительно после прекращения или паузы во время противопролиферативной терапии, например, до или после начала цитотоксической терапии. Таким образом, в некоторых случаях, субъекта подвергают забору аутологичных клеток (например, лейкоферезу), переходной терапии ингибитором (например, венетоклаком), противопролиферативной терапии, началу введения CAR Т-клеток и началу введения схемы дозирования ингибитора (например, венетоклака), в этом порядке.

В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, прекращают или приостанавливают перед противопролиферативной терапией, например, на время от примерно трех периодов полужизни до примерно четырех периодов полужизни ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, прекращают или приостанавливают перед противопролиферативной терапией, например, на срок от примерно трех до примерно четырех периодов полужизни ингибитора, и введение ингибитора возобновляют во время или после начала цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, прекращают, по меньшей мере, за 1 день до противопролиферативной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, прекращают, по меньшей мере, за 2 дня до противопролиферативной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, прекращают, по меньшей мере, за 3 дня до противопролиферативной терапии. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, прекращают, по меньшей мере, за 4 дня до противопролиферативной терапии.

В некоторых аспектах, способы включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклака, которое

приостанавливается или завершается, по меньшей мере, на 4 периодах полужизни ингибитора или как минимум, на 4 периодах полужизни ингибитора или примерно на 4 периодах полужизни до для получения образца, содержащего Т-клетки, от субъекта, например, для продуцирования Т-клеточной терапии для введения. В некоторых аспектах, способы включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, которое приостанавливается или завершается за точно или, по меньшей мере, примерно 3 дня до или минимум точно или примерно 3 дня до получения образца, содержащего Т-клетки от субъекта, например, для продуцирования Т-клеточной терапии для введения. В некоторых аспектах способы включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, которое приостанавливается или завершается за точно или, по меньшей мере, примерно 1 день до или минимум точно или примерно 1 день до получения образца, содержащего Т-клетки от субъекта, например, для продуцирования Т-клеточной терапии для введения. В некоторых аспектах способы включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, которое приостанавливается или завершается за точно или, по меньшей мере, примерно 4 дня до или минимум точно или примерно 4 дня до получения образца, содержащего Т-клетки от субъекта, например, для продуцирования Т-клеточной терапии для введения. В некоторых аспектах Т-клеточную терапию продуцируют с помощью процесса, который включает получение образца, содержащего Т-клетки, от субъекта и введение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, такой как любые молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе, в композицию, содержащую Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, переходная терапия включает увеличение или «наращивание» дозирования. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до того, как его вводят субъекту в стационарной дозе (например, один раз в сутки). В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в низкой или «возрастающей» дозе перед тем, как вводить субъекту в стационарной дозе. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до того, как субъекту будет назначена цитотоксическая терапия. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в стационарной дозе перед введением субъекту цитотоксической терапии. В некоторых случаях, перед введением цитотоксической терапии субъекту ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах и в стационарной дозе. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту одновременно с цитотоксической терапией. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту до и одновременно с проведением цитотоксической терапии. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту до и после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, ингибитор вводят одновременно с и после цитотоксической терапии. В некоторых случаях, ингибитор вводят до, одновременно и после проведения цитотоксической терапии. В некоторых случаях, ингибитор вводят до,

выживанию, например венетоклакса, не возобновляют в течение примерно 1 дня после начала цитотоксической терапии.

В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих или «нарастающих» дозах в течение пяти недель. Таким образом, в некоторых случаях, переходная терапия включает пять недель возрастающих доз. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах в течение пяти недель для достижения максимальной дозы 400 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в дозе 20 миллиграммов в сутки в течение первой недели, 40 или 50 миллиграммов в сутки в течение второй недели, 100 миллиграммов в сутки в течение третьей недели, 200 миллиграммов в сутки в течение четвертой недели, и 400 миллиграммов в сутки в течение пятой недели. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 40 мг. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 50 мг. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 100 мг. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту возрастающими дозами в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель, примерно 3 недель, примерно 4 недель или примерно 5 недель.

В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах в течение трех недель. Таким образом, в некоторых случаях, переходная терапия включает трехнедельный прием возрастающих доз. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах в течение трех недель до достижения максимальной дозы 400 мг в сутки. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в дозе 20 миллиграммов в сутки в первый день первой недели; увеличивают до 40 или 50 миллиграммов в сутки на второй день или третий день первой недели; увеличивают до 100 миллиграммов в сутки между четвертым днем и седьмым днем первой недели; увеличивают до 200 миллиграммов в сутки в первый день второй недели; и увеличивают до 400 миллиграммов в сутки в первый день третьей недели. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 40 мг. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 50 мг. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в возрастающих дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 100 мг. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят субъекту возрастающими дозами в течение примерно 1 недели, примерно 2 недель или примерно 3 недель.

В некоторых вариантах осуществления, промежуточная терапия включает введение ингибитора, например венетоклакса, субъекту в первой дозе в течение первой недели, во второй дозе в течение второй недели и в третьей дозе в течение третьей недели. В некоторых вариантах осуществления, возрастающие дозы включают первую дозу, которая составляет примерно 20 мг в сутки, вторую дозу, которая составляет примерно 50 мг в

сутки, и третью дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления, возрастающие дозы включают первую дозу, которая составляет примерно 20 мг в сутки и вводится в течение первой недели, вторую дозу, которая составляет примерно 50 мг в сутки и вводится в течение второй недели, и третью дозу, которая составляет примерно 100 мг в сутки и вводится в течение третьей недели. Таким образом, в некоторых случаях, переходная терапия включает введение ингибитора, например венетоклакса, в дозе 20 мг в сутки в течение первой недели, 50 мг в сутки в течение второй недели и 100 мг в сутки в течение третьей недели. В некоторых вариантах осуществления, каждую повышающуюся дозу вводят один раз в сутки в течение недели и/или последнюю повышающую дозу вводят один раз в сутки в течение недели и до точно или примерно конца переходной терапии.

В некоторых случаях, после введения увеличивающихся доз ингибитора субъект продолжает получать ингибитор в максимальной увеличенной дозе до тех пор, пока не будет прекращена переходная терапия. В некоторых случаях, после введения ингибитора, например венетоклакса, в дозе 20 мг в сутки в течение первой недели, 50 мг в сутки в течение второй недели и 100 мг в сутки в течение третьей недели, субъект продолжает получать ингибитор в дозе 100 мг в сутки до завершения переходной терапии. В некоторых случаях, после введения увеличивающихся доз ингибитора субъект получает ингибитор в более высокой дозе, чем максимальная увеличенная доза, до завершения переходной терапии. В некоторых случаях, после введения ингибитора, например венетоклакса, в дозе 20 мг в сутки в течение первой недели, 50 мг в сутки в течение второй недели и 100 мг в сутки в течение третьей недели субъект получает ингибитор в более высокой дозе, превышающей 100 мг в сутки (например, 200 мг/сутки или 400 мг/сутки), до завершения переходной терапии. В некоторых вариантах осуществления, переходную терапию прекращают, по меньшей мере, за 1 день до проведения противопролиферативной терапии. В некоторых вариантах осуществления, переходную терапию прекращают, по меньшей мере, за 2 дня до проведения противопролиферативной терапии. В некоторых вариантах осуществления, переходную терапию прекращают, по меньшей мере, за 3 дня до проведения противопролиферативной терапии. В некоторых вариантах осуществления, переходную терапию прекращают, по меньшей мере, за 4 дня до проведения противопролиферативной терапии.

В некоторых случаях, стационарную (например, один раз в сутки) дозу ингибитора вводят субъекту после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы, субъекту вводят стационарную дозу от точно или примерно 400 мг в сутки до 800 мг в сутки. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы, субъекту вводят стационарную дозу примерно 400 мг в сутки. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, одной недели после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двух недель после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно

400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, четырех недель сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двух месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, трех месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, шести месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двенадцати месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, восемнадцати месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 400 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двадцати четырех месяцев после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, субъекту вводят постоянную дозу 400 или 800 мг в сутки после введения возрастающих доз в течение трех недель. В некоторых случаях, субъекту вводят постоянную дозу 400 мг в сутки после введения возрастающих доз в течение трех недель. В некоторых случаях, субъекту вводят постоянную дозу 400 или 800 мг в сутки после введения возрастающих доз в течение пяти недель. В некоторых случаях, субъекту вводят постоянную дозу 400 мг в сутки после введения возрастающих доз в течение пяти недель.

В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в «возрастающей» дозе в течение от примерно одной недели до примерно пяти недель. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в виде возрастающей дозы в течение от примерно одной до примерно трех недель. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в виде возрастающей дозы в течение от примерно одной до примерно двух недель. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в виде возрастающей дозы в течение примерно одной недели. В некоторых случаях, ингибитор вводят субъекту в виде возрастающей дозы в течение от 7 до 21 дня. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет от примерно 20 мг в сутки до 400 мг в сутки, от примерно 40 мг в сутки до 400 мг в сутки, от примерно 50 мг в сутки до 400 мг в сутки, от примерно 150 мг в сутки до 300 мг в сутки, от примерно 200 мг в сутки до 300 мг в сутки. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет 150 мг в сутки. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет 150 мг в сутки в течение 7 дней. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет 150 мг в сутки в течение 14 дней. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет 150 мг в сутки в течение 21 дня. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет 150 мг в сутки и вводится непрерывно в течение от примерно 7 дней до примерно 21 дня. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет не более 20 мг в сутки. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет не более 40 мг в сутки. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет не более 50 мг в сутки. В некоторых случаях, возрастающая доза составляет не более 100 мг в сутки.

В некоторых случаях, стационарную (например, один раз в сутки) дозу ингибитора вводят субъекту после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы субъекту вводят стационарную дозу от примерно 100 мг в сутки до 500 мг в сутки. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы субъекту вводят стационарную дозу от примерно 150 мг в сутки до 425 мг в сутки. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы субъекту вводят стационарную дозу, по меньшей мере, примерно 150 мг в сутки. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы субъекту вводят стационарную дозу, по меньшей мере, примерно 200 мг в сутки. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы субъекту вводят стационарную дозу примерно 325 мг в сутки. В некоторых случаях, после введения возрастающей дозы субъекту вводят стационарную дозу примерно 425 мг в сутки. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, одной недели сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двух недель сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, трех недель сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двух месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, трех месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, шести месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двенадцати месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, восемнадцати месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение, по меньшей мере, двадцати четырех месяцев сразу после введения возрастающей дозы. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту после увеличения дозы до 150 мг в сутки. В некоторых случаях, стационарную дозу примерно 325 мг в сутки вводят субъекту в течение одного или нескольких циклов, состоящих из 14 дней и 7 дней отдыха, или 21 дня непрерывного приема, после увеличения дозы до 150 мг в сутки.

Специалист в данной области техники поймет, что более высокие или более низкие дозы ингибитора могут использоваться в любом из предложенных способов, например, в зависимости от конкретного агента и пути введения. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор можно вводить отдельно или в форме фармацевтической композиции, где соединение находится в примеси или смеси с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. В

некоторых вариантах осуществления, ингибитор можно вводить системно или локально в орган или ткань, подлежащие лечению. Типовые способы введения включают, но не ограничиваются ими, местный, инъекцию (например, подкожную, внутримышечную, внутрикожную, внутривенную, внутривенную, внутривенную, внутривенную и внутривенную), пероральный, сублингвальный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути. В некоторых вариантах осуществления, путем введения является пероральный, парентеральный, ректальный, назальный, местный или окулярный пути или ингаляция. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят перорально в твердых дозированных формах, таких как капсулы, таблетки и порошки, или в жидких дозированных формах, таких как эликсиры, сиропы и суспензии.

После улучшения заболевания пациента дозу можно скорректировать для профилактического или поддерживающего лечения. Например, дозировка или частота введения, или и то, и другое могут быть уменьшены в зависимости от симптомов до уровня, при котором сохраняется желаемый терапевтический или профилактический эффект. Если симптомы уменьшились до надлежащего уровня, лечение можно прекратить. Однако пациентам может потребоваться периодическое лечение на долгосрочной основе при повторном появлении симптомов. Пациентам также может потребоваться постоянное лечение на длительной основе.

V. ВВЕДЕНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ ИЛИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений, представленных в настоящем документе, комбинированная терапия включает введение субъекту терапии, например цитотоксической терапии, такой как иммунотерапия или клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления, терапией является Т-клеточная терапия (*например*, Т-клетки, экспрессирующие CAR) или Т-клеточная рекрутинговая терапия. Такие способы лечения можно проводить до, после, одновременно с введением одного или нескольких ингибиторов белка семейства BCL2, способствующего выживанию, как описано.

1. Т-КЛЕТОЧНАЯ РЕКРУТИНГОВАЯ ТЕРАПИЯ

В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапия является или включает Т-клеточную рекрутинговую терапию, которая является или включает связывающую молекулу, способную связываться с поверхностной молекулой, экспрессируемой на Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, поверхностной молекулой является активирующий компонент Т-клетки, такой как компонент рецепторного комплекса Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, поверхностной молекулой является CD3 или CD2. В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная рекрутинговая терапия является или включает антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточной рекрутинговой терапией является биспецифическое антитело, содержащее, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, связывающийся с активирующим компонентом Т-клетки

(например, молекулой на поверхности Т-клетки, например, CD3 или CD2) и, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, связывающийся с поверхностным антигеном на клетке-мишени, таким как поверхностный антиген на опухолевой или раковой клетке, например, с любым из перечисленных антигенов, как описано в настоящем документе, например, CD19. В некоторых вариантах осуществления, одновременное или почти одновременное связывание такого антитела с обеими его мишенями может привести к временному взаимодействию между клеткой-мишенью и Т-клеткой, тем самым приводя к активации, например, цитотоксической активности, Т-клетки и последующему лизису клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, биспецифические Т-клетки рекрутеры (BiTE) используют в связи с представленными способами, применениями и готовыми изделиями. В некоторых вариантах осуществления, биспецифические рекрутеры Т-клеток обладают специфичностью по отношению к двум конкретным антигенам (или маркерам, или лигандам). В некоторых вариантах осуществления, антигены экспрессируются на поверхности определенного типа клетки. В конкретных вариантах осуществления, первый антиген связан с иммунной клеткой или сконструированной иммунной клеткой, и второй антиген связан с клеткой-мишенью конкретного заболевания или состояния, такого как рак.

Известны многочисленные способы получения биспецифических рекрутеров Т-клеток, включая слияние двух разных гибридом (Milstein и Cuello, Nature 1983;305:537-540) и химическое связывание с помощью гетеробифункциональных перекрестных линкеров (Staerz et al. Nature 1985; 314:628-631). Типовые молекулы биспецифических антител, рекрутеров Т-клеток, включают такие, которые содержат тандемные молекулы scFv, слитые через гибкий линкер (Nagorsen и Bauerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)); тандемные молекулы scFv, слитые друг с другом через, например гибкий линкер, и которые дополнительно содержат Fc домен, состоящий из первой и второй субъединиц, способных к стабильной ассоциации (WO2013026837); диатела и их производные, включая тандемные диатела (Holliger et al, Prot Eng 9, 299-305 (1996); Kipriyanov et al, J Mol Biol 293, 41-66 (1999)); переориентирующие молекулы с двойной аффинностью (DART), которые могут включать формат диатела с С-концевым дисульфидным мостиком; или триомабы, которые включают полноразмерные гибридные молекулы IgG мыши/крысы (Seimetz et al, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)).

В некоторых вариантах осуществления, биспецифическим агентом, рекрутером Т-клеток, является молекула, кодированная полипептидной конструкцией. В некоторых вариантах осуществления, полипептидная конструкция включает первый компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, связывающийся с активирующей частью иммунной клетки или сконструированной иммунной клетки, и второй компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, связывающийся с поверхностным антигеном (например, мишенью или опухолеассоциированным антигеном (ТАА)), ассоциированным с конкретным заболеванием или состоянием (например, раком). В некоторых вариантах

осуществления, первый и второй компоненты связаны линкером. В некоторых вариантах осуществления, первый компонент связан с лидерной последовательностью, кодирующей сигнальный пептид CD33.

В некоторых вариантах осуществления, полипептидом является конструкция, содержащая от N-конца до С-конца: первый компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, связывающийся с активирующей частью Т-клетки, пептидный линкер и второй компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, связывающийся с поверхностным антигеном (например, мишенью или опухлеассоциированным антигеном (ТАА)), связанным с заболеванием или состоянием (например, раком).

В некоторых аспектах активирующим компонентом Т-клетки является поверхностная молекула Т-клетки, такая как CD3 или CD2. В некоторых вариантах осуществления, поверхностным антигеном клетки-мишени является опухлеассоциированный антиген (ТАА). В некоторых аспектах ТАА включает один или несколько эпитопов. В некоторых вариантах осуществления, пептидный линкер является или включает расщепляемый пептидный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен первого компонента биспецифического рекрутера Т-клеток взаимодействует с рецептором эндогенной иммунной клетки на периферии опухоли. В некоторых вариантах осуществления, эндогенной иммунной клеткой является Т-клетка. В некоторых аспектах, рекрутинг эндогенного Т-клеточного рецептора перенаправляет эндогенные Т-клетки на опухоль. В некоторых аспектах, рекрутинг эндогенного Т-клеточного рецептора привлекает лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (ТИЛ), в опухоль. В некоторых аспектах, рекрутинг эндогенного Т-клеточного рецептора активирует эндогенный иммунный репертуар.

В некоторых вариантах осуществления, одновременное или почти одновременное связывание биспецифического рекрутера Т-клетки с обеими его мишенями (например, иммунной клеткой и ТАА), может приводить к временному взаимодействию между клеткой-мишенью и Т-клеткой, что приводит к активации (*например*, цитотоксической активности, высвобождению цитокинов) Т-клетки и последующему лизису клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, первый компонент биспецифического рекрутера Т-клетки является или включает антигенсвязывающий домен, который связывается с активирующим компонентом Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, активирующим компонентом Т-клетки является поверхностная молекула. В некоторых вариантах осуществления, поверхностная молекула является или включает Т-клеточный антиген. Типовые Т-клеточные антигены включают, но не ограничиваются ими, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD44, CD45, CD69 и CD90. В некоторых аспектах, связывание молекулы биспецифического рекрутера Т-клетки с антигеном Т-клетки стимулирует и/или активирует Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления, анти-Т-клеточный связывающий домен включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv, scFv, scAb, dAb, однодоменную тяжелую цепь антитела и однодоменную легкую цепь антитела.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточным связывающим доменом на биспецифическом рекрутере Т-клеток является анти-CD3. В некоторых аспектах, доменом анти-CD3 является scFv. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD3 домен биспецифического рекрутера Т-клетки связывается с субъединицей комплекса CD3 на Т-клеточном рецепторе. В некоторых аспектах, рецептор находится на эндогенной Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, рецептор находится на сконструированной иммунной клетке, дополнительно экспрессирующей рекомбинантный рецептор. Эффекты рекрутинга CD3 Т-клетки хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, активацию Т-клетки и передачу сигналов других нижестоящих клеток. Любой из таких биспецифических рекрутеров Т-клеток можно использовать в приведенном в настоящем документе описании.

В некоторых вариантах осуществления, вторым компонентом биспецифического рекрутера Т-клеток, содержащим антигенсвязывающий домен, связывающийся с поверхностным антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием, является опухолевый или раковый антиген. В некоторых вариантах осуществления, антигены, таргетируемые биспецифическим рекрутером Т-клетки, включают антигены, экспрессируемые в контексте заболевания, состояния или типа клеток, таргетируемого адоптивной клеточной терапией. К заболеваниям и состояниям относятся пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая рак и опухоли, включая гематологический рак, рак иммунной системы, такой как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как В, Т и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

В некоторых вариантах осуществления, антиген включает $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ интегрин (avb6 интегрин), антиген созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразу 9 (CA9, также известную как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково/тестикулярный антиген 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, С-С мотив хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликана 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутацию III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин В2, рецептор эфрина А2 (EPHa2), рецептор эстрогена, рецептор Fc типа 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 рецептор Fc или FCRH5), фетальный ацетилхолиновый рецептор (фетальный AchR), фолатсвязывающий белок (FBP), рецептор фолиевой кислоты альфа, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), сопряженный с

G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторную тирозинкиназу erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), рецептор альфа IL-22 (IL-22R α), рецептор альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептор со встроенным киназным доменом (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитоп L1-CAM, богатый лейцином повтор, содержащий 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, цитомегаловирус мыши (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобласта (TPBG, также известный как 5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), родственник тирозиназе белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), родственник тирозинкиназе белок 2 (TRP2, также известный как допахром тауомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоль Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессированные HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, таргетированные рецепторами в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные со злокачественным образованием В-клеток, такие как любой из множества известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD19.

В некоторых вариантах осуществления, оба антигенсвязывающих домена, включая первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, содержат антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела (например, sdAb, sdFv) или фрагменты. Термин охватывает генетически

сконструированные и/или модифицированные иным образом формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, *например*, биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетраатела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как охватывающий его функциональные фрагменты антитела. Термин также включает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и их подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут быть антигенсвязывающей частью (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления, константная область тяжелой цепи антитела выбрана, *например*, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, *например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (*например*, IgG1 человека). В другом варианте осуществления, константная область легкой цепи антитела выбрана, *например*, из каппа или лямбда, особенно, каппа.

Представленные антитела включают фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничены ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; переменные области тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные V_H одиночные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антителами являются одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFvs.

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

Однодоменными антителами (sdAb) являются фрагменты антител, содержащие

весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменным антителом является однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, биспецифический рекрутер Т-лимфоцитов включает домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывает антиген, такой как онкологический маркер или поверхностный антиген таргетируемой клетки или заболевания, например опухолевой клетки или раковой клетки, например, любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем документе или известных. Типовые однодоменные антитела включают sdFv, нанотело, $V_{\text{H}}\text{H}$ или V_{NAR} .

Фрагменты антител могут быть получены различными методами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитический перевар интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антителами являются рекомбинантно продуцированные фрагменты, такие как фрагменты, содержащие расположения, которые не встречаются в природе, например, с двумя или более областями или цепями антитела, соединенными синтетическими линкерами, *например*, пептидными линкерами, и/или которые могут не продуцироваться ферментным переваром интактных антител природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления, фрагментами антител являются scFv.

«Гуманизированным» антителом является антитело, в котором все или практически все аминокислотные остатки CDR происходят из нечеловеческих CDR, и все или практически все аминокислотные остатки FR происходят из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать, по меньшей мере, часть константной области антитела, полученной из антитела человека. «Гуманизированная форма» не человеческого антитела относится к варианту не человеческого антитела, которое подверглось гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности для человека, при сохранении специфичности и аффинности родительского не человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (*например*, антитела, из которого получены остатки CDR), *например*, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие домены являются одноцепочечными переменными фрагментами (scFv). В некоторых вариантах осуществления, scFv является тандемный scFv, содержащий тяжелую и легкую цепи. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи связаны пептидными линкерами. В некоторых вариантах осуществления, линкер состоит в основном из серинов и глицинов. В некоторых аспектах, связь тяжелой цепи и легкой цепи образует единый полипептидный антигенсвязывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления, первым антигенсвязывающим доменом биспецифического рекрутера Т-клеток является анти-CD3 scFv. В некоторых вариантах осуществления, вторым антигенсвязывающим доменом биспецифического рекрутера Т-

клеток является анти-CD19 scFv.

В некоторых аспектах, полипептидные конструкции биспецифического, рекрутера Т-клетки содержат линкер, который соединяет первый компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с активирующей частью Т-клетки, со вторым компонентом, содержащим антигенсвязывающий домен, связывающийся с поверхностным антигеном (например, антигеном-мишенью или опухолеассоциированным антигеном (ТАА)), ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием. В некоторых аспектах, линкером является короткий, средний или длинный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, линкером является расщепляемый пептидный линкер. В некоторых аспектах, расщепляемый линкер включает последовательность, которая является субстратом для протеазы. В некоторых вариантах осуществления, последовательность включает связь, которая может быть разорвана в условиях *in vivo*. В некоторых случаях, линкерная последовательность селективно расщепляется протеазой, присутствующей в физиологической среде. В некоторых аспектах, окружающая среда отделена от микросреды опухоли. В некоторых вариантах осуществления, протеаза находится на периферии опухоли.

В некоторых вариантах осуществления, селективно расщепляемый линкер расщепляется протеазой, продуцируемой клетками, которые не ко-локализуются с опухолью. В некоторых вариантах осуществления, селективно расщепляемый линкер не расщепляется протеазами, которые находятся в непосредственной близости от микроокружения опухоли. В некоторых вариантах осуществления, расщепление линкера протеазой делает биспецифическую молекулу рекрутера Т-клетки неактивной. В некоторых вариантах осуществления, протеаза обнаруживается в циркулирующей крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления, протеаза является частью внутреннего или внешнего пути коагуляции. В некоторых аспектах, протеазой является сериновая протеаза. В некоторых аспектах протеаза включает, но не ограничена ими, тромбин, фактор X, фактор XI, фактор XII и плазмин.

Примеры таких типовых биспецифических антител, рекрутеров Т-клеток, включают молекулы биспецифических рекрутеров Т-клеток (BiTE), которые содержат тандемные scFv молекулы, слитые гибким линкером (см., *например*, Nagorsen и Bauerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)); тандемные scFv молекулы, слитые друг с другом посредством, *например*, гибкого линкера, и которые дополнительно содержат домен Fc, состоящий из первой и второй субъединиц, способных к стабильной ассоциации (WO2013026837); диатела и их производные, включая тандемные диатела (Holliger et al, *Prot Eng* 9, 299-305 (1996); Kipriyanov et al, *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999)); переориентирующиеся молекулы с двойной аффинностью (DART), которые могут включать формат диатела с С-концевым дисульфидным мостиком; или триомабы, которые включают цельные гибридные молекулы IgG мыши/крысы (Seimetz et al, *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)). В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточной рекрутинговой терапией является блинатумомаб или AMG 330. Любой из таких

рекрутеров Т-клеток может использоваться в представленных способах.

Стимулятор иммунной системы и/или Т-клеточную рекрутинговую терапию можно вводить любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, например, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивной инъекцией, субконъюнктивальной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перibuльбарной инъекцией или задней окологсклеральной доставкой. В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапию вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутриочагово. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутригрудное, внутричерепное или подкожное введение.

В некоторых вариантах осуществления, вводят одну или несколько доз Т-клеточной рекрутинговой терапии. В конкретных вариантах осуществления, вводят от точно или примерно 0,001 мкг до примерно 5000 мкг включительно Т-клеточной рекрутинговой терапии. В конкретных вариантах осуществления, вводят от точно или примерно 0,001 мкг до 1000 мкг, от 0,001 мкг до 1 мкг, от 0,01 мкг до 1 мкг, от 0,1 мкг до 10 мкг, от 0,01 мкг до 1 мкг, от 0,1 мкг до 5 мкг, от 0,1 мкг до 50 мкг, от 1 мкг до 100 мкг, от 10 мкг до 100 мкг, от 50 мкг до 500 мкг, от 100 мкг до 1000 мкг, от 1000 мкг до 2000 мкг или от 2000 мкг до 5000 мкг Т-клеточной рекрутинговой терапии. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеточной рекрутинговой терапии составляет или включает от точно или примерно 0,01 мкг/кг и 100 мг/кг, 0,1 мкг/кг и 10 мкг/кг, 10 мкг/кг и 50 мкг/кг, 50 мкг/кг и 100 мкг/кг, 0,1 мг/кг и 1 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг, 10 мг/кг и 100 мг/кг, 100 мг/кг и 500 мг/кг, 200 мг/кг и 300 мг/кг, 100 мг/кг и 250 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг, 250 мг/кг и 500 мг/кг, 250 мг/кг и 750 мг/кг, 50 мг/кг и 750 мг/кг, 1 мг/кг и 10 мг/кг, или 100 мг/кг и 1000 мг/кг, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза Т-клеточной рекрутинговой терапии составляет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или составляет или составляет примерно 0,1 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 30 мкг/кг, 40 мкг/кг, 50 мкг/кг, 60 мкг/кг, 70 мкг/кг, 80 мкг/кг, 90 мкг/кг, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг, 40 мг/кг, 45 мг/кг, 50 мг/кг, 55 мг/кг, 60 мг/кг, 65 мг/кг, 70 мг/кг, 75 мг/кг, 80 мг/кг, 85 мг/кг, 90 мг/кг, 95 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 300 мг/кг, 400 мг/кг, 500 мг/кг, 600 мг/кг, 700 мг/кг, 800 мг/кг, 900 мг/кг или 1,000 мг/кг. В конкретных вариантах осуществления, Т-клеточная рекрутинговая терапия вводится перорально, внутривенно, внутрибрюшинно, трансдермально, интратекально, внутримышечно, интраназально, через слизистые оболочки, подкожно или ректально.

2. КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ

В некоторых вариантах осуществления терапией, например цитотоксической терапией, является клеточная терапия, которая является или включает введение клеток,

таких как иммунные клетки, например Т-клетки или НК-клетки, которые таргетируют молекулу, экспрессируемую на поверхности поражения, например, опухоли или рака. В некоторых аспектах, клеточной терапией является терапия инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапия естественными киллерами (NK), терапию трансгенными TCR или клеточная терапия, экспрессирующая рекомбинантный рецептор, которой необязательно является Т-клеточная терапия, которой необязательно является клеточная терапия, экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, Т-клеточная терапия включает введение Т-клеток, сконструированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). В некоторых аспектах, Т-клеточной терапией является адоптивная Т-клеточная терапия, включающая Т-клетки, которые специфически распознают и/или таргетируют антиген, ассоциированный с раком, такой как антиген, ассоциированный со злокачественным образованием В-клеток, например хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) или неходжкинской лимфомой (NHL) или ее подтипом. В некоторых аспектах, Т-клеточной терапией является адоптивная Т-клеточная терапия, содержащая Т-клетки, которые специфически распознают и/или таргетируют антиген, ассоциированный с раком, такой как антиген, ассоциированный со злокачественным образованием В-клеток, например хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL). В некоторых аспектах, Т-клеточной терапией является адоптивная Т-клеточная терапия, содержащая Т-клетки, которые специфически распознают и/или таргетируют антиген, ассоциированный с раком, такой как антиген, ассоциированный со злокачественным образованием В-клеток, например малой лимфоцитарной лимфомой (SLL). В некоторых аспектах, Т-клеточная терапия содержит Т-клетки, сконструированные с химерным антигенным рецептором (CAR), содержащим антигенсвязывающий домен, который связывается, например специфически связывается, с антигеном. В некоторых случаях, антигеном, таргетированным Т-клеточной терапией, является CD19.

В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или другой антигенсвязывающий рецептор. В некоторых вариантах осуществления, иммунные клетки экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как трансгенный TCR или химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, клетки являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления, клетки являются аллогенными по отношению к субъекту. Примеры таких клеточных терапий, *например*, Т-клеточной терапии, для использования в представленных способах, описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления, предложенные клетки экспрессируют и/или сконструированы для экспрессии рецепторов, таких как рекомбинантные рецепторы, включая рецепторы, содержащие лиганд-связывающие домены или их связывающие фрагменты, и Т-клеточные рецепторы (TCR) и их компоненты, и/или функциональные не-TCR антигенные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор

содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является CAR, который содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления, лигандом, таким как антиген, является белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, CAR является TCR-подобный CAR, и антигеном является процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС).

В некоторых вариантах осуществления, клетки для использования или введения в связи с представленными способами, содержат или сконструированы так, чтобы содержать сконструированный рецептор, *например*, сконструированный антигенный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), или Т-клеточный рецептор (TCR). Среди композиций есть фармацевтические композиции и составы для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. Также представлены терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам, *например*, пациентам, в соответствии с представленными способами и/или с представленными готовыми изделиями или композициями.

Сконструированные клетки, включая сконструированные клетки, содержащие рекомбинантные рецепторы, описаны в разделе II ниже. Примеры рекомбинантных рецепторов, включая CAR и рекомбинантные TCR, а также способов конструирования и введения рецепторов в клетки, включают те, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118, и европейской заявке на патент EP2537416, и/или те, которые описаны в Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах, генетически сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США № 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1.

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

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, *например*, адоптивная Т-клеточная терапия, осуществляется путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, который должен получать клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах, клетки получают от субъекта, *например*, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, *например*, адоптивная Т-клеточная терапия, осуществляется путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или который в конечном итоге получает клеточную терапию, *например*, первого субъекта. В таких вариантах осуществления, клетки затем вводят другому субъекту, *например*, второму субъекту того же вида. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй субъекты генетически похожи. В некоторых вариантах осуществления, второй субъект экспрессирует тот же класс или суперттип НЛА, что и первый субъект.

Клетки при Т-клеточной терапии можно вводить в композиции, составленной для введения, или, альтернативно, в более чем одной композиции (*например*, двух композициях), составленных для отдельного введения. Дозы клеток могут включать определенное количество или относительное количество клеток или сконструированных клеток, и/или определенное соотношение или композиции двух или нескольких подтипов в композиции, таких как CD4 к CD8 Т клеткам.

Клетки можно вводить любыми подходящими средствами. Клетки вводят по схеме дозирования для достижения терапевтического эффекта, такого как уменьшение опухолевой массы. Дозирование и введение могут частично зависеть от схемы введения ингибитора белков семейства BCL2, способствующих выживанию, который можно вводить до, после и/или одновременно с началом введения клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия, например CAR Т-клеточная терапия. Различные схемы дозирования клеточной терапии включают, но не ограничены ими, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

А. КОМПОЗИЦИИ И СОСТАВЫ

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия, включающая клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, *например*, CAR или TCR, предоставляется в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать в соответствии с представленными способами и/или с представленными готовыми изделиями или композициями, например, при лечении В-клеточного злокачественного образования.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить биологической активности содержащегося в нем активного

ингредиента быть эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введен состав.

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

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

В композиции включены буферные агенты в некоторых аспектах. Подходящие буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах, используют смесь двух или нескольких буферных агентов. Буферный агент или его смеси обычно присутствуют в количестве от примерно 0,001% до примерно 4% от веса всей композиции. Способы получения фармацевтических композиций для введения известны. Типовые способы описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция также может

содержать более одного активного ингредиента, полезного для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предотвращается или лечится клетками или агентами, когда соответствующие активности не влияют негативно друг на друга. Такие активные ингредиенты обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д.

Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления, содержит агенты или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическая эффективность, в некоторых вариантах осуществления, отслеживается путем периодической оценки леченных субъектов. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и другие схемы дозирования, которые могут быть определены. Желаемая доза может быть доставлена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции.

Клетки можно вводить с использованием стандартных методов введения, составов и/или устройств. Представлены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Что касается клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, происходящие из периферической крови, или их потомство (*например*, полученные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить локальной инъекцией, включая катетерное введение, системной инъекцией, локальной инъекцией, внутривенной инъекцией или парентеральным введением. При введении терапевтической композиции (*например*, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированную иммунореактивную клетку) ее обычно составляют в виде стандартной дозированной формы для инъекций (раствора, суспензии, эмульсии).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или введения в виде суппозиториев. В некоторых вариантах осуществления, агент или популяцию клеток вводят парентерально. Используемый в настоящем документе термин «парентеральное» включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В

некоторых вариантах осуществления, агент или популяции клеток вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутривентрикулярной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых вариантах осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, *например*, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые, в некоторых аспектах, могут быть забуференными до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. С другой стороны, вязкие композиции могут быть составлены в соответствующем диапазоне вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которыми могут быть растворители или диспергирующая среда, содержащие, например, воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, солевой раствор, глюкоза, декстроза или подобные.

Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, *например*, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны.

В. ДОЗИРОВАНИЕ

Клетки можно вводить любыми подходящими способами, например, болюсной инфузией, инъекцией, *например*, внутривенной или подкожной инъекцией, внутриглазной инъекцией, периокулярной инъекцией, субретинальной инъекцией, интравитреальной инъекцией, трансептальной инъекцией, субсклеральной инъекцией, интрахориоидальной инъекцией, внутрикамерной инъекцией, субконъюнктивной инъекцией, субтеноновой инъекцией, ретробульбарной инъекцией, перибульбарной инъекцией или задней окологсклеральной доставкой. В некоторых вариантах осуществления, их вводят парентерально, внутривенно и интраназально и, если желательно для местного лечения, внутримышечно. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутривентрикулярное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления, данную дозу вводят путем однократного болюсного введения клеток. В некоторых вариантах осуществления, ее вводят путем многократного болюсного введения клеток, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения клеток или агента. В некоторых вариантах осуществления, введение клеточной дозы или любых дополнительных терапий, *например*, противолимфомной терапии, интервенционной терапии и/или комбинированной терапии, проводят амбулаторно.

Для лечения заболевания, подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, предыдущей терапии, истории болезни субъекта и ответа на клетки, а также на усмотрение лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления, композиции и клетки подходящим образом вводят субъекту за один раз или в течение серии курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток вводят субъектам в соответствии с представленными способами и/или представленными готовыми изделиями или композициями. В некоторых вариантах осуществления, размер или время введения доз определяют как функцию от конкретного заболевания или состояния (например, рака, например, В-клеточного злокачественного образования) у субъекта. В некоторых случаях, размер или время приема доз для конкретного заболевания с учетом представленного описания могут быть определены эмпирически.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток составляет от точно или примерно 2×10^5 клеток/кг до точно или примерно 2×10^6 клеток/кг, например, от точно или примерно 4×10^5 клеток/кг до точно или примерно 1×10^6 клеток/кг, или от точно или примерно 6×10^5 клеток/кг до точно или примерно 8×10^5 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит не более 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как клетки, экспрессирующие CAR) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, не более точно или примерно 3×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 8×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 9×10^5 клеток/кг, не более точно или примерно 1×10^6 клеток/кг, или не более точно или примерно 2×10^6 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно или точно или примерно 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как клетки, экспрессирующие CAR) на килограмм массы тела субъекта (клеток/кг), например, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 3×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 4×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 5×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 6×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 7×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 8×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 9×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 1×10^6 клеток/кг, или по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно, или точно или примерно 2×10^6 клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления, клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от точно или примерно 1 миллиона до точно или

примерно 100 миллиардов клеток и/или такого количества клеток на килограмм массы тела субъекта, *например*, от точно или примерно 1 миллиона до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 5 миллионов клеток, точно или примерно 25 миллионов клеток, точно или примерно 500 миллионов клеток, точно или примерно 1 миллиард клеток, точно или примерно 5 миллиардов клеток, точно или примерно 20 миллиардов клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток, точно или примерно 40 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеперечисленных значений), от точно или примерно 1 миллиона до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 5 миллионов клеток, точно или примерно 25 миллионов клеток, точно или примерно 500 миллионов клеток, точно или примерно 1 миллиард клеток, точно или примерно 5 миллиардов клеток, точно или примерно 20 миллиардов клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток, точно или примерно 40 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеперечисленных значений), *например*, от точно или примерно 10 миллионов до точно или примерно 100 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 20 миллионов клеток, точно или примерно 30 миллионов клеток, точно или примерно 40 миллионов клеток или точно или примерно 60 миллионов клеток, точно или примерно 70 миллионов клеток, точно или примерно 80 миллионов клеток, точно или примерно 90 миллионов клеток, точно или примерно 10 миллиардов клеток, точно или примерно 25 миллиардов клеток, точно или примерно 50 миллиардов клеток, точно или примерно 75 миллиардов клеток, точно или примерно 90 миллиардов клеток или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеперечисленных значений), и, в некоторых, случаях от точно или примерно 100 миллионов клеток до точно или примерно 50 миллиардов клеток (*например*, точно или примерно 120 миллионов клеток, точно или примерно 250 миллионов клеток, точно или примерно 350 миллионов клеток, точно или примерно 450 миллионов клеток, точно или примерно 650 миллионов клеток, точно или примерно 800 миллионов клеток, точно или примерно 900 миллионов клеток, точно или примерно 3 миллиарда клеток, точно или примерно 30 миллиардов клеток или точно или примерно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела субъекта. Дозировки могут варьироваться в зависимости от признаков, характерных для заболевания или нарушения, и/или пациента, и/или других способов лечения.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $2,5 \times 10^8$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно $2,5 \times 10^7$ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^7 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 5×10^6 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от

примерно 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток, от точно или примерно 1×10^8 до точно или примерно 5×10^8 всего CAR+ Т-клеток, от точно или примерно 1×10^8 до точно или примерно $2,5 \times 10^8$ всего CAR⁺ Т-клеток, от точно или примерно $2,5 \times 10^8$ до точно или примерно 5×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза генетически сконструированных клеток содержит, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^5 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5 \times 10^5$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^5 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5 \times 10^6$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^6 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^7 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно 1×10^8 CAR-экспрессирующих Т-клеток, по меньшей мере, точно или примерно $2,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, или, по меньшей мере, точно или примерно 5×10^8 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, дозой клеток является базовая доза клеток или фиксированная доза клеток, так что доза клеток не привязана или не основана на площади поверхности тела или массе тела субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда субъектом является человек, доза содержит меньше, чем точно или примерно 5×10^8 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), *например*, в диапазоне от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 5×10^8 таких клеток, *например*, точно или примерно 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 или 5×10^8 всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, когда субъектом является человек, доза включает от точно или примерно 1×10^6 до 3×10^8 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), *например*, в диапазоне от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно 2×10^8 таких клеток, *например*, точно или примерно 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 или $1,5 \times 10^8$ таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от точно или примерно 1×10^5 до примерно 5×10^8 Т-клеток, всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), или всего Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 до точно или примерно 1×10^8 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), или всего Т-клеток, от точно или примерно 5×10^5 до точно или примерно 1×10^7 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*,

CAR), или общих Т-клеток, или от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^7 всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), или всего Т-клеток, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от точно или примерно $2,5 \times 10^7$ всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR). В некоторых вариантах осуществления, доза клеток включает введение от точно или примерно 1×10^8 Т всего клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR).

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки в дозе включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, например, где субъектом является человек, CD8+ Т-клетки в дозе, в том числе в дозе, включающей CD4+ и CD8+ Т-клетки, содержат от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 всего CD8+ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR), *например*, в диапазоне от точно или примерно 5×10^6 до точно или примерно 1×10^8 таких клеток, точно или примерно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $0,75 \times 10^8$ всего CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор, от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $2,5 \times 10^7$ всего CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор, от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $0,75 \times 10^8$ всего CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение точно или примерно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 всего CD8+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления, например, где субъектом является человек, CD4+ Т-клетки в дозе, в том числе в дозе, включающей CD4+ и CD8+ Т-клетки, содержат от точно или примерно 1×10^6 до точно или примерно 1×10^8 всего CD4+ клеток, *например*, в диапазоне от точно или примерно 5×10^6 до 1×10^8 таких клеток, точно или примерно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 всего таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеперечисленных значений. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любого из вышеуказанных значений. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток содержит введение от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $0,75 \times 10^8$ всего CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор, от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $2,5 \times 10^7$ всего CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантных рецептор, от точно или примерно 1×10^7 до точно или примерно $0,75 \times 10^8$ всего CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, все включительно. В некоторых вариантах осуществления, доза клеток

содержит введение точно или примерно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $1,5 \times 10^8$ или 5×10^8 всего CD4+ Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления, дозу клеток, *например*, Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в виде разовой дозы или вводят только один раз в течение двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, 1 года или больше.

В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной «дозы» охватывает введение данного количества или числа клеток в виде единой композиции и/или однократное непрерывное введение, *например*, в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, а также охватывает введение данного количества или числа клеток в виде дробной дозы или множества композиций, представленных в виде множества отдельных композиций или инфузий, в течение определенного периода времени, *например*, в течение не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах, дозой является однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, данное или начатое в один момент времени. Однако, в некоторых случаях, дозу вводят в виде множественных инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, *например*, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или в виде множественных инфузий в течение однодневного периода.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки дозы можно вводить путем введения множества композиций или растворов, таких как первая и вторая, необязательно несколько, каждая из которых содержит некоторое количество клеток в дозе. В некоторых аспектах, множество композиций, каждая из которых содержит разные популяции и/или подтипы клеток, вводят отдельно или независимо, необязательно, в течение определенного периода времени. *Например*, популяции или подтипы клеток могут включать CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, соответственно, и/или CD8⁺ - и CD4⁺- обогащенные

популяции, соответственно, например, CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, каждая индивидуально включающая клетки, генетически сконструированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления, введение дозы включает введение первой композиции, содержащей дозу CD8⁺ Т-клеток или дозу CD4⁺ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую из дозы CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или дозы, например введение множества клеточных композиций, включает введение клеточных композиций по отдельности. В некоторых аспектах, отдельные введения выполняют одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления, доза включает первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от точно или примерно 0 до точно или примерно 12 часов или от точно или примерно 0 до точно или примерно 6 часов или от точно или примерно 0 до точно или примерно 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем точно или примерно 2 часа, не более чем точно или примерно 1 час или не более чем точно или примерно 30 минут, не более чем точно или примерно 15 минут, не более чем точно или примерно 10 минут или не более чем точно или примерно 5 минут. В некоторых вариантах осуществления, начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем точно или примерно 2 часа, не более чем точно или примерно 1 час, или не более чем точно или примерно 30 минут, не более чем точно или примерно 15 минут, не более чем точно или примерно 10 минут или не более чем точно или примерно 5 минут.

В некоторых вариантах осуществления, первую композицию и вторую композицию смешивают перед введением субъекту. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию и вторую композицию смешивают незадолго (*например*, в течение примерно 6 часов, 5 часов, 4 часов, 3 часа, 2 часа, 1,5 часа, 1 час или 0,5 часа) перед введением. В некоторых вариантах осуществления, первую композицию и вторую композицию смешивают непосредственно перед введением.

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

В некоторых вариантах осуществления, доза или композиция клеток содержит определенное или целевое соотношение CD4⁺ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, к CD8⁺ клеткам, экспрессирующим рекомбинантный рецептор, и/или CD4⁺ клеток к CD8⁺ клеткам, это соотношение необязательно составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах, введение композиции или дозы с целевым или желаемым

соотношением различных популяций клеток (например, соотношением CD4⁺:CD8⁺ или соотношением CAR+CD4⁺:CAR+CD8⁺, например, 1:1) включает введение клеточной композиции, содержащей одну из популяций, и затем введение отдельной клеточной композиции, содержащей другую из популяций, где введение осуществляют в или приблизительно в целевом или желаемом соотношении. В некоторых аспектах, введение дозы или композиции клеток в определенном соотношении приводит к улучшенному размножению, жизнеспособности и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект получает несколько доз, *например*, две или несколько доз или несколько последовательных доз клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъект получает последовательную дозу, например, вторую дозу вводят приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 день после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, несколько последовательных доз вводят после первой дозы, так что дополнительную дозу или дозы вводят после введения последовательной дозы. В некоторых аспектах, количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, является таким же или аналогичным первой дозе и/или последовательной дозе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы больше, чем предыдущие дозы.

В некоторых аспектах, размер первой и/или последовательной дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предыдущее лечение, *например*, химиотерапию, болезненная нагрузка у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер, или степень, размер или тип метастазирования, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических результатов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых аспектах, время между введением первой дозы и введением последовательной дозы составляет от примерно 9 до примерно 35 дней, от примерно 14 до примерно 28 дней или от 15 до 27 дней. В некоторых вариантах осуществления, введение последовательной дозы происходит в момент времени более чем примерно через 14 дней после и менее чем примерно через 28 дней после введения первой дозы. В некоторых аспектах, время между первой и последующей дозой составляет примерно 21 день. В некоторых вариантах осуществления, дополнительная доза или дозы, например, последовательные дозы, вводят после введения последовательной дозы. В некоторых аспектах, дополнительную последовательную дозу или дозы вводят, по меньшей мере, примерно через 14 и менее чем примерно через 28 дней после введения предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления, дополнительную дозу вводят менее чем примерно через 14 дней после предыдущей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предыдущей дозы. В некоторых вариантах осуществления, никакую дозу не вводится менее чем через 14 дней после предыдущей дозы и/или никакую дозу не вводят

более чем через 28 дней после предыдущей дозы.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, *например*, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, содержит две дозы (например, двойную дозу), включающую первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, причем одна или обе из первой дозы и второй дозы содержат введение разделенной дозы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток обычно достаточно велика, чтобы быть эффективной для снижения болезненной нагрузки.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в желаемой дозировке, которая в некоторых аспектах, содержит желаемую дозу или количество клеток или типы клеток и/или желаемое соотношение типов клеток. Таким образом, дозировка клеток в некоторых вариантах осуществления, основана на общем количестве клеток (или количестве на кг массы тела) и желаемом соотношении отдельных популяций или подтипов, таком как соотношение CD4⁺ к CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления, дозировка клеток основана на желаемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на сочетании таких характеристик, как желаемое общее количество клеток, желаемое соотношение и желаемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

В некоторых вариантах осуществления, популяции или подтипы клеток, таких как CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, вводят при или в пределах допустимой разницы от желаемой дозы от общего количества клеток, такой как желаемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах, желаемой дозой является желаемое количество клеток или желаемое количество клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, *например*, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза составляет точно или выше минимального количества клеток или минимальное количество клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах, среди всех клеток, вводимых в желаемой дозе, отдельные популяции или подтипы присутствуют при или близко к желаемому выходному соотношению (например, соотношению CD4⁺ к CD8⁺), *например*, в пределах определенной переносимой разницы или погрешности такого соотношения.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят при или в пределах допустимой разницы от желаемой дозы одной или нескольких отдельных популяций или подтипов клеток, такой как желаемая доза клеток CD4⁺ и/или желаемая доза клеток CD8⁺. В некоторых аспектах, желаемой дозой является желаемое количество клеток подтипа или популяции или желаемое количество таких клеток на единицу массы тела субъекта, которому вводят клетки, *например*, клетки/кг. В некоторых аспектах, желаемая доза равна или превышает минимальное количество клеток популяции или подтипа или минимальное количество клеток популяции или подтипа на единицу массы тела.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на желаемой фиксированной дозе всех клеток и желаемом соотношении и/или на основе желаемой фиксированной дозы одного или нескольких, *например*, каждого из отдельных

подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, дозировка основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и желаемом соотношении CD4⁺ к CD8⁺ клеток и/или основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе CD4⁺ и/или CD8⁺ клеток.

В некоторых вариантах осуществления, клетки вводят в пределах или в пределах допустимого диапазона желаемого выходного соотношения множества популяций или подтипов клеток, таких как CD4⁺ и CD8⁺ клетки или подтипы. В некоторых аспектах, желаемое соотношение может быть конкретным соотношением или может быть диапазоном соотношений, например, в некоторых вариантах осуществления, желаемое соотношение (*например*, соотношение CD4⁺ к CD8⁺ клеткам) составляет от точно или примерно 5:1 до точно или примерно 5:1 (или больше чем примерно 1:5 и меньше чем примерно 5:1), или от точно или примерно 1:3 до точно или примерно 3:1 (или больше чем примерно 1:3 и меньше чем примерно 3:1), например, от точно или примерно 2:1 до точно или примерно 1:5 (или больше чем примерно 1:5 и меньше чем примерно 2:1, например, примерно 5:1 или примерно 4,5:1, 4:1, 3,5:1, 3:1, 2,5:1, 2:1, 1,9:1, 1,8:1, 1,7:1, 1,6:1, 1,5:1, 1,4:1, 1,3:1, 1,2:1, 1,1:1, 1:1, 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, 1:4, 1:4,5 или 1:5. В некоторых аспектах, допустимая разница находится в пределах примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50% от желаемого соотношения, включая любое значение между этими диапазонами.

В конкретных вариантах осуществления, количество и/или концентрации клеток относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (*например*, CAR). В других вариантах осуществления, количество и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех введенных клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

В некоторых аспектах, размер дозы определяется на основе одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предыдущее лечение, *например*, химиотерапию, болезненная нагрузка у субъекта, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, распространенность или тип метастаз, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических результатов, *например*, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответ хозяина против введенных клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления, способы также включают введение одной или нескольких дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или противометастатической терапии, и/или повторяют одну или несколько стадий способов. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз являются такими же, как начальная доза. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы, *например*, выше, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10

раз или более, выше начальной дозы, или ниже, *например*, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более, ниже начальной дозы. В некоторых вариантах осуществления, введение одной или нескольких дополнительных доз определяется на основе ответа субъекта на начальное лечение или любое предыдущее лечение, болезненной нагрузки у субъекта, *например*, опухолевой нагрузки, объема, размера или степени, распространенности или типа метастаз, стадии и/или вероятности или частоты развития токсических результатов у субъекта, *например*, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток.

После введения клеток, биологическую активность сконструированных популяций клеток в некоторых вариантах осуществления, измеряют, *например*, любым из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, *например*, с помощью визуализации, или *ex vivo*, *например*, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерить с использованием любых подходящих известных способов, таких как анализы цитотоксичности, описанные, *например*, в Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009) и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления, биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах, биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение опухолевой массы или нагрузки.

С. ПРОТИВОЛИМФОМНОЕ ЛЕЧЕНИЕ

В некоторых аспектах, предлагаемые способы могут дополнительно включать введение одной или нескольких противолимфомных терапий, *например*, до или одновременно с началом введения цитотоксической терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, Т-клетки, экспрессирующие CAR). В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает введение фосфамида, такого как циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия может включать введение флударабина.

В некоторых аспектах, прекондиционирование субъектов с помощью иммунодепрессирующей (*например*, противолимфомной) терапии может улучшить эффекты адоптивной клеточной терапии (АСТ). Прекондиционирование противолимфомными агентами, включая комбинации циклоспорина и флударабина, было эффективным в улучшении эффективности перенесенных лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ТИ), при клеточной терапии, в том числе для улучшения ответа и/или резистентности перенесенных клеток. *См.*, *например*, Dudley et al., *Science*, 298, 850-54 (2002); Rosenberg et al., *Clin Cancer Res*, 17(13):4550-4557 (2011). Аналогичным образом, в контексте CAR+ Т-клеток, в несколько исследований были

включены противолимфомные агенты, чаще всего циклофосфамид, флударабин, бендамустин или их комбинации, иногда сопровождаемые облучением в низких дозах. См. Han et al. *JouPHKl of Hematology & Oncology*, 6:47 (2013); Kochenderfer et al., *Blood*, 119: 2709-2720 (2012); Kalos et al., *Sci Transl Med*, 3(95):95ra73 (2011); Clinical Trial Study Record Nos.: NCT02315612; NCT01822652.

Такое предварительное кондиционирование может проводиться с целью снижения риска одного или нескольких различных исходов, которые могут снизить эффективность терапии. К ним относятся явление, известное как «цитокиновый сток», при котором Т-клетки, В-клетки, НК-клетки конкурируют с ТПЛ за гомеостатические и активирующие цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-7 и/или ИЛ-15; подавление ТПЛ регуляторными Т-клетками, НК-клетками или другими клетками иммунной системы; влияние отрицательных регуляторов в микросреде опухоли. Muranski et al., *Nat Clin Pract Oncol*. December; 3(12): 668-681 (2006).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, предложенный способ дополнительно включает введение субъекту противолимфомной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту противолимфомной терапии до начала введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, противолимфомная терапия включает химиотерапевтический агент, такой как флударабин и/или циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления, введение клеток и/или противолимфомную терапию проводят амбулаторно.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение прекондиционирующего агента, такого как противолимфомный или химиотерапевтический агент, такой как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту до начала введения дозы клеток. Например, субъекту можно вводить прекондиционирующий агент, по меньшей мере, за 2 дня до, например, по меньшей мере, за 3, 4, 5, 6 или 7 дней до первой или последующей дозы. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят прекондиционирующий агент не более чем за 7 дней до, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня до начала введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят прекондиционирующий агент между 2 и 7 включительно, например, за 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до начала введения дозы клеток.

В некоторых вариантах осуществления, субъекта прекондиционируют циклофосфамидом в дозе от примерно 20 мг/кг до 100 мг/кг, например от точно или примерно 40 мг/кг до 80 мг/кг или. В некоторых аспектах, субъекта прекондиционируют точно или примерно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят один раз в сутки в течение одного или двух дней. В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфомным агентом является циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид в дозе от точно или примерно 100 мг/м²

до 500 мг/м², например, от точно или примерно 200 мг/м² до 400 мг/м² или 250 мг/м² и 350 мг/м², включительно. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м² циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 300 мг/м² циклофосфида ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, когда противолимфомным агентом является флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе от точно или примерно 1 мг/м² до 100 мг/м², например, от точно или примерно 10 мг/м² до 75 мг/м², 15 мг/м² и 50 мг/м², 20 мг/м² и 40 мг/м², 24 мг/м² и 35 мг/м², 20 мг/м² и 30 мг/м², или 24 мг/м² и 26 мг/м². В некоторых случаях, субъекту вводят 25 мг/м² флударабина. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 30 мг/м² флударабина. В некоторых вариантах осуществления, флударабин можно вводить в виде разовой дозы или можно вводить в виде множества доз, например, ежедневно, через день или каждые три дня. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводят ежедневно, например, в течение 1-5 дней, например, в течение 3-5 дней. В некоторых случаях, субъекту вводят примерно 30 мг/м² флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, противолимфомный агент включает комбинацию агентов, такую как комбинация циклофосфида и флударабина. Таким образом, комбинация агентов может включать циклофосфамид в любой дозе или схеме введения, такой как описаны выше, и флударабин в любой дозе или схеме введения, такой как описаны выше. Например, в некоторых аспектах субъекту вводят 60 мг/кг (~2 г/м²) циклофосфида и 3-5 доз 25 мг/м² флударабина до введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят примерно 300 мг/м² циклофосфида и примерно 30 мг/м² флударабина каждый день в течение 3 дней. В некоторых вариантах осуществления, схема прекондиционирующего введения заканчивается между 2 и 7, включительно, например, за 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до начала введения дозы клеток.

В одной типовой схеме дозирования, до приема первой дозы субъекты получают противолимфомную прекондиционирующую химиотерапию циклофосфамидом и флударабином (CY/FLU), которую вводят, по меньшей мере, за два дня до первой дозы CAR-экспрессирующих клеток и обычно не более чем за 7 дней до введения клеток. В некоторых случаях, субъекта лечат ингибитором семейства BCL2, способствующего выживанию, перед получением противолимфомной химиотерапии циклофосфамидом и флударабином (CY/FLU), при которой лечение ингибитором приостанавливается или завершается, по меньшей мере, примерно за три дня до того, как субъект получит противолимфомную терапию. После прекондиционирования, субъектам вводят дозу CAR-экспрессирующих T-клеток, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления, введение прекондиционирующего агента

перед инфузией дозы клеток улучшает результат лечения. Например, в некоторых аспектах, прекондиционирование улучшает эффективность лечения дозой или увеличивает резистентность клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, прекондиционирование увеличивает выживаемость без заболевания, например долю субъектов, которые живы и не демонстрируют минимального остаточного или молекулярно определяемого заболевания по прошествии определенного периода времени после введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления, увеличивается среднее время выживаемости без заболевания.

После введения клеток субъекту (например, человеку), биологическую активность сконструированных популяций клеток в некоторых аспектах измеряют любым из ряда известных методов. Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или естественной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например, с помощью визуализации, или *ex vivo*, например, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерить с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009) и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления, биологическая активность клеток также может быть измерена путем анализа экспрессии и/или секреции определенных цитокинов, таких как CD 107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение опухолевой массы или нагрузки. В некоторых аспектах оценивают токсические результаты, резистентность и/или размножение клеток и/или наличие или отсутствие иммунного ответа хозяина.

В некоторых вариантах осуществления, введение прекондиционирующего агента перед инфузией дозы клеток улучшает результат лечения, например, за счет повышения эффективности лечения дозой или увеличения жизнестойкости клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки) у субъекта. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления, доза прекондиционирующего агента, вводимая в способе, который является комбинированной терапией с ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, и клеточной терапией, выше, чем доза, вводимая в способе без ингибитора.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ КЛЕТОК

В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат или сконструированы так, чтобы содержать сконструированный рецептор, например сконструированный антигенный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). Также представлены популяции таких клеток, композиции, содержащие такие клетки и/или обогащенные такими клетками, например, в которых клетки

определенного типа, такие как Т-клетки или клетки CD8⁺ или CD4⁺, обогащены или выбраны. Среди композиций есть фармацевтические композиции и составы для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. Также представлены терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам, например пациентам.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляют путем первой стимуляции клеток, например, путем комбинирования их со стимулом, который вызывает ответ, такой как пролиферация, выживаемость и/или активация, например, по данным экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

A. РЕКОМБИНАНТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия, например, Т-клеточная терапия, для использования в соответствии с представленными способами комбинированной терапии, включает введение сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, сконструированные для распознавания и/или специфического связывания с молекулами, ассоциированными с заболеванием или состоянием, такими как рак, и приводят к ответу, например, иммунному ответу против таких молекул при связывании с такими молекулами. Рецепторы могут включать химерные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR), и другие трансгенные антигенные рецепторы, включая трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR).

1. ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

В некоторых вариантах осуществления представленных способов и применений, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют химерные рецепторы, такие как антигенные химерные рецепторы (CAR), которые содержат один или несколько доменов, которые объединяют лиганд-связывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность к желаемому антигену (например, опухолевому антигену) с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточным сигнальным доменом является активирующая часть внутриклеточного домена, такая, как активирующий домен Т-клеток, обеспечивающий первичный сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен, способствующий эффекторным функциям. После специфического связывания с молекулой, например антигеном, рецептор обычно доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-трансдуцированный сигнал, в клетку, тем самым способствуя иммунному ответу, таргетирующему заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, химерные рецепторы, будучи генетически сконструированными в иммунных клетках, могут модулировать Т-клеточную

активность, и, в некоторых случаях, могут модулировать Т-клеточную дифференциацию или гомеостаз, тем самым давая генетически сконструированные клетки с повышенной долговечностью, выживаемостью и/или жизнестойкостью *in vivo*, например, для использования в способах адоптивной клеточной терапии.

Примеры антигенных рецепторов, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки, включают такие, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях патентных заявок США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 и 8,479,118, и заявке на европейский патент № EP2537416, и/или описанные в Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах, антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США № 7,446,190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США № 7,446,190, патент США № 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177). См. также WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, патент США № 7,446,190 и патент США № 8,389,282.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), со специфичностью в отношении определенного антигена (или маркера, или лиганда), такого как антиген, экспрессируемый на поверхности определенного типа клетки. В некоторых вариантах осуществления, антигеном, таргетируемым рецептором, является полипептид. В некоторых вариантах осуществления, это углевод или другая молекула. В некоторых вариантах осуществления, антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления, антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, который является антигенсвязывающей частью или частями молекулы антитела. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающим доменом является часть молекулы антитела, обычно переменная область тяжелой цепи (V_H) и/или переменная область легкой цепи (V_L) антитела, например, фрагмент антитела scFv. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающим доменом является

однодоменное антитело (sdAb), такое как sdFv, нанотело, $V_{\text{HН}}$ и V_{NAR} . В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, обычно переменная область тяжелой цепи (V_{H}) и/или переменная область легкой цепи (V_{L}) антитела, например, фрагмент антитела scFv. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (*например*, scFv), который специфически распознает антиген, такой как интактный антиген, экспрессируемый на поверхности клетки.

Рецепторы антигена включают CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, который также может называться TCR-подобными CAR. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для комплекса МНС-пептид TCR-подобного CAR, связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах, через линкеры и/или трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, такие молекулы обычно могут имитировать или аппроксимировать сигнал через природный антигенный рецептор, такой как TCR, и, необязательно, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

Ссылка на «главный комплекс гистосовместимости» (МНС) относится к белку, обычно гликопротеину, который содержит сайт связывания полиморфного пептида или полость связывания, которая в некоторых случаях может образовывать комплекс с пептидными антигенами полипептидов, включая пептидные антигены, процессуемые клеточным механизмом. В некоторых случаях, молекулы МНС могут экспонироваться или экспрессироваться на поверхности клетки, в том числе в виде комплекса с пептидом, *т. е.* комплекса МНС-пептид, для презентации антигена в конформации, распознаваемой рецептором антигена на Т-клетках, таким как TCR или TCR-подобное антитело. Как правило, молекулы МНС класса I являются гетеродимерами, имеющими мембрану, охватывающую α -цепь, в некоторых случаях с тремя α -доменами, и нековалентно связанный $\beta 2$ -микроглобулин. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , оба из которых обычно охватывают мембрану. Молекула МНС может включать эффективную часть МНС, которая содержит антигенсвязывающий сайт или сайты для связывания пептида, и последовательности, необходимые для распознавания подходящим антигенным рецептором. В некоторых вариантах осуществления, молекулы МНС класса I доставляют пептиды, происходящие из цитозоля, на поверхность клетки, где комплекс МНС-пептид распознается Т-клетками, такими как обычно CD8^+ Т-клетки, но в некоторых случаях CD4^+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, молекулы МНС класса II доставляют пептиды, происходящие

из везикулярной системы, на поверхность клетки, где они обычно распознаются CD4⁺ Т-клетками. Как правило, молекулы МНС кодируются группой связанных локусов, которые в совокупности называются H-2 у мышей и человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) у людей. Следовательно, обычно человеческий МНС также может называться человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA).

Термин «комплекс МНС-пептид» или «комплекс пептид-МНС» или их варианты относится к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы МНС, например, как правило, посредством нековалентных взаимодействий пептида в полости связывания или щели молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления, комплекс МНС-пептид присутствует или экспонируется на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления, комплекс МНС-пептид может специфически распознаваться антигенным рецептором, таким как TCR, TCR-подобный CAR или их антигенсвязывающие части.

В некоторых вариантах осуществления, пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп полипептида, может связываться с молекулой МНС, например, для распознавания антигенным рецептором. Обычно пептид получают из или на основе фрагмента более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления, пептид обычно имеет длину от примерно 8 до примерно 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, пептид имеет длину от примерно 9 до 22 аминокислот для распознавания в комплексе МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления, пептид имеет длину от точно или примерно 8 до 13 аминокислот для распознавания в комплексе МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления, после распознавания пептида в контексте молекулы МНС, такой как комплекс МНС-пептид, антигенный рецептор, такой как TCR или TCR-подобный CAR, продуцирует или запускает сигнал активации для Т-клетки, который индуцирует Т-клеточный ответ, такой как пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов, цитотоксический Т-клеточный ответ или другой ответ.

В некоторых вариантах осуществления, TCR-подобное антитело или антигенсвязывающая часть известны или могут быть получены известными способами (см., например, публикации патентных заявок США №№ US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; и международную публикацию № WO 03/068201).

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывается с комплексом МНС-пептид, может быть получена путем иммунизации хозяина эффективным количеством иммуногена, содержащего специфический комплекс МНС-пептид. В некоторых случаях, пептидом комплекса МНС-пептид является эпитоп антигена, способного связываться с МНС, такого как опухолевый антиген, например универсальный опухолевый антиген, миеломный антиген или другой антиген, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество иммуногена затем вводят хозяину для индукции иммунного ответа, где иммуноген сохраняет свою трехмерную форму в течение периода

времени, достаточного для того, чтобы вызвать иммунный ответ против трехмерного представления пептида в полости связывания молекулы МНС. Затем сыворотку, собранную у хозяина, анализируют, чтобы определить, продуцируются ли желаемые антитела, которые распознают трехмерное представление пептида в полости связывания молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления, полученные антитела можно оценивать для подтверждения того, что антитело может дифференцировать комплекс МНС-пептид от молекулы МНС, представляющего интерес пептида и комплекса МНС и нерелевантного пептида. Затем желаемые антитела могут быть выделены.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывается с комплексом МНС-пептид, может быть получена с использованием способов дисплея библиотеки антител, таких как библиотеки фаговых антител. В некоторых вариантах осуществления, могут быть созданы библиотеки фагового дисплея мутантных Fab, scFv или других форм антител, например, в которых члены библиотеки мутированы на одном или нескольких остатках CDR или CDR. См., *например*, публикацию заявки на патент США № US20020150914, US2014/0294841; и Cohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332.

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и содержит поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая фрагменты антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, фрагменты F(ab')₂, фрагменты Fab', фрагменты Fv, фрагменты рекомбинантного IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, фрагменты одноцепочечных антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и фрагменты однодоменных антител (*например*, sdAb, sdFv, нанотело). Термин охватывает генетически сконструированные и/или модифицированные иным образом формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, мультиспецифические, *например*, биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетратела, тандем ди-scFv, тандем три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как охватывающий функциональные фрагменты антитела. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и их подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления, константная область тяжелой цепи антитела выбрана, *например*, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, *например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (*например*, IgG1 человека). В некоторых вариантах

осуществления, константная область легкой цепи антитела выбрана, *например*, из каппа или лямбда, особенно из каппа.

Связывающие домены кодированных рекомбинантных рецепторов включают фрагменты антител. «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; области переменной тяжелой цепи (V_H), молекулы одноцепочечных антител, такие как scFv, и однодоменные V_H одиночные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В конкретных вариантах осуществления, антителами являются одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFvs.

Термины «определяющая комплементарная область» и «CDR», синонимичные «гиперпеременной области» или «HVR», известны, в некоторых случаях, для обозначения несмежных последовательностей аминокислот в переменных областях антитела, которые придают антигенную специфичность. и/или аффинность связывания. В общем, существует три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). «Каркасные области» и «FR», как известно, в некоторых случаях, относятся к не-CDR частям переменных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, имеется четыре FR в каждой переменной области полноразмерной тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой переменной области полноразмерной легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

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

Границы данной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурном выравнивании, и схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация как для

схем Kabat, так и для схем Chothia основана на наиболее распространенных длинах последовательностей области антитела с вставками, размещенными инсерционными буквами, например, «30a», и делециями, появляющимися в некоторых антителах. Две схемы помещают определенные вставки и делеции («инделлы») в разные положения, что приводит к разной нумерации. Схема «Контакт» основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях аналогична схеме нумерации Chothia. Схема AbM является компромиссом между определениями Kabat и Chothia, основанным на том, что используется в программе моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

В таблице 10 ниже перечислены типовые границы положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, как идентифицировано схемами Kabat, Chothia, AbM и Contact, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков приведена с использованием схем нумерации Kabat и Chothia. FR расположены между CDR, например, FR-L1 расположена перед CDR-L1, FR-L2 расположена между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 расположены между CDR-L2 и CDR-L3 и так далее. Следует отметить, что поскольку показанная схема нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B, конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием показанного конвенции нумерации Kabat варьируется от H32 до H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 10. Границы CDR по различным схемам нумерации.				
CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (нумерация Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (нумерация Chothia ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

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

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

Таким образом, если не указано иное, «CDR» или «определяющая комплементарность область» или отдельные заданные CDR (*например*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такой как варибельная область, следует понимать как охватывающую (или определяющую) дополнительную определяющую область, как определено любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. Например, если указано, что конкретная CDR (*например*, CDR-H3) включает аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности области V_H или V_L, подразумевается, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (*например*, CDR-H3) в варибельной области,

как определено любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. В некоторых вариантах осуществления, указаны конкретные последовательности CDR. Типовые последовательности CDR представленных антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что представленное антитело может включать CDR, как описано, в соответствии с любой из других вышеупомянутых схем нумерации или других схем нумерации, известных специалисту в данной области техники.

Аналогичным образом, если не указано иное, FR или индивидуальные определенные FR (*например*, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такой как его переменная область, следует понимать, что он охватывает (или конкретную) каркасную область, как определено любой из известных схем. В некоторых случаях, указывается схема для идентификации конкретных CDR, FR или FR или CDR, таких как CDR, как определено способом Kabat, Chothia, AbM или Contact, или другими известными схемами. В других случаях, дана конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

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

Однодоменные антитела являются фрагментами антител, содержащими весь или часть переменной домена тяжелой цепи или весь или часть переменной домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменным антителом является однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывает антиген, такой как онкомаркер или антиген клеточной поверхности таргетируемой клетки или заболевания, например опухолевой клетки или раковой клетки, такой как любой из антигенов-мишеней, описанных в настоящем документе или известных.

Фрагменты антител можно получить различными методами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитический перевар интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления, антителами являются рекомбинантно полученные фрагменты, такие как фрагменты, содержащие структуры, которые не встречаются в природе, например, с двумя или несколькими областями или цепями антитела, соединенными синтетическими линкерами, *например*, пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены

ферментным переваром интактных антител, существующих в природе. В некоторых вариантах осуществления, фрагментами антител являются scFv.

«Гуманизированным» антителом является антитело, в котором все или практически все аминокислотные остатки CDR происходят из нечеловеческих CDR, и все или практически все аминокислотные остатки FR происходят из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать, по меньшей мере, часть константной области антитела, полученной из антитела человека. «Гуманизированная форма» не человеческого антитела относится к варианту не человеческого антитела, которое подверглось гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности для человека, при сохранении специфичности и аффинности родительского не человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления, некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (*например*, антитела, из которого получены остатки CDR), *например*, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор (например, CAR), включает внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), который связывается, например специфически связывается, с антигеном (или лигандом). Среди антигенов, таргетируемых химерными рецепторами, есть антигены, экспрессируемые в контексте заболевания, состояния или типа клеток, таргетируемых адоптивной клеточной терапией. К заболеваниям и состояниям относятся пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая рак и опухоли, включая гематологический рак, рак иммунной системы, такой как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как B, T и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

В некоторых вариантах осуществления, антиген, таргетируемый рецептором, является или включает, выбранный из $\alpha\upsilon\beta 6$ интегрина ($\alpha\upsilon\beta 6$ интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1B (STAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, C-C мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина B2, рецептора эфрина A2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPC5D), Her2/neu (рецепторной

тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека А1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека А2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства А (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолиассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфический или патоген-экспрессируемый антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессированные HIV, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, таргетированные рецепторами в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, ассоциированные со злокачественным образованием В-клеток, такие как любой из множества известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления, антиген является или включает CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В некоторых вариантах осуществления, заболеванием или состоянием является злокачественное образование В-клеток, такое как В-крупноклеточная лимфома (например, DLBCL), и антигеном является CD19.

Антигены, таргетированные рецепторами, в некоторых вариантах осуществления, включают антигены, связанные со злокачественными образованиями В-клеток, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. В некоторых вариантах осуществления, антигеном, таргетированным рецептором, является CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30. В конкретных аспектах, антигеном является CD19. В некоторых вариантах осуществления, любые из таких антигенов являются антигенами, экспрессируемыми на В-клетках человека.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv или домен V_H) специфически распознает антиген, такой как CD19. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий

фрагмент получают из, или является их вариантом, антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с CD19. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD19. В некоторых вариантах осуществления, scFv включает V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD19. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела, который связывает CD19, является антитело, полученное от мыши, такое как FMC63 и SJ25C1. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела является антитело человека, например, как описано в публикации патента США № US 2016/0152723.

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

В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 из SEQ ID NO: 35, последовательность CDR-L2 из SEQ ID NO: 36 и последовательность CDR-L3 из SEQ ID NO: 37 и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 из SEQ ID NO: 38, последовательность CDR-H2 из SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR-H3 из SEQ ID NO: 40, или вариант любой из вышеуказанных, имеющий, по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности к ним. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63, указанную в SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи FMC63, указанную в SEQ ID NO: 42, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности к ним. В некоторых вариантах осуществления, переменные тяжелые и переменные легкие цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер указан в SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv кодирован последовательностью нуклеотидов, указанной в SEQ ID NO: 57, или последовательностью, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

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

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен включает V_H и/или V_L , производные от SJ25C1, которые, в некоторых аспектах, могут быть scFv. SJ25C1 является моноклональным антителом IgG1 мыши, индуцированным против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302). В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, указанные в SEQ ID NOS: 47-49, соответственно, и последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, указанные в SEQ ID NOS: 44-46 соответственно. В некоторых вариантах осуществления, антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую CDR-L1 последовательность SEQ ID NO: 44, CDR-L2 последовательность SEQ ID NO: 45 и CDR-L3 последовательность SEQ ID NO: 46 и/или переменную тяжелую цепь, содержащую CDR-H1 последовательность SEQ ID NO: 47, CDR-H2 последовательность SEQ ID NO: 48 и CDR-H3 последовательность SEQ ID NO: 49, или вариант любой из вышеуказанных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к ним. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит переменную область тяжелой цепи SJ25C1, указанную в SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи SJ25C1, указанную в SEQ ID NO: 51, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей к ним. В некоторых вариантах осуществления, переменные тяжелые и переменные легкие цепи соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления, линкер представлен в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . В некоторых вариантах осуществления, ScFv содержит, по порядку, V_L , линкер и V_H . В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 53, или последовательность, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 53.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD20. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD20. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела, который связывает CD20, является антитело, которое является или

получают из ритуксимаба, например, scFv ритуксимаба.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном является CD22. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к CD22. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела, который связывает CD22, является антитело, которое является или получено из m971, например scFv m971.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном или антигенсвязывающим доменом является ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к ВСМА. В некоторых вариантах осуществления, антителом или фрагментом антитела, который связывает ВСМА, является или содержит V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, описанных в публикациях международных патентных заявок № WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

В некоторых вариантах осуществления, антигеном или антигенсвязывающим доменом является GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, scFv содержит V_H и V_L , полученные из антитела или фрагмента антитела, специфичного к GPRC5D. В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, который связывает GPRC5D, является или включает V_H и V_L из антитела или фрагмента антитела, описанных в публикациях международных патентных заявок № WO 2016/090329 и WO 2016/090312.

В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например химерный антигенный рецептор, содержит внеклеточную часть, содержащую один или несколько лиганд- (например, антиген-) связывающих доменов, таких как антитело или его фрагмент, и одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическим сигнальным доменом или областью). В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент включает scFv. В некоторых аспектах, химерный антигенный рецептор содержит внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен является или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) и/или сигнальный домен, иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). В некоторых аспектах, рекомбинантный рецептор, например CAR, дополнительно включает спейсер и/или трансмембранный домен или часть. В некоторых аспектах, спейсер и/или трансмембранный домен может связывать внеклеточную часть, содержащую лиганд- (например, антиген-) связывающий домен и внутриклеточные сигнальные области или домены.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, такой как CAR, дополнительно включает спейсер, который может быть или включать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина или его варианта или модифицированной

версии, например, шарнирной области, *например*, шарнирной области IgG4 и/или C_{H1}/C_L и/или Fc область. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления, константной областью или частью является IgG человека, такой как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах, часть константной области служит спейсерной областью между антигенраспознающим компонентом, *например*, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную чувствительность клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В некоторых примерах, спейсер имеет точно или примерно 12 аминокислот в длину или не более 12 аминокислот в длину. Примеры спейсеров включают такие, которые содержат, по меньшей мере, примерно 10-229 аминокислот, примерно 10-200 аминокислот, примерно 10-175 аминокислот, примерно 10-150 аминокислот, примерно 10-125 аминокислот, примерно 10-100 аминокислот, примерно 10-75 аминокислот, примерно 10-50 аминокислот, примерно 10-40 аминокислот, примерно 10-30 аминокислот, примерно 10-20 аминокислот или примерно 10-15 аминокислот, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная область имеет примерно 12 аминокислот или меньше, примерно 119 аминокислот или меньше, или примерно 229 аминокислот или меньше. Типовые спейсеры включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами C_{H2} и C_{H3}, или шарнир IgG4, связанный с доменом C_{H3}. Типовые спейсеры включают, но не ограничиваются ими, такие, которые описаны в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 или публикации международной заявки на патент № WO2014031687, патенте США № 8,822,647 или опубликованной заявке № US2014/0271635.

В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, такой как только шарнирный спейсер, указанный в SEQ ID NO: 1, и кодирован последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например, и шарнир IgG4, связанный с доменами C_{H2} и/или C_{H3}. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_{H2} и C_{H3}, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный только с доменом C_{H3}, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер является или содержит последовательность, богатую глицином-серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления, константной областью или частью является IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из

SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

В некоторых аспектах, спейсером является полипептидный спейсер, который: (a) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, шарнира IgG4, или его модифицированной версии и/или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет длину примерно 12 аминокислот и/или содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4, или его модифицированной версии; или (d) состоит или содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NOS: 1, 3-5, 27-34 или 58, или вариант любой из вышеперечисленных, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ними, или (e) содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 является глицином, цистеином или аргинином, и X_2 является цистеином или треонином.

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

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

Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления, получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах, получают из любого мембраносвязанного или

трансмембранного белка. Трансмембранные области включают те, которые получены из (*т.е.* содержат, по меньшей мере, трансмембранные области) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB) или CD154. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах, синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет определен на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления, связь осуществляется линкерами, спейсерами и/или трансмембранными доменами. В некоторых аспектах, трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28 или его варианта. Внеклеточный домен и трансмембрана могут быть связаны прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления, внеклеточный домен и трансмембрана связаны спейсером, таким как любой из описанных в настоящем документе.

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

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный рецептор, например CAR, содержит, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты, такие как внутриклеточная сигнальная область или домен. Активация Т-клеток, в некоторых аспектах, описывается как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах, CAR содержит один или оба таких сигнальных компонента. Среди внутриклеточных сигнальных областей есть те, которые имитируют или приближают сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В

некоторых вариантах осуществления, присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например линкер от 2 до 10 аминокислот в длину, такой как линкер, содержащий глицины и серины, *например*, дублет глицин-серин, и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

В некоторых вариантах осуществления, после лигирования CAR, цитоплазматический домен или внутриклеточная сигнальная область CAR активирует, по меньшей мере, одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, *например*, Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах, CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, такая как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления, усеченную часть внутриклеточной сигнальной области или домена компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы используют вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, содержат цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), и в некоторых аспектах, также последовательности корецепторов, которые в природном контексте действуют совместно с такими рецепторами, чтобы инициировать трансдукцию сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, которая имеет такую же функциональную способность. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, содержат цитоплазматические последовательности области или домена, которые вовлечены в обеспечение костимулирующего сигнала.

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

В некоторых вариантах осуществления, рецептор содержит внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как CD3 цепь TCR, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, CD3 дзета цепь. Таким образом, в некоторых аспектах, антигенсвязывающая часть связана с одним или несколькими модулями клеточной передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модули клеточной передачи сигнала содержат CD3 трансмембранный домен, CD3 внутриклеточные

сигнальные домены и/или другие CD трансмембранные домены. В некоторых вариантах осуществления, рецептор, например CAR, дополнительно содержит одну или несколько дополнительных молекул, таких как Fc рецептор γ , CD8 альфа, CD8 бета, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах, CAR или другой химерный рецептор содержит химерную молекулу между CD3 дзета (CD3- ζ) или Fc рецептором γ и CD8 альфа, CD8 бета, CD4, CD25 или CD16.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная сигнальная область или домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функционального варианта или части, такой как его домен из 41 аминокислоты и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB или его функциональный вариант или часть, такой как цитоплазматический домен из 42 аминокислот 4-1BB человека (номер доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такие как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

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

В некоторых вариантах осуществления, активирующий домен включен в один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления, CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, оба экспрессируемые на одной и той же клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах, клетки включают один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления, клетки дополнительно включают ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013), такие как CAR, распознающие антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфичного для заболевания или состояния, при котором активирующий сигнал, доставляемый через таргетирующий заболевание CAR, уменьшается или ингибируется связыванием ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения эффектов вне мишени.

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

В некоторых аспектах, химерный рецептор является или включает ингибирующий CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые ослабляют или подавляют иммунный ответ, такой как ITAM- и/или костимулятор-активированный ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются те,

которые обнаруживаются на молекулах иммунных контрольных точек, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах, сконструированная клетка включает ингибирующий CAR, содержащий сигнальный домен или полученный из такой ингибирующей молекулы, так что он служит для подавления ответа клетки, например, вызванного активирующим и/или костимулирующим CAR.

В некоторых случаях, CAR называют CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения является такой, который обеспечивает только сигнал, индуцированный цепью CD3, при связывании антигена; в некоторых аспектах, CAR второго поколения является такой, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как тот, который включает внутриклеточный сигнальный домен от костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах, CAR третьего поколения, в некоторых аспектах, является такой, который включает несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

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

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

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

последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17.

В некоторых вариантах осуществления, маркером является молекула, например белок клеточной поверхности, не определяемый в природе на Т-клетках или не определяемый в природе на поверхности Т-клеток, или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, молекулой является чужеродная молекула, например, чужеродный белок, то есть белок, который не распознается как «собственный» иммунной системой хозяина, в которую клетки будут адоптивно переноситься.

В некоторых вариантах осуществления, маркер не выполняет терапевтических функций и/или не производит никакого действия, кроме использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для отбора успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления, маркером может быть терапевтическая молекула или молекула, в противном случае оказывающая некоторый желаемый эффект, например лиганд для клетки, встречающейся *in vivo*, такая, как молекула костимулирующей или иммунной контрольной точки для усиления и/или подавления ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или его функциональный вариант, и сигнальную часть дзета CD3 или его функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который является или содержит трансмембранную часть CD28 или его функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или его функциональный вариант, и сигнальную часть дзета CD3 или его функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления, рецептор дополнительно содержит спейсер, содержащий часть молекулы Ig, например, молекулы Ig человека, такую как шарнир Ig, например шарнир IgG4, такой как только шарнирный спейсер.

В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, является или включает трансмембранный домен CD28 человека (например, номер доступа P01747.1) или его вариант, такой как трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8; в некоторых вариантах осуществления, часть рекомбинантного рецептора, содержащая трансмембранный домен, содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, имеющую, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к ней.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточные сигнальные компоненты рекомбинантного рецептора, *например*, CAR содержат внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такой как домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. Например, внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный домен содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен 4-1BB (например, номер доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такой как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен рекомбинантного рецептора, *например*, CAR, содержит стимулирующий сигнальный домен CD3 дзета человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3ζ человека (номер доступа: P20963.2) или сигнальный домен CD3 дзета, как описано в патенте США № 7,446,190 или патенте США № 8,911,993. Например, в некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

В некоторых аспектах, спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнир IgG4 или IgG1, такой как только шарнирный спейсер, указанный в SEQ ID NO: 1, и кодирован последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 2. В других вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например, и шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и/или C_H3. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например, шарнир IgG4, связанный с доменами C_H2 и C_H3, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления, спейсером является шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный только с доменом C_H3, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления, спейсер является или содержит последовательность, богатую глицином-серином, или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления, константной областью или частью является IgD. В некоторых вариантах осуществления, спейсер имеет последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления,

спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

Например, в некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFvs, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть молекулы иммуноглобулина, такую как шарнирная область и/или одна или несколько константных областей тяжелой цепи молекулы, такой как спейсер, содержащий шарнир Ig, трансмембранный домен, содержащий весь или часть трансмембранного домена CD28, полученный из CD28 внутриклеточный сигнальный домен и сигнальный домен CD3 дзета. В некоторых вариантах осуществления, CAR содержит антитело или фрагмент, такой как scFv, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнир Ig, трансмембранный домен, полученный из CD28, внутриклеточный сигнальный домен, полученный из 4-1BB, и сигнальный домен, полученный из CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие такие конструкции CAR, дополнительно содержат последовательность, кодирующую элемент проскока рибосомы T2A и/или последовательность tEGFR, например, ниже последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует элемент проскока рибосомы T2A, указанный в SEQ ID NO: 6 или 17, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 6 или 17. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки, экспрессирующие антигенный рецептор (например, CAR), также могут быть созданы для экспрессии усеченного EGFR (EGFRt) в качестве не иммуногенного эпитопа селекции (например, путем введения конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенных переключателем рибосомы T2A, для экспрессии двух белков из одной конструкции), который затем можно использовать в качестве маркера для определения таких клеток (см., например, патент США № 8,802,374). В некоторых вариантах осуществления, последовательность кодирует последовательность tEGFR, указанную в SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая включает, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 7 или 16. В некоторых случаях, пептид, такой как T2A, может вызвать проскок рибосомы (проскок рибосомы) синтез пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующим пептидом ниже по течению (см., например, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) and deFelipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)). Известно много элементов 2A. Примеры последовательностей 2A, которые могут быть использованы в способах и нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем документе, без ограничения, последовательности 2A из вируса ящура (F2A, например, SEQ ID NO: 21), вируса ринита А лошадей (E2A, например,

SEQ ID NO: 20), вируса *Thosea asigna* (T2A, *например*, SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса свиньи-1 (P2A, *например*, SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в публикации патента США № 20070116690.

В некоторых из вариантов осуществления, CAR содержит, в определенном порядке, scFv, специфичный для антигена, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, которая необязательно является или содержит 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, которая необязательно является или включает сигнальный домен CD3дзета и, необязательно, дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv;

В некоторых из вариантов осуществления, CAR содержит, в определенном порядке, scFv, специфичный для антигена, трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, который необязательно является или содержит сигнальный домен 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, полученный из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, которая необязательно является сигнальным доменом CD3дзета.

В некоторых из вариантов осуществления, CAR содержит или состоит из, в определенном порядке, scFv, специфичного для антигена, спейсера, трансмембранного домена, цитоплазматического сигнального домена, полученного из костимулирующей молекулы, которая необязательно является сигнальным доменом 4-1BB, и цитоплазматического сигнального домена, полученного из первичной сигнальной ITAM-содержащей молекулы, которая необязательно является или включает сигнальный домен CD3дзета. В некоторых аспектах, спейсером является полипептидный спейсер, который (а) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина или его модифицированной версии, или содержит примерно 15 аминокислот или меньше, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно шарнира IgG4, или его модифицированной версии и/или содержит примерно 15 аминокислот или меньше и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет примерно 12 аминокислот в длину и/или содержит или состоит из всего или части шарнира иммуноглобулина, необязательно, IgG4 или его модифицированной версии; или (d) имеет или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1, последовательности, кодированной SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или вариантом любой из вышеперечисленных, имеющим, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности, или (e) содержит или состоит из формулы X_1PPX_2P , где X_1 является глицин, цистеин или аргинин, и X_2 является цистеин или треонин; и/или костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к ней; и/или первичный

сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, или 14, или 15, или их вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности к ним; и/или scFv содержит CDRL1 последовательность RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), CDRL2 последовательность SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или CDRL3 последовательность GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) и/или CDRH1 последовательность DYGVVS (SEQ ID NO: 38), CDRH2 последовательность VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или CDRH3 последовательность YAMDYWG (SEQ ID NO: 40), или где scFv содержит переменную область тяжелой цепи FMC63 и переменную область легкой цепи FMC63 и/или CDRL1 последовательность FMC63, CDRL2 последовательность FMC63, CDRL3 последовательность FMC63, CDRH1 последовательность FMC63, CDRH2 последовательность FMC63 и CDRH3 последовательность FMC63 или связывается с тем же эпитопом, что и любой из вышеперечисленных, или конкурирует за связывание с ним, и, необязательно, где scFv содержит, по порядку, V_H , линкер, необязательно содержащий SEQ ID NO: 59, и V_L , и/или scFv содержит гибкий линкер и/или содержит аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности, трансмембранный домен является CD28 или содержит SEQ ID NO: 9 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней, scFv содержит связывающий домен или CDR или V_H и V_L FMC63, первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15 и/или ее вариант, содержащий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из SEQ ID NO: 30, костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности, трансмембранный домен является CD28 или содержит SEQ ID NO: 9 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с ней, scFv содержит связывающий домен или CDR или V_H и V_L FMC63, первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15 и/или их вариант, содержащий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из SEQ ID NO: 31, костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% или более идентичность последовательности, трансмембранный домен является CD28 или содержит SEQ ID NO: 9 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними, scFv содержит связывающий домен или CDR или V_H и V_L FMC63, первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15 и/или их вариант, содержащий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из SEQ ID NO: 33, костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности, трансмембранный домен является CD28 или содержит SEQ ID NO: 9 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними, scFv содержит связывающий домен или CDR или V_H и V_L FMC63, первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15 и/или их вариант, содержащий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними.

В некоторых вариантах осуществления, спейсер содержит или состоит из SEQ ID NO: 34, костимулирующий домен содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности, трансмембранный домен является CD28 или содержит SEQ ID NO: 9 или ее вариант, имеющий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними, scFv содержит связывающий домен или CDR или V_H и V_L FMC63, первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 13, 14 или 15 и/или их вариант, содержащий, по меньшей мере, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательностей с ними.

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, вводимыми субъекту, обычно распознают или специфически связываются с молекулой, которая экспрессируется, ассоциирована и/или специфична для заболевания или состояния или их клеток, подлежащих лечению. После специфического связывания с молекулой, например антигеном, рецептор обычно доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как сигнал, трансдуцированный ITAM, в клетку, тем самым способствуя иммунному ответу, направленному на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют CAR, который специфически связывается с антигеном, экспрессируемым клеткой или тканью заболевания или состояния или связанным с заболеванием или состоянием.

2. Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, используемые в связи с представленными способами, применениями, готовыми изделиями или композициями, являются клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которая распознает пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок.

В некоторых вариантах осуществления, «Т-клеточный рецептор» или «TCR» является молекулой, которая содержит переменные α и β цепи (также известные как TCR α и TCR β , соответственно) или переменные γ и δ цепи (также известные как TCR γ и TCR δ , соответственно) или их антигенсвязывающие части, и которая способна специфически связываться с пептидом, связанным с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления, TCR находится в форме $\alpha\beta$. В некоторых вариантах осуществления, TCR, которые существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, в целом структурно подобны, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические локации или функции. TCR можно найти на поверхности клетки или в растворимой форме. Обычно, TCR может быть найден на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Если не указано иное, термин «TCR» следует понимать как включающий полные TCR, а также их антигенсвязывающие части или их антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления, TCR является интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в $\alpha\beta$ форме или $\gamma\delta$ форме. В некоторых вариантах осуществления, TCR является антигенсвязывающей частью, которая меньше полноразмерного TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным в молекуле МНС, например, связывается с комплексом МНС-пептид. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но все же может связывать пептидный эпитоп, такой как комплекс МНС-пептид, с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях, антигенсвязывающая часть содержит переменные домены в TCR, такие как переменная α цепь и переменная β цепь TCR, достаточные для образования сайта связывания для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид. Обычно переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, участвующие в распознавании пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

В некоторых вариантах осуществления, переменные домены кодированного TCR содержат гиперпеременные петли или определяющие комплементарность области (CDR), которые обычно вносят основной вклад в распознавание антигена и способности связывания и специфичность. В некоторых вариантах осуществления, CDR TCR или их комбинации формируют весь или по существу весь антигенсвязывающий сайт данной молекулы TCR. Различные CDR в переменной области цепи TCR обычно разделены

каркасными областями (FR), которые обычно демонстрируют меньшую вариабельность среди молекул TCR по сравнению с CDR (см., например, Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988; см. также Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления, CDR3 является основной CDR, ответственной за связывание или специфичность антигена, или является наиболее важной из трех CDR в данной вариабельной области TCR для распознавания антигена и/или для взаимодействия с процессированной пептидной частью комплекса пептид-МНС. В некоторых контекстах, CDR1 альфа-цепи может взаимодействовать с N-концевой частью определенных антигенных пептидов. В некоторых контекстах, CDR1 бета-цепи может взаимодействовать с С-концевой частью пептида. В некоторых контекстах, CDR2 вносит наибольший вклад или является первичной CDR, ответственной за взаимодействие или распознавание МНС части комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления, вариабельная область β -цепи может содержать дополнительную гипервариабельную область (CDR4 или HVR4), которая обычно вовлечена в связывании суперантигена, но не в распознавание антигена (Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426).

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997). В некоторых аспектах, каждая цепь TCR может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конце. В некоторых вариантах осуществления, TCR ассоциирован с инвариантными белками комплекса CD3, вовлеченными в опосредование трансдукции сигнала.

В некоторых вариантах осуществления, кодированная цепь TCR содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например, α цепи или β цепи) может содержать два иммуноглобулиноподобных доменов, таких как переменный домен (например, $V\alpha$ или $V\beta$; обычно аминокислоты 1-116 на основе нумерации Kabat, Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) и константный домен (например, константный домен α цепи или $C\alpha$, как правило, положения 117-259 цепи на основе нумерации Kabat, или константный домен β цепи или домен $C\beta$, как правило, положения 117-295 цепи на основе Kabat), прилегающие к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях, внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два константных домена, проксимальных к мембране и два вариабельных домена, расположенных дистально, каждый из которых содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, тем самым связывая две цепи TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR может иметь

дополнительный остаток цистеина в каждой из α и β цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

В некоторых вариантах осуществления, кодированные цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, трансмембранный домен положительно заряжен. В некоторых случаях, цепь TCR содержит цитоплазматический хвост. В некоторых случаях, структура позволяет TCR ассоциироваться с другими молекулами, такими как CD3 и их субъединицы. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может заякорить белок в клеточной мембране и ассоциироваться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3. Внутриклеточные хвосты CD3 сигнальных субъединиц (например, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ цепи) содержат один или несколько иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов или ITAM, которые участвуют в сигнальной способности комплекса TCR.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR может быть гетеродимером из двух цепей α и β (или, необязательно, γ и δ), или он может быть конструкцией одноцепочечного TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (α и β цепи или γ и δ цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR может быть создан из известных последовательностей TCR, таких как последовательности V α , β цепей, для которых по существу полноразмерная кодирующая последовательность легко доступна. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V цепи, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, могут быть получены из различных источников, таких как амплификация полимеразной цепной реакцией (ПЦР) нуклеиновых кислот, кодирующих TCR, в данной клетке или клетках или выделенных из них, или синтез общедоступных ДНК последовательностей TCR.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR получают из биологического источника, например, из клеток, таких как Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), Т-клеточных гибридом или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки могут быть получены из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, TCR является тимически выбранный TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является неопитоп-рестриктированный TCR. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетками могут быть культивированная Т-клеточная гибридома или клон. В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены синтетически на основе знания последовательности TCR.

В некоторых вариантах осуществления, кодированный TCR создают из TCR, идентифицированного или выбранного в результате скрининга библиотеки кандидатных TCR против полипептидного антигена-мишени, или его Т-клеточного эпитопа-мишени.

Библиотеки TCR могут быть созданы амплификацией репертуара V α и V β из T-клеток, выделенных от субъекта, включая клетки, присутствующие в PBMC, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях, T-клетки могут быть амплифицированы из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR могут быть созданы из клеток CD4⁺ или CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут быть амплифицированы из источника T-клеток нормального здорового субъекта, то есть из нормальных библиотек TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR могут быть амплифицированы из источника T-клеток больного субъекта, то есть библиотек болезненных TCR. В некоторых вариантах осуществления, вырожденные праймеры используют для амплификации репертуара генов V α и V β , например, с помощью ОТ-ПЦР в образцах, таких как T-клетки, полученные от человека. В некоторых вариантах осуществления, scTv библиотеки могут быть собраны из наивных библиотек V α и V β , в которых амплифицированные продукты клонированы или собраны для разделения с помощью линкера. В зависимости от источника субъекта и клеток, библиотеки могут быть HLA аллель-специфичными. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления, библиотеки TCR могут быть созданы путем мутагенеза или диверсификации исходной или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах, TCR подвергаются направленной эволюции, такой как мутагенез, например, α или β цепи. В некоторых аспектах, изменяют конкретные остатки в CDR TCR. В некоторых вариантах осуществления, выбранные TCR могут быть модифицированы созреванием аффинности. В некоторых вариантах осуществления, антигенспецифические T-клетки могут быть выбраны, например, путем скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах, кодированные TCR, например, присутствующие на антигенспецифических T-клетках, могут быть выбраны, например, по активности связывания, например, определенной аффинности или avidности к антигену.

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающая часть является модифицированной или сконструированной. В некоторых вариантах осуществления, способы направленной эволюции используют для создания TCR с измененными свойствами, например с более высокой аффинностью к конкретному комплексу MHC-пептид. В некоторых вариантах осуществления, направленная эволюция достигается с помощью способов дисплея, включая, помимо прочего, дрожжевой дисплей (Holler et al. (2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92), фаговый дисплей (Li et al. (2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54) или T-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления, методы дисплея включают конструирование или модификацию известного, родительского или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях, TCR дикого типа можно использовать в качестве матрицы для получения мутагенизированных TCR, в которых один или несколько остатков CDR мутированы, и выбора мутантов с желаемым измененным свойством, таким как более высокая аффинность к желаемому антигену-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, пептиды полипептида-мишени для использования при продуцировании или генерировании представляющего интерес TCR известны или могут быть легко идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления, пептиды, подходящие для использования в создании TCR или антигенсвязывающих частей, могут быть определены на основе присутствия HLA-рестриктированного мотива в представляющем интерес полипептиде-мишени, таком как полипептид-мишень, описанный ниже. В некоторых вариантах осуществления, пептиды идентифицируют с использованием доступных компьютерных моделей прогнозирования. В некоторых вариантах осуществления, для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, но не ограничиваются ими, ProPred1 (Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237, и SYFPEITHI (см. Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007). В некоторых вариантах осуществления, MHC-рестриктированным эпитопом является HLA-A0201, который экспрессируется приблизительно у 39-46% всех европеоидов и, следовательно, является подходящим выбором MHC антигена для использования при получении TCR или другой молекулы, связывающей MHC-пептид.

Компьютерные модели прогнозирования с использованием HLA-A0201-связывающих мотивов и сайтов расщепления протеасом и иммунных протеасом, известны. Для прогнозирования сайтов связывания MHC класса I такие модели включают, но не ограничиваются ими, ProPred1 (более подробно описанный в Singh и Raghava, ProPred: прогнозирование сайтов связывания HLA-DR. *BIOINFORMATICS* 17 (12): 1236-1237 2001) и SYFPEITHI (см. Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007)

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающей частью может быть рекомбинантно полученный природный белок или его мутированная форма, в которой было изменено одно или несколько свойств, таких как характеристика связывания. В некоторых вариантах осуществления, TCR может быть получен из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может быть связанным с клетками или в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления, для целей представленных способов, TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления, TCR является полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления, TCR является антигенсвязывающей частью. В некоторых вариантах осуществления, TCR является димерный TCR (dTTCR). В некоторых вариантах осуществления, TCR является одноцепочечным TCR (scTCR). В некоторых вариантах осуществления, dTTCR или scTCR имеют структуры, как описано, например, в публикации международной заявки на патент № WO 03/020763, WO 04/033685 и WO 2011/044186.

В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность,

соответствующую трансмембранной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит последовательность, соответствующую цитоплазматическим последовательностям. В некоторых вариантах осуществления, TCR способен образовывать комплекс TCR с CD3. В некоторых вариантах осуществления, любой из рекомбинантных TCR, включая dTCR или scTCR, может быть связан с сигнальными доменами, которые дают активный TCR на поверхности Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный TCR экспрессируется на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления, dTCR содержит первый полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области α цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α цепи TCR, и второй полипептид, в котором последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β цепи TCR слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области β цепи TCR, где первый и второй полипептиды связаны дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления, связь может соответствовать нативной межцепочечной дисульфидной связи, присутствующей в нативных димерных $\alpha\beta$ TCR. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечные дисульфидные связи не присутствуют в нативном TCR. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области полипептидной пары dTCR. В некоторых случаях, может быть желательной как нативная, так и не нативная дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления, TCR содержит трансмембранную последовательность для фиксации на мембране.

В некоторых вариантах осуществления, dTCR включает α цепь TCR, содержащую вариабельный α домен, константный α домен и первый мотив димеризации, прикрепленный к С-концу константного α домена, и β цепь TCR, содержащую вариабельный β домен, константный β домен и первый мотив димеризации, присоединенный к С-концу константного β домена, где первый и второй мотивы димеризации легко взаимодействуют с образованием ковалентной связи между аминокислотой в первом мотиве димеризации и аминокислотой во втором мотиве димеризации, связывающей α цепь TCR и β цепь TCR вместе.

В некоторых вариантах осуществления, TCR является scTCR. Обычно scTCR можно генерировать с использованием известных способов, см., например, Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); публикациях международной патентной заявки №№ WO 96/13593, WO 96/18105, WO 99/60120, WO 99/18129, WO 03/020763, WO 2011/044186; и Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит введенную не нативную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации TCR цепей (см.,

например, публикацию международной патентной заявки № WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления, scTCR является усеченный TCR без дисульфидной связи, в котором гетерологичные лейциновые «молнии», слитые с его С-концом, способствуют ассоциации цепи (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 99/60120). В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит переменный домен TCR α , ковалентно связанный с переменным доменом TCR β через пептидный линкер (см., например, публикацию международной патентной заявки № WO 99/18129).

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из аминокислотной последовательности, соответствующей переменной области TCR α цепи, второй сегмент, образованный аминокислотной последовательностью, соответствующей переменной области TCR β цепи, слитой с N-концом аминокислотной последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константного домена TCR β цепи, и линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области α цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена α цепи, и второй сегмент, образованный последовательностью переменной области β цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной и трансмембранной последовательности β цепи и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности переменной области TCR β цепи, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена β цепи, и второй сегмент, образованный последовательностью переменной области α цепи, слитой с N-концом внеклеточной константной и трансмембранной последовательности α цепи и, необязательно, линкерную последовательность, связывающую С-конец первого сегмента с N-концом второго сегмента.

В некоторых вариантах осуществления, линкер scTCR, который связывает первый и второй сегменты TCR, может быть любым линкером, способным образовывать одну полипептидную цепь, сохраняя при этом специфичность связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления, линкерная последовательность может, например, иметь формулу -P-AA-P-, где P является пролином, и AA является аминокислотной последовательностью, в которой аминокислотами являются глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй сегменты спарены так, что их последовательности переменной области ориентированы для такого связывания. Следовательно, в некоторых случаях, линкер имеет достаточную длину, чтобы охватить расстояние между С-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но он не слишком длинный, чтобы блокировать или уменьшать связывание

scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать от точно или примерно 10 до 45 аминокислот, например, от 10 до 30 аминокислот или от 26 до 41 аминокислотных остатков, например, 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет формулу -PGGG-(SGGGG)₅-P-, где P является пролином, G является глицином и S является серином (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления, линкер имеет последовательность GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO: 23).

В некоторых вариантах осуществления, scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток иммуноглобулиновой области константного домена α цепи с остатком иммуноглобулиновой области константного домена β цепи. В некоторых вариантах осуществления, межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR не присутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько цистеинов могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях, может быть желательна как нативная, так и не нативная дисульфидная связь.

В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащих введенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько нативных цистеинов, образующих природные межцепочечные дисульфидные связи, заменены другим остатком, таким как серин или аланин. В некоторых вариантах осуществления, введенная или сконструированная дисульфидная связь может быть образована путем мутации не цистеиновых остатков в первом и втором сегментах до цистеина. Примеры не нативных дисульфидных связей TCR описаны в опубликованной международной заявке РСТ № WO2006/000830.

В некоторых вариантах осуществления, TCR или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует аффинность с равновесной константой диссоциации (K_D) для антигена-мишени от точно или примерно 10^{-5} до 10^{-12} М или все индивидуальные значения и диапазоны в этом диапазоне. В некоторых вариантах осуществления, антигеном-мишенью является комплекс МНС-пептид или лиганд.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, такие как α и β цепи, могут быть амплифицированы с помощью ПЦР, клонирования или других подходящих средств и клонированы в подходящий вектор или векторы экспрессии. Вектор экспрессии может быть любым подходящим рекомбинантным вектором экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии, или и того, и другого, такие как плазмиды и вирусы.

В некоторых вариантах осуществления, вектором может быть вектор из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), серии pET (Novagen, Madison, Wis), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) или серии pEX (Clontech,

Palo Alto, Calif). В некоторых случаях, также можно использовать векторы бактериофагов, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать растительные векторы экспрессии, которые включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, животные векторы экспрессии включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления, используют вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления, векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который должен быть введен вектор, как уместно и с учетом того, является ли вектор вектором на основе ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления, вектор может содержать не нативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или антигенсвязывающую часть (или другую молекулу, связывающую МНС-пептид). В некоторых вариантах осуществления, промотором может быть не вирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, определенный в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Рассматриваются также другие известные промоторы.

В некоторых вариантах осуществления, для создания вектора, кодирующего TCR, цепи α и β амплифицируют с помощью ПЦР из общей кДНК, выделенной из клона Т-клетки, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, α и β цепи клонированы в один и тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления, α и β цепи клонированы в разные векторы. В некоторых вариантах осуществления, образованные α и β цепи введены в ретровирусный, например лентивирусный, вектор. Генетически сконструированные клетки и способы продуцирования клеток

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают введение субъекту, страдающему заболеванием или состоянием, клеток, экспрессирующих рекомбинантный антигенный рецептор. Различные способы введения компонентов, созданных с помощью генной инженерии, например рекомбинантных рецепторов, например CAR или TCR, хорошо известны и могут использоваться с представленными способами и композициями. Типовые способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе через вирусные, например, ретровирусные или лентивирусные, трансдукцию, транспозоны и электропорацию.

Клетки, экспрессирующие рецепторы и вводимые предлагаемыми способами, включают сконструированные клетки. Генная инженерия обычно включает введение

нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или сконструированный компонент, в композицию, содержащую клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

В. СПОСОБЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ

В конкретных вариантах осуществления, сконструированные клетки получают процессом, который создает выходную композицию обогащенных Т-клеток из одной или нескольких входных композиций и/или из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, выходная композиция содержит клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например CAR, такой как анти-CD19 CAR. В конкретных вариантах осуществления, клетки выходящих композиций подходят для введения субъекту в качестве терапии, например, аутологичной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, выходной композицией является композиция обогащенных CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, процессом создания или продуцирования сконструированных клеток является процесс, который включает некоторые или все стадии: сбор или получение биологического образца; выделение, селекцию или обогащение входных клеток из биологического образца; криоконсервация и хранение входных клеток; размораживание и/или инкубация входных клеток в стимулирующих условиях; конструирование стимулированных клеток для экспрессии или содержания рекомбинантного полинуклеотида, например полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор, такой как CAR; культивирование сконструированных клеток, например, до порогового количества, плотности или увеличения; составление культивируемых клеток в выходной композиции; и/или криоконсервация и хранение приготовленных выходных клеток до тех пор, пока клетки не будут выделены для инфузии и/или не станут подходящими для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, процесс выполняют с двумя или несколькими вводимыми композициями обогащенных Т-клеток, такими как отдельная композиция CD4⁺ и отдельная композиция CD8⁺, которые отдельно обрабатываются и конструируются из одного и того же начального или исходного биологического образца и повторно вводятся обратно субъекту в определенном соотношении, например соотношении CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток 1:1. В некоторых вариантах осуществления, обогащенные Т-клетки являются или включают сконструированные Т-клетки, например, Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии рекомбинантного рецептора.

В конкретных вариантах осуществления, выходную композицию сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), продуцируют из исходной и/или входной композиции клеток. В некоторых вариантах осуществления, входной композицией является композиция обогащенных CD3⁺ Т-клеток, обогащенных CD4⁺ Т-клеток и/или обогащенных CD8⁺ Т-клеток (далее также называемая композициями обогащенных Т-клеток, композициями обогащенных CD4⁺ Т-клеток и композициями обогащенных CD8⁺ Т-клеток,

соответственно). В некоторых вариантах осуществления, композиция, обогащенная CD4+ Т-клетками, содержит, по меньшей мере, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD4+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, композиция обогащенных CD4+ Т-клеток содержит примерно 100% CD4+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD4+ Т-клеток включает или содержит менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD8+ Т-клеток и/или не содержит CD8+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных CD4+Т-клеток состоят в основном из CD4+Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция, обогащенная CD8+ Т-клетками, содержит, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD8+ Т-клеток, или содержит или включает примерно 100% CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD8+ Т-клеток содержит или включает менее 20%, менее 10%, менее 5%, менее 1%, менее 0,1% или менее 0,01% CD4+ Т-клеток и/или не содержит CD4+ Т-клетки, и/или не содержит или по существу не содержит CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяции обогащенных CD8+ Т-клеток состоят в основном из CD8+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, композиция, обогащенная CD3+ Т-клетками, содержит, по меньшей мере, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% CD3+ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления, композиция обогащенных CD3+ Т-клеток содержит примерно 100% CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, композиция обогащенных CD3+ Т-клеток содержит CD4+ и CD8+ Т-клетки, которые находятся в соотношении CD4+ Т-клеток к CD8+ Т-клеткам от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например, приблизительно 1:1.

В некоторых вариантах осуществления, процесс продуцирования сконструированных клеток может дополнительно включать одно или несколько из: активации и/или стимуляции клеток, например клеток входящей композиции; генетического конструирования активированных и/или стимулированных клеток, например, для введения полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный белок, путем трансдукции или трансфекции; и/или культивирования сконструированных клеток, например, в условиях, способствующих пролиферации и/или экспансии. В конкретных вариантах осуществления, представленные способы можно использовать в связи со сбором, сбором и/или составлением выходных композиций, полученных после того, как клетки были инкубированы, активированы, стимулированы, сконструированы, трансдуцированы, трансфицированы и/или культивированы.

В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки, такие как те, которые экспрессируют анти-CD19 CAR, используемые в соответствии с представленными способами, продуцируются или создаются в процессе отбора, выделения, активации, стимуляции, размножения, культивирования и/или формулирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, такие способы включают

любые из описанных.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одну отдельную композицию обогащенных CD4⁺ Т-клеток и, по меньшей мере, одну отдельную композицию обогащенных CD8⁺ Т-клеток выделяют, селективируют, обогащают или получают из одного биологического образца, например образца РВМС или других белых клеток крови от одного и того же донора, например, пациента или здорового индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, отдельную композицию обогащенных CD4⁺ Т-клеток и отдельную композицию обогащенных CD8⁺ Т-клеток, происходящих, например, первоначально выделенных, селективированных и/или обогащенных, из одного и того же биологического образца, такого как единственный биологический образец, получают, собирают и/или берут у одного субъекта. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец сначала подвергают селекции CD4⁺ Т-клеток, где сохраняют как отрицательную, так и положительную фракцию, и отрицательную фракцию дополнительно подвергают селекции CD8⁺ Т-клеток. В других вариантах осуществления, биологический образец сначала подвергают селекции CD8⁺ Т-клеток, где сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции, и отрицательную фракцию дополнительно подвергают селекции CD4⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, способы селекции проводят, как описано в международной публикации РСТ № WO2015/164675. В некоторых аспектах биологический образец сначала положительно селективируют на CD8⁺ Т-клетки для создания, по меньшей мере, одной композиции обогащенных CD8⁺ Т-клеток, и затем отрицательную фракцию отбирают положительно для CD4⁺ Т-клеток для создания, по меньшей мере, одной композиции обогащенных CD4⁺ Т-клеток, так что по меньшей мере одна композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток и, по меньшей мере, одна композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток являются отдельными композициями из одного и того же биологического образца, например, от одного и того же пациента-донора или здорового индивидуума. В некоторых аспектах, две или несколько отдельных композиций обогащенных Т-клеток, например, по меньшей мере, одна из которых является композицией обогащенных CD4⁺ Т-клеток и, по меньшей мере, одна из которых является отдельной композицией обогащенных CD8⁺ Т-клеток от одного и того же донора, отдельно замораживают, например, криозащищают или криоконсервируют в среде для криоконсервации.

В некоторых аспектах, две или несколько отдельных композиций, обогащенных Т-клетками, например, по меньшей мере, одной из которых является композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток, и, по меньшей мере, одной из которых является отдельная композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток из одного и того же биологического образца, активируют и/или стимулируют контактом со стимулирующим реагентом (например, инкубацией с магнитными гранулами, конъюгированными с CD3/CD28, для активации Т-клеток). В некоторых аспектах, каждую из активированных/стимулированных клеточных композиций конструируют, трансдуцируют и/или трансфицируют, например, с

использованием вирусного вектора, кодирующего рекомбинантный белок (например, CAR), для экспрессии одного и того же рекомбинантного белка в CD4⁺ Т-клетках и CD8⁺ Т-клетках каждой клеточной композиции. В некоторых аспектах, способ включает удаление стимулирующего реагента, например, магнитных гранул, из клеточной композиции. В некоторых аспектах, клеточную композицию, содержащую сконструированные CD4⁺ Т-клетки, и клеточную композицию, содержащую сконструированные CD8⁺ Т-клетки, культивируют отдельно, например, для раздельного размножения в них популяций CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную композицию после культивирования собирают, и/или собирают, и/или составляют, например, промыванием клеточной композиции в буфере для состава. В некоторых вариантах осуществления, клеточную композицию, содержащую CD4⁺ Т-клетки, и клеточную композицию, содержащую CD8⁺ Т-клетки, замораживают, например, подвергают криозащите или криоконсервации в среде для криоконсервации. В некоторых аспектах, сконструированные Т-клетки CD4⁺ и Т-клетки CD8⁺ в каждом составе происходят от одного и того же донора или биологического образца и экспрессируют один и тот же рекомбинантный белок (например, CAR, такой как анти-CD19 CAR). В некоторых аспектах, отдельный сконструированный состав CD4⁺ и отдельный сконструированный состав CD8⁺ вводят в определенном соотношении, например, 1:1, нуждающемуся в этом субъекту, такому как тот же донор.

В некоторых аспектах две или более отдельных композиций обогащенных Т-клеток, например, по меньшей мере, одной из которых является композиция обогащенных CD4⁺ Т-клеток, и, по меньшей мере, одной из которых является отдельная композиция обогащенных CD8⁺ Т-клеток из одного и того же биологического образца, выбранного из образца от субъекта, и затем объединяют в определенном соотношении, например 1:1. В некоторых вариантах осуществления, комбинированную композицию, обогащенную CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, активируют и/или стимулируют через контакт со стимулирующим реагентом (например, инкубацией с конъюгированными с CD3/CD28 магнитными гранулами для активации Т-клеток). В некоторых аспектах, композицию активированных/стимулированных клеток конструируют, трансдуцируют и/или трансфицируют, например, с использованием вирусного вектора, кодирующего рекомбинантный белок (например, CAR), для экспрессии рекомбинантного белка в CD4⁺ Т-клетках и CD8⁺ Т-клетках клеточной композиции. В некоторых аспектах, способ включает удаление стимулирующего реагента, например, магнитных гранул, из клеточной композиции. В некоторых аспектах, клеточную композицию, содержащую сконструированные CD4⁺ Т-клетки и сконструированные CD8⁺ Т-клетки, культивируют, например, для размножения в них популяций CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную композицию после культивирования собирают и/или собирают и/или составляют, например, промывая клеточную композицию в буфере для состава. В некоторых вариантах осуществления, составленную клеточную композицию, содержащую сконструированные рекомбинантным рецептором (например,

CAR) CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки, замораживают, например, криозащищают или криоконсервируют в среде для криоконсервации. В некоторых аспектах, сконструированные CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки в составе происходят от одного и того же донора или биологического образца и экспрессируют один и тот же рекомбинантный белок (например, CAR, такой как анти-CD19 CAR).

В некоторых аспектах, композицию обогащенных CD3⁺ Т-клеток выбирают из образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, композицию, обогащенную CD3⁺ Т-клетками, активируют и/или стимулируют через контакт со стимулирующим реагентом (например, инкубацию с конъюгированными с CD3/CD28 магнитными гранулами для активации Т-клеток). В некоторых аспектах, активированную/стимулированную клеточную композицию конструируют, трансдуцируют и/или трансфицируют, например, с использованием вирусного вектора, кодирующего рекомбинантный белок (например, CAR), для экспрессии рекомбинантного белка в Т-клетках клеточной композиции. В некоторых аспектах, способ включает удаление стимулирующего реагента, например магнитных гранул, из клеточной композиции. В некоторых аспектах, клеточную композицию, содержащую сконструированные CD3⁺ Т-клетки, культивируют, например, для увеличения в ней популяции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клеточную композицию после культивирования собирают и/или собирают и/или составляют, например, промывая клеточную композицию в буфере для композиции. В некоторых вариантах осуществления, составленную клеточную композицию, содержащую рекомбинантные рецепторы (например, CAR) CD3⁺ Т-клетки, замораживают, например, криозащищают или криоконсервируют в среде для криоконсервации. В некоторых аспектах, сконструированные CD3⁺ Т-клетки в составе экспрессируют CAR, например CAR анти-CD19.

1. КЛЕТКИ И ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

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

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, такие как нуклеиновые кислоты, кодирующие рекомбинантный рецептор, являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, которые, например,

обычно не обнаруживаются в конструируемой клетке и/или в организме, из которого такая клетка получена. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновая кислота не найдена в природе, включая такую, которая содержит химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

Клетками обычно являются эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно клетки человека. В некоторых вариантах осуществления, клетки получают из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, являются клетками иммунной системы, такими как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, *например*, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т клетки и/или НК-клетки. Другие типовые клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетками обычно являются первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно из субъекта и/или выделенные из субъекта и замороженные. В некоторых вариантах осуществления, клетки включают одно или несколько подмножеств Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4⁺ клетки, CD8⁺ клетки и их субпопуляции, которые определяются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для дифференциации, размножения, рециркуляции, локализации и/или жизнестойкости, специфичностью к антигену, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркером или профилем секреции цитокинов и/или степенью дифференциации. Что касается субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Способы включают готовые способы. В некоторых аспектах, таких как готовые технологии, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления, способы включают выделение клеток от субъекта, их приготовление, обработку, культивирование и/или конструирование, а также повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

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

В некоторых вариантах осуществления, клетками являются естественные киллеры

(NK). В некоторых вариантах осуществления, клетками являются моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

В некоторых вариантах осуществления, клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных с помощью генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, полученном из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в конструируемой клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновыми кислотами являются не встречающиеся в природе, такие как нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе, включая нуклеиновую кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из множества различных типов клеток.

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

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

В некоторых аспектах, образцом, из которого получены или выделены клетки, является кровь или образец, полученный из крови, или он является или получен из продукта афереза или лейкофереза. Типовые образцы включают цельную кровь, моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкоз, лимфому, лимфатический узел, кишечную лимфоидную

ткань, лимфоидную ткань слизистой оболочки, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почки, поджелудочную железу, грудь, кость, простату, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другой орган, и/или полученные из них клетки. В контексте клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, образцы включают образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления, клетки получены из клеточных линий, например, из Т-клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления, клетки получают из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, приматов, не относящихся к человеку, и свиней.

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

В некоторых примерах, клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, с помощью афереза или лейкофереза. В некоторых аспектах, образцы включают лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие белые клетки крови, красные клетки крови и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах, включают клетки, отличные от красных клеток крови и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления, клетки крови, собранные у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, клетки промывают физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления, в промывочном растворе отсутствуют кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах, стадию промывания выполняют на полуавтоматической «проточной» центрифуге (например, устройстве для обработки клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах, стадию промывания выполняют фильтрацией в тангенциальном потоке (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления, клетки ресуспендируют в различных биосовместимых буферах после промывания, таких как, например, PBS, свободный от $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. В некоторых вариантах осуществления, компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение белых клеток крови из периферической крови путем лизирования красных клеток крови и центрифугирования в градиенте

Перколла или Фиколла.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стадии селекции включает инкубацию клеток с реагентом для селекции. Инкубация с реагентом или реагентами для селекции, например, как часть способов селекции, которые могут выполняться с использованием одного или нескольких реагентов для селекции для селекции одного или нескольких различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке или на ней одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ с использованием реагента для селекции или реагентов для разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, реагент или реагенты для селекции приводят к разделению, которое является разделением на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, селекция в некоторых аспектах включает инкубацию с реагентом или реагентами для разделения клеток и популяций клеток на основе экспрессии или уровня экспрессии клетками одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывки и отделения клеток, которые связывают антитело или партнера по связыванию, от тех клеток, которые не связываются с антителом или партнером по связыванию.

В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с некоторым количеством желаемого реагента для селекции на основе аффинности. Селекцию на основе иммуноаффинности можно проводить с использованием любой системы или способа, который приводит к благоприятному энергетическому взаимодействию между разделяемыми клетками и молекулой, специфически связывающейся с маркером на клетке, например, антителом или другим партнером по связыванию на твердой поверхности, например, частице. В некоторых вариантах осуществления, способы проводят с использованием таких частиц, как гранулы, например магнитные гранулы, которые покрыты агентом селекции (например, антителом), специфичным к маркеру клеток. Частицы (например, гранулы) можно инкубировать или смешивать с клетками в контейнере, таком как пробирка или пакет, при встряхивании или смешивании с постоянным соотношением плотности клеток к частицам (например, шарикам), чтобы способствовать стимулированию энергетически благоприятного взаимодействия. В других случаях, способы включают селекцию клеток, где селекцию полностью или частично осуществляют во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центрифужном вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию клеток с реагентами для селекции, такими как реагенты для селекции на основе иммуноаффинности, выполняют в центрифужной камере. В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, описанного в международной заявке на патент, номер

публикации WO2009/072003 или US 20110003380 A1. В одном примере, системой является система, описанная в международной публикации WO2016/073602.

В некоторых вариантах осуществления, при проведении таких стадий селекции или их частей (например, инкубации с частицами, покрытыми антителами, например, магнитными гранулами) в полости центрифужной камеры, пользователь может контролировать определенные параметры, такие как объем различных растворов, добавление раствора во время обработки и время этого, что может дать преимущества по сравнению с другими доступными способами. Например, способность уменьшать объем жидкости в полости во время инкубации может увеличивать концентрацию частиц (например, реагента в виде гранул), используемых при селекции, и, таким образом, химический потенциал раствора, не влияя на общее количество клеток в полости. Это, в свою очередь, может улучшить попарные взаимодействия между обрабатываемыми клетками и частицами, используемыми для селекции. В некоторых вариантах осуществления, выполнение стадии инкубации в камере, например, когда оно связано с системами, схемами и управлением, как описано в настоящем документе, позволяет пользователю осуществлять перемешивание раствора в желаемое время во время инкубации, что также может улучшить взаимодействие.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть стадии селекции выполняют в центрифужной камере, что включает инкубацию клеток с реагентом для селекции. В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством желаемого реагента для селекции на основе аффинности, которое намного меньше, чем обычно используют при выполнении аналогичной селекции в пробирке или контейнере для селекции того же количества клеток и/или объема клеток согласно инструкциям производителя. В некоторых вариантах осуществления, количество реагента или реагентов для селекции составляет не более 5%, не более 10%, не более 15%, не более 20%, не более 25%, не более 50%, не более 60%, не более 70% или не более 80% от количества того же реагента для селекции, используемого для селекции клеток в пробирке или инкубации на основе контейнера для того же количества клеток, и/или используют такой же объем клеток в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых вариантах осуществления, для селекции, например селекции клеток на основе иммуноаффинности, клетки инкубируют в полости камеры в композиции, которая также содержит буфер для селекции с реагентом для селекции, таким как молекула, которая специфически связывается с поверхностным маркером на клетке, которую желательно обогатить и/или истощить, но не на других клетках в композиции, таких как антитело, которое необязательно связано с каркасом, таким как полимер или поверхность, например, гранула, например, магнитная гранула, такая как магнитные гранулы, связанные с моноклональными антителами, специфичными для CD3, CD4 и/или CD8. В некоторых вариантах осуществления, как описано, реагент для селекции добавляют к клеткам в полости камеры в количестве, которое по существу меньше (например, не более 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% от количества) по

сравнению с количеством реагента для селекции, которое обычно используют или может быть необходимым для достижения примерно такой же или аналогичной эффективности селекции того же количества клеток или такого же объема клеток, если селекцию проводят в пробирке при встряхивании или вращении. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят с добавлением буфера для селекции к клеткам и реагента для селекции для достижения целевого объема с инкубацией реагента, например, от 10 мл до 200 мл, например, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл, 100 мл, 150 мл или 200 мл. В некоторых вариантах осуществления, буфер для селекции и реагент для селекции предварительно смешивают перед добавлением в клетки. В некоторых вариантах осуществления, буфер для селекции и реагент для селекции добавляют к клеткам отдельно. В некоторых вариантах осуществления, селекционную инкубацию проводят в условиях периодического осторожного перемешивания, что может способствовать стимулированию энергетически благоприятных взаимодействий и, таким образом, позволяет использовать меньшее количество реагентов для селекции при достижении высокой эффективности селекции.

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

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию обычно проводят в условиях перемешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низком усилии или скорости, например, при скорости ниже, чем та, которую используют для осаждения клеток, например, от точно или примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80 г до 100 г (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95 или 100 г). В некоторых вариантах осуществления, вращение выполняют с использованием повторяющихся интервалов вращения на такой низкой скорости, за которыми следует период отдыха, например, при вращении и/или отдыхе в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение примерно 5, 6, 7 или 8 секунд.

В некоторых вариантах осуществления, такой процесс осуществляют в полностью закрытой системе, в которую встроена камера. В некоторых вариантах осуществления, этот процесс (и, в некоторых аспектах, также одну или несколько дополнительных стадий, таких как предыдущая стадия промывки образца, содержащего клетки, такого как образец афереза), проводят автоматически, так что клетки, реагент и другие компоненты втягиваются и выталкиваются из камеры в соответствующее время, и выполняется центрифугирование, чтобы завершить стадию промывки и связывания в единой закрытой

системе с использованием автоматизированной программы.

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

В некоторых вариантах осуществления, способы выделения включают разделение разных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, разделением является разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение в некоторых аспектах включает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии или уровня экспрессии клетками одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, за которым обычно следуют этапы промывки и отделения клеток, которые связались с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связанных с антителом или партнером по связыванию.

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

Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или обогащение клеток определенного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, относится к увеличению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогично, отрицательная селекция, удаление или истощение клеток определенного типа, например, экспрессирующих маркер, относится к

уменьшению количества или доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько циклов стадий разделения, где положительно или отрицательно выбранная фракция с одной стадии подвергается другой стадии разделения, например, последующему положительной или отрицательной селекции. В некоторых примерах, одна стадия разделения может истощить клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых специфичен для маркера, направленного на отрицательную селекцию. Аналогичным образом, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессированных на различных типах клеток.

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

В некоторых вариантах осуществления, выделение проводят путем обогащения определенной популяции клеток путем положительной селекции или истощения конкретной популяции клеток путем отрицательной селекции. В некоторых вариантах осуществления, положительную или отрицательную селекцию проводят путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другим связующим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессированных или экспрессированных (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно выбранных клетках, соответственно.

В конкретном примере, биологический образец, например, образец PBMC или другой образец белой клетки крови, подвергают селекции CD4⁺ Т-клеток, при которой сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции. В некоторых вариантах осуществления, CD8⁺ Т-клетки выбраны из отрицательной фракции. В некоторых вариантах осуществления, биологический образец подвергают селекции CD8⁺ Т-клеток, где сохраняются как отрицательная, так и положительная фракции. В некоторых вариантах осуществления, CD4⁺ Т-клетки выбраны из отрицательной фракции.

В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки отделяют от образца PBMC путем отрицательной селекции маркеров, экспрессированных на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие белые клетки крови, такие как CD14. В некоторых аспектах, стадию селекции CD4⁺ или CD8⁺ используют для разделения CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4⁺ и CD8⁺ могут быть дополнительно разделены на субпопуляции путем положительной или отрицательной селекции маркеров, экспрессированных или экспрессированных до относительно более

высокой степени в одной или нескольких субпопуляциях наивных, памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, $CD8^+$ клетки дополнительно обогащают или истощают наивными, центральной памяти, эффекторной памяти и/или центральной памяти стволовыми клетками, например, посредством положительной или отрицательной селекции на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления, обогащение Т (T_{CM}) клетками центральной памяти проводят для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что в некоторых аспектах, является особенно устойчивым в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82; Wang et al. (2012) *J Immunother*. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления, комбинирование T_{CM} -обогащенных $CD8^+$ Т-клеток и $CD4^+$ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления, Т-клетки памяти присутствуют обоим, $CD62L^+$ и $CD62L^-$ подмножествах $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови. PBMC могут быть обогащены или истощены фракциями $CD62L^-CD8^+$ и/или $CD62L^+CD8^+$, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

В некоторых вариантах осуществления, обогащение Т (T_{CM})-клетками центральной памяти основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах, оно основано на отрицательной селекции клеток, экспрессирующих или высоко экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах, выделение популяции $CD8^+$, обогащенной T_{CM} клетками, осуществляют путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA и положительной селекцией или обогащением клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте, обогащение Т (T_{CM}) клеток центральной памяти проводят, начиная с отрицательной фракции клеток, выбранных на основе экспрессии CD4, которые подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительной селекцией на основе на CD62L. Такие селекции в некоторых аспектах, выполняют одновременно, и в других аспектах, выполняют последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах, ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, используемую при получении популяции или субпопуляции $CD8^+$ клеток, также используют для создания популяции или субпопуляции $CD4^+$ клеток так, что как положительные, так и отрицательные фракции из разделения на основе CD4 сохраняют и используют на последующих стадиях способов, необязательно после одной или нескольких дополнительных стадий положительной или отрицательной селекции.

В конкретном примере, образец PBMC или другой образец белой клетки крови подвергают селекции $CD4^+$ клеток, при которой сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции. Затем, отрицательную фракцию подвергают отрицательной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и положительной селекцией на основе характеристики маркера Т-клеток центральной памяти, такого как CD62L или

CCR7, где положительную и отрицательную селекцию осуществляют в любом порядке.

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

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

В некоторых аспектах, образец или композицию клеток, подлежащих разделению, инкубируют с небольшими намагничивающимися или магниточувствительными материалами, такими как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как гранулы Dynalbeads или MACS). Магниточувствительный материал, например, гранулу, обычно прямо или косвенно присоединяют к партнеру по связыванию, например, антителу, который специфически связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желателно отделить, например, которые желателно подвергнуть отрицательной или положительной селекции.

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

Инкубацию обычно проводят в условиях, в которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые

специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или грануле, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах, образец помещают в магнитное поле, и те клетки, которые имеют прикрепленные к ним магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от не меченых клеток. Для положительной селекции, сохраняют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательной селекции, сохраняют клетки, которые не притягиваются (не меченые клетки). В некоторых аспектах, комбинацию положительной и отрицательной селекции выполняют на одной и той же стадии селекции, где положительные и отрицательные фракции сохраняют и далее обрабатывают или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления, магнитные частицы прикреплены к клеткам через покрытие из первичных антител, специфичных для одного или нескольких маркеров. В некоторых вариантах осуществления, клетки, а не гранулы, метят первичным антителом или партнером по связыванию, и затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным к типу клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидином). В некоторых вариантах осуществления, покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления, магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии должны быть инкубированы, культивированы и/или сконструированы; в некоторых аспектах, частицы остаются прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления, намагничивающиеся или магниточувствительные частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц из клеток известны и включают, например, использование конкурирующих не меченых антител и намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления, намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления, селекцию на основе аффинности осуществляют посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) способны осуществлять с высокой чистотой селекцию клеток, имеющих прикрепленные к ним намагниченные частицы. В некоторых вариантах осуществления, MACS работает в режиме, в котором частицы-не мишени и мишени последовательно элюируют после применения внешнего магнитного поля. То есть клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как не прикрепленные частицы элюируются. Затем, после завершения этой первой стадии элюирования,

частицы, которые были захвачены магнитным полем и которые не могли быть элюированы, высвобождают некоторым образом, так что они могут быть элюированы и извлечены. В некоторых вариантах осуществления, клетки-не мишени помечены и истощены из гетерогенной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления, выделение или разделение проводят с использованием системы, устройства или аппарата, которые выполняют одну или несколько стадий выделения, получения клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления способов. В некоторых аспектах, систему используют для выполнения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для минимизации ошибок, манипуляций пользователя и/или загрязнения. В одном примере, системой является система, описанная в публикации международной заявки на патент № WO2009/072003 или US 20110003380.

В некоторых вариантах осуществления, система или аппарат выполняет одну или несколько, например, все стадии выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе, и/или в автоматическом или программируемом режиме. В некоторых аспектах, система или аппарат включает компьютер и/или компьютерную программу, обменивающуюся данными с системой или аппаратом, что позволяет пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или настраивать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

В некоторых аспектах, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на уровне клинического масштаба в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитной сепарации, перистальтический насос и различные запорные клапаны. Интегрированный компьютер, в некоторых аспектах, управляет всеми компонентами прибора и направляет систему на выполнение повторяющихся процедур в стандартной последовательности. Блок магнитной сепарации в некоторых аспектах, включает подвижный постоянный магнит и держатель для разделительной колонки. Перистальтический насос контролирует скорость потока по всему набору трубок и вместе с запорными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и постоянное суспендирование клеток.

Система CliniMACS в некоторых аспектах, использует сопряженные с антителами намагничиваемые частицы, которые поставляют в стерильном апиrogenном растворе. В некоторых вариантах осуществления, после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления лишних частиц. Затем пакет для получения клеток подсоединяют к набору трубок, который, в свою очередь, соединяется с пакетом, содержащим буфер, и пакетом для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предварительную колонку и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения, система автоматически наносит образец клеток на

разделительную колонку. Меченые клетки остаются в колонке, в то время как не меченые клетки удаляются серией промывок. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами не мечены и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами помечены и удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления, популяции клеток для использования с описанными в настоящем документе способами элюируют из колонки после снятия магнитного поля и собирают в пакет для сбора клеток.

В некоторых вариантах осуществления, разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy в некоторых аспектах, оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки центрифугированием. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток, распознавая макроскопические слои источника клеточного продукта. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на эритроциты, белые клетки крови и слои плазмы. Система CliniMACS Prodigy может также включать интегрированную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, например, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигена и длительное культивирование клеток. Входные порты позволяют стерильно удалять и пополнять среду, а клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, and Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

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

В некоторых вариантах осуществления, антитела или партнеры по связыванию мечены одним или несколькими определяемыми маркерами для облегчения разделения для положительной и/или отрицательной селекции. Например, разделение может быть

основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах, разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, проводят в жидком потоке, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и/или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с проточно-цитометрической системой определения. Такие способы позволяют проводить положительную и отрицательную селекцию одновременно по нескольким маркерам.

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

В некоторых вариантах осуществления, выделение и/или селекцию приводят в одной или нескольких входных композициях обогащенных Т-клеток, например CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток и/или CD8+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две или несколько отдельных входных композиций выделены, селектированы, обогащены или получены из одного биологического образца. В некоторых вариантах осуществления, отдельные входные композиции выделены, селектированы, обогащены и/или получены из отдельных биологических образцов, собранных, взятых и/или полученных от одного и того же субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько входных композиций являются или содержат композицию обогащенных Т-клеток, которая содержит, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99%, по меньшей мере, 99,5%, по меньшей мере, 99,9% или примерно 100% CD3+ Т-клеток. В конкретном варианте осуществления, входная композиция обогащенных Т-клеток состоит по существу из CD3+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько входных композиций являются или содержат композицию обогащенных CD4+ Т-клеток, которая содержит, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере,

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

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

2. АКТИВАЦИЯ И СТИМУЛЯЦИЯ

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

Условия могут включать одну или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, разработанные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулирующие условия или агенты содержат один или несколько агентов, например лиганд, который способен стимулировать

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

Например, стимулирующие условия могут включать инкубацию с использованием магнитных шариков, конъюгированных с анти-CD3/анти-CD28 (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации в присутствии одного или нескольких стимулирующих условий или стимулирующих агентов проводят во внутренней полости центрифужной камеры, например, при центрифужном вращении, как описано в международной публикации № WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть инкубации, выполняемой в центрифужной камере, включает смешивание с реагентом или реагентами для индукции стимуляции и/или активации. В некоторых вариантах осуществления, клетки, такие как селектированные клетки, смешивают со стимулирующим условием или стимулирующим агентом в центрифужной камере. В некоторых аспектах таких процессов, объем клеток смешивают с количеством одного или нескольких стимулирующих условий или агентов, которое намного меньше, чем обычно используется при выполнении аналогичных стимуляций в планшете для культивирования клеток или другой системе.

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

В некоторых вариантах осуществления, инкубацию обычно проводят в условиях перемешивания, например, в присутствии вращения, обычно при относительно низком

усилии или скорости, например, при скорости ниже, чем та, которую используют для осаждения клеток, например, от точно или примерно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин, или 1700 об/мин), например, при RCF на образце или стенке камеры или другого контейнера от или от примерно 80 г до 100 г (например, точно или примерно или, по меньшей мере, 80, 85, 90, 95 или 100 г). В некоторых вариантах осуществления, вращение выполняют с использованием повторяющихся интервалов вращения на такой низкой скорости, за которыми следует период отдыха, например, при вращении и/или отдыхе в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 секунд, например, вращении в течение приблизительно 1 или 2 секунд с последующим отдыхом в течение примерно 5, 6, 7 или 8 секунд.

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

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

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

3. ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки, такие как Т-клетки, используемые в связи с представленными способами, применениями, готовыми изделиями или композициями, являются клетки, которые были генетически

сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора, например, CAR или TCR, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетки сконструированы путем введения, доставки или переноса последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют рекомбинантный рецептор и/или другие молекулы.

В некоторых вариантах осуществления, способы продуцирования сконструированных клеток включают введение полинуклеотида, кодирующего рекомбинантный рецептор (например, анти-CD19 CAR), в клетку, например, такую как стимулированная или активированная клетка. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантными белками являются рекомбинантные рецепторы, такие как любые описанные. Введение молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантный белок, такой как рекомбинантный рецептор, в клетку можно проводить с использованием любого из ряда известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, включая лентивирусные и гаммаретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Примеры способов включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе через вирусные, *например*, ретровирусные или лентивирусные, трансдукцию, транспозоны и электропорацию. В некоторых вариантах воплощения конструирование дает одну или несколько сконструированных композиций обогащенных T-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, одной или несколькими композициями стимулированных T-клеток являются или включают две отдельные стимулированные композиции обогащенных T-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные композиции обогащенных T-клеток, например, две отдельные композиции обогащенных T-клеток, которые были селектированы, выделены и/или обогащены из одного и того же биологического образца, конструируются отдельно. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD4⁺ T-клеток. В конкретных вариантах осуществления, две отдельные композиции включают композицию обогащенных CD8⁺ T-клеток. В некоторых вариантах осуществления, две отдельные композиции, состоящие из обогащенных CD4⁺ T-клеток и обогащенных CD8⁺ T-клеток, создают отдельно с помощью генной инженерии.

В некоторых вариантах осуществления перенос гена осуществляют сначала стимуляцией клетки, например, путем комбинирования ее со стимулом, который вызывает такой ответ, как пролиферация, выживаемость и/или активация, например, по данным экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена осуществляют сначала инкубацией клеток в стимулирующих условиях, например, любым из описанных способов.

В некоторых вариантах осуществления, способы генной инженерии осуществляют

через контакт одной или нескольких клеток композиции с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок, например рекомбинантным рецептором. В некоторых вариантах осуществления, контакт может осуществляться центрифугированием, таким как центрифужная инокуляция (например, центрифужная инокуляция). Такие способы включают любой из способов, описанных в международной публикации WO2016/073602. Примеры центрифужных камер включают камеры, производимые и продаваемые Biosafe SA, в том числе камеры для использования с системами Sерах® и Sерах®2, включая центрифужные камеры A-200/F и A-200 и различные комплекты для использования с такими системами. Типовые камеры, системы, технологические приборы и шкафы описаны, например, в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и опубликованной заявке на патент США, № публикации: US 2008/0171951, а также в опубликованной международной заявке на патент, № публикации WO 00/38762, содержание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Примеры наборов для использования с такими системами включают, но не ограничиваются ими, одноразовые наборы, продаваемые BioSafe SA под названиями продуктов CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 или CS-900.2.

В некоторых вариантах осуществления, контакт может осуществляться центрифугированием, таким как центрифужная инокуляция (например, центрифужная инокуляция). В некоторых вариантах осуществления, композицию, содержащую клетки, вектор, например вирусные частицы и реагент, можно вращать, как правило, с относительно низкой силой или скоростью, такой как скорость ниже, чем та, которая используется для осаждения клеток, например, от или от точно или примерно 600 об/мин. до 1700 об/мин (например, при 600 об/мин, 1000 об/мин или 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют с силой, например относительной центробежной силой, от точно или примерно 100 г до 3200 г (например, точно или примерно, или, по меньшей мере, точно или примерно 100 г, 200 г, 300 г, 400 г, 500 г, 1000 г, 1500 г, 2000 г, 2500 г, 3000 г или 3200 г) при измерении, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. Термин «относительная центрифужная сила» или RCF обычно понимается как эффективная сила, приложенная к объекту или веществу (такому как клетка, образец или гранула и/или точка в камере или другом вращаемом контейнере) относительно гравитационной силы Земли в определенной точке пространства по сравнению с осью вращения. Значение может быть определено с использованием хорошо известных формул с учетом силы тяжести, скорости вращения и радиуса вращения (расстояние от оси вращения и объекта, вещества или частицы, на которых измеряется RCF).

В некоторых вариантах осуществления система включена и/или связана с другим оборудованием, включая приборы для работы, автоматизации, контроля и/или отслеживания стадии трансдукции и одной или нескольких различных других стадий обработки, выполняемых в системе, например одной или нескольких стадий обработки, которые могут выполняться с системой центрифужных камер или в связи с ними, как

описано в настоящем документе или в международной публикации номер WO2016/073602. Эти приборы в некоторых вариантах осуществления содержатся в шкафу. В некоторых вариантах осуществления, приборы включают в себя шкаф, который включает в себя корпус, содержащий схему управления, центрифугу, крышку, двигатели, насосы, датчики, дисплеи и пользовательский интерфейс. Типовое устройство описано в патенте США № 6,123,655, патенте США № 6,733,433 и US 2008/0171951.

В некоторых вариантах осуществления, система включает ряд контейнеров, например пакеты, трубки, запорные краны, зажимы, соединители и центрифужную камеру. В некоторых вариантах осуществления, контейнеры, такие как пакеты, включают один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащих клетки, подлежащие трансдукции, и частицы вирусного вектора, в одном и том же контейнере или отдельных контейнерах, таких как один и тот же пакет или отдельные пакеты. В некоторых вариантах осуществления, система дополнительно включает один или несколько контейнеров, таких как пакеты, содержащие среду, такую как разбавитель и/или промывочный раствор, который втягивается в камеру, и/или другие компоненты для разведения, ресуспендирования и/или промывки компонентов и/или композиции во время осуществления способов. Контейнеры могут быть соединены в одном или нескольких положениях в системе, например, в положении, соответствующем входной линии, линии разбавителя, линии промывки, линии отходов и/или выходной линии.

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

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

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi:

10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557.

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

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

В некоторых вариантах осуществления, частицы вирусного вектора содержат геном, полученный из вектора на основе ретровирусного генома, например, полученный из вектора на основе лентивирусного генома. В некоторых аспектах представленных вирусных векторов, гетерологичная нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, такой как CAR, содержится и/или расположена между последовательностями 5' LTR и 3' LTR генома вектора.

В некоторых вариантах осуществления, геномом вирусного вектора является геном лентивируса, такой как геном HIV-1 или геном SIV. Например, лентивирусные векторы были созданы путем множественного ослабления генов вирулентности, например, гены env, vif, vpr и nef могут быть удалены, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Известны лентивирусные векторы. См. Naldini et al. (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6,013,516; и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления, эти вирусные векторы основаны на плазидах или вирусах и сконфигурированы для переноса жизненно важных последовательностей для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Известные лентивирусы можно легко получить из хранилищ или коллекций, таких как American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), или выделить из известных источников с

использованием общедоступных методов.

Неограничивающие примеры лентивирусных векторов включают такие, которые происходят из лентивируса, такого как вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1), HIV-2, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), Т-лимфотропный вирус человека 1 (HTLV-1), HTLV-2 или вирус инфекционной анемии лошадей (E1AV). Например, лентивирусные векторы были созданы путем многократного ослабления генов вирулентности HIV, например, удалением генов *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*, что делает вектор более безопасным для терапевтических целей. Лентивирусные векторы известны в данной области техники, см. Naldini et al. (1996 и 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенты США №№ 6,013,516; и 5,994,136). В некоторых вариантах осуществления, эти вирусные векторы основаны на плаزمиде или вирусе и сконфигурированы для переноса основных последовательностей для включения чужеродной нуклеиновой кислоты, для селекции и для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Известные лентивирусы можно легко получить из хранилищ или коллекций, таких как American Type Culture Collection (“ATCC”; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), или выделить из известных источников с использованием общедоступных методов.

В некоторых вариантах осуществления, вектор вирусного генома может содержать последовательности 5' и 3' LTR ретровируса, такого как лентивирус. В некоторых аспектах, конструкция вирусного генома может содержать последовательности из 5' и 3' LTR лентивируса и, в частности, может содержать последовательности R и U5 из 5' LTR лентивируса и инактивированного или самоинактивирующегося 3' LTR из лентивируса. Последовательности LTR могут быть последовательностями LTR любого лентивируса любого вида. Например, они могут быть последовательностями LTR из HIV, SIV, FIV или BIV. Обычно последовательностями LTR являются последовательности LTR HIV.

В некоторых вариантах осуществления, в нуклеиновой кислоте вирусного вектора, такого как вирусный вектор HIV, отсутствуют дополнительные единицы транскрипции. Векторный геном может содержать инактивированный или самоинактивирующийся 3' LTR (Zufferey et al. *J Virol* 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., *J Virol* 72: 8150, 1998). Например, делеция в области U3 3' LTR нуклеиновой кислоты, используемой для продуцирования РНК вирусного вектора, может использоваться для создания самоинактивирующихся (SIN) векторов. Затем эта делеция может быть перенесена на 5' LTR провирусной ДНК во время обратной транскрипции. Самоинактивирующийся вектор обычно имеет делецию последовательностей энхансера и промотора из 3' длинного концевой повтора (LTR), которая копируется в 5' LTR во время интеграции вектора. В некоторых вариантах осуществления, может быть удалено достаточное количество последовательности, включая удаление ТАТА-бокса, чтобы устранить транскрипционную активность LTR. Это может предотвратить образование полноразмерной векторной РНК в трансдуцированных клетках. В некоторых аспектах, элемент U3 3' LTR содержит делецию своей энхансерной последовательности, ТАТА-бокса, сайтов Sp1 и сайтов NF-каппа В. В результате самоинактивации 3' LTR, провирус, который создается после входа и обратной

транскрипции, включает инактивированный 5' LTR. Это может повысить безопасность за счет снижения риска мобилизации векторного генома и влияния LTR на соседние клеточные промоторы. Самоинактивирующийся 3' LTR может быть сконструирован любым способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, это не влияет на титры вектора или свойства вектора *in vitro* или *in vivo*.

Необязательно, последовательность U3 из 5' LTR лентивируса может быть заменена промоторной последовательностью в вирусной конструкции, такой как гетерологичная промоторная последовательность. Это может увеличить титр вируса, выделенного из линии упаковывающих клеток. Также может быть включена энхансерная последовательность. Можно использовать любую комбинацию энхансер/промотор, которая увеличивает экспрессию генома вирусной РНК в линии упаковывающих клеток. В одном примере используется последовательность энхансера/промотора CMV (патент США № 5,385,839 и патент США № 5,168,062).

В некоторых вариантах осуществления, риск инсерционного мутагенеза можно минимизировать путем конструирования генома ретровирусного вектора, такого как геном лентивирусного вектора, с дефектом интеграции. Для получения не интегрирующегося векторного генома можно использовать различные подходы. В некоторых вариантах осуществления, мутации могут быть сконструированы в компонент фермента интегразы гена *pol*, так чтобы он кодировал белок с не активной интегразой. В некоторых вариантах осуществления, сам векторный геном может быть модифицирован для предотвращения интеграции, например, путем мутации или делеции одного или обоих сайтов прикрепления или превращения 3' LTR-проксимального полипуринового тракта (PPT) в не функциональный путем делеции или модификации. В некоторых вариантах осуществления, доступны не генетические подходы; к ним относятся фармакологические агенты, которые ингибируют одну или несколько функций интегразы. Подходы не исключают друг друга; то есть одновременно можно использовать более одного из них. Например, сайты интегразы и связывания могут быть не функциональными, или сайт интегразы и PPT могут быть не функциональными, или сайты связывания и сайт PPT могут быть не функциональными, или все они могут быть не функциональными. Такие способы и геномы вирусных векторов известны и доступны (см. Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman et al. *J Virol* 69:2729, 1995; Brown et al *J Virol* 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., *J Virol* 77:11150, 2003; Powell and Levin *J Virol* 70:5288, 1996).

В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит последовательности для размножения в клетке-хозяине, такой как прокариотическая клетка-хозяин. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота вирусного вектора содержит одну или несколько точек начала репликации для размножения в прокариотической клетке, такой как бактериальная клетка. В некоторых вариантах осуществления, векторы, которые включают прокариотическое начало репликации, также могут содержать ген, экспрессия которого обеспечивает определяемый или селективируемый маркер, такой как

резистентность к лекарственным средствам.

Геном вирусного вектора обычно конструируют в форме плазмиды, которую можно трансфицировать в линию упаковочных клеток или клеток-продуцентов. Для получения ретровирусных частиц, геном которых включает РНК копию генома вирусного вектора, можно использовать любой из множества известных способов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере два компонента участвуют в создании системы доставки генов на основе вируса: во-первых, упаковочные плазмиды, содержащие структурные белки, а также ферменты, необходимые для создания частицы вирусного вектора, и, во-вторых, сам вирусный вектор, т.е. передаваемый генетический материал. Гарантии биобезопасности могут быть включены в конструкцию одного или обоих этих компонентов.

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

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

В некоторых вариантах осуществления, линию упаковывающих клеток трансфицируют одним или несколькими плазмидными векторами, содержащими компоненты, необходимые для создания частиц. В некоторых вариантах осуществления, линию упаковывающих клеток трансфицируют плазмидой, содержащей геном вирусного вектора, включая LTR, cis-действующую упаковочную последовательность и представляющую интерес последовательность, т.е. нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как CAR; и одну или несколько вспомогательных плазмид, кодирующих ферментные и/или структурные компоненты вируса, такие как Gag, pol и/или rev. В некоторых вариантах осуществления, несколько векторов используют для разделения различных генетических компонентов, которые создают частицы ретровирусного вектора. В некоторых таких вариантах осуществления, предоставление

отдельных векторов в упаковывающую клетку снижает вероятность событий рекомбинации, которые, в противном случае, могли бы создавать репликационно-компетентные вирусы. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать один плазмидный вектор, содержащий все ретровирусные компоненты.

В некоторых вариантах осуществления, частица ретровирусного вектора, такая как частица лентивирусного вектора, является псевдотипированной для повышения эффективности трансдукции клеток-хозяев. Например, частица ретровирусного вектора, такая как частица лентивирусного вектора, в некоторых вариантах осуществления, псевдотипирована с VSV-G гликопротеином, который обеспечивает широкий диапазон клеток-хозяев, расширяя типы клеток, которые могут быть трансдуцированы. В некоторых вариантах осуществления, линию упаковывающих клеток трансфицируют плазмидой или полинуклеотидом, кодирующим не нативный гликопротеин оболочки, например, включая ксенотропные, политропные или амфотропные оболочки, такие как оболочка вируса Синдбис, GALV или VSV-G.

В некоторых вариантах осуществления, линия упаковывающих клеток обеспечивает компоненты, включая регуляторные и структурные белки вируса, которые необходимы в транс для упаковки вирусной геномной РНК в частицы лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающей клеточной линией может быть любая клеточная линия, которая способна экспрессировать лентивирусные белки и продуцировать функциональные лентивирусные векторные частицы. В некоторых аспектах, подходящие линии упаковывающих клеток включают 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), ВНК (ATCC CCL-10) и Cf2Th (ATCC CRL 1430) клетки.

В некоторых вариантах осуществления, линия упаковывающих клеток стабильно экспрессирует вирусные белки. Например, в некоторых аспектах, может быть сконструирована линия упаковывающих клеток, содержащая gag, pol, rev и/или другие структурные гены, но без LTR и упаковывающих компонентов. В некоторых вариантах осуществления, линия упаковывающих клеток может быть временно трансфицирована молекулами нуклеиновой кислоты, кодирующими один или несколько вирусных белков, вместе с геномом вирусного вектора, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гетерологичный белок, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую гликопротеин оболочки.

В некоторых вариантах осуществления, вирусные векторы и упаковывающие и/или хелперные плазмиды вводят через трансфекцию или инфекцию в линию упаковывающих клеток. Линия упаковывающих клеток продуцирует частицы вирусного вектора, которые содержат геном вирусного вектора. Способы трансфекции или инфекции хорошо известны. Неограничивающие примеры включают фосфат кальция, DEAE-декстран и способы липофекции, электропорацию и микроинъекцию.

Когда рекомбинантную плазмиду и ретровирусные LTR и последовательности упаковки вводят в специальную линию клеток (например, путем преципитации фосфатом

кальция), упаковочные последовательности могут позволять упаковывать транскрипт РНК рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем могут быть секретированы в питательные среды. Затем среды, содержащие рекомбинантные ретровирусы, в некоторых вариантах осуществления, собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса гена. Например, в некоторых аспектах, после котрансфекции упаковывающих плазмид и вектора переноса в линию упаковывающих клеток, частицы вирусного вектора извлекают из культуральной среды и титруют стандартными способами, используемыми специалистами в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор, может быть получен в линии упаковывающих клеток, такой как типовая линия клеток НЕК 293Т, путем введения плазмид, чтобы обеспечить образование лентивирусных частиц. В некоторых вариантах осуществления, упаковывающая клетка трансфицирована и/или содержит полинуклеотид, кодирующий gag и pol, и полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, такой как антигенный рецептор, например, CAR. В некоторых вариантах осуществления, линия упаковывающих клеток необязательно и/или дополнительно трансфицируется и/или содержит полинуклеотид, кодирующий белок rev. В некоторых вариантах осуществления, линия упаковывающих клеток необязательно и/или дополнительно трансфицируется и/или содержит полинуклеотид, кодирующий не нативный гликопротеин оболочки, такой как VSV-G. В некоторых таких вариантах осуществления, приблизительно через два дня после трансфекции клеток, *например*, клеток НЕК 293Т, супернатант клеток содержит рекомбинантные лентивирусные векторы, которые можно выделить и титровать.

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

В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают способы трансдукции клеток путем контактирования, например, инкубации, клеточной композиции, содержащей множество клеток, с вирусной частицей. В некоторых вариантах осуществления, клетки, которые необходимо трансфицировать или трансдуцировать, являются или содержат первичные клетки, полученные от субъекта, такие как клетки, обогащенные и/или селектированные от субъекта.

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

В некоторых вариантах осуществления, вирусные частицы представлены в

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

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

В некоторых вариантах осуществления, трансдукция может быть достигнута при множественности инфекции (MOI) менее 100, например, как правило, менее 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или менее.

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

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

В некоторых вариантах осуществления, вводимые клетки обрабатывают, инкубируют или контактируют с частицами, которые содержат связывающие молекулы, которые связываются или распознают рекомбинантный рецептор, кодированный вирусной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления, инкубация клеток с частицами вирусного вектора приводит к получению выходной композиции, содержащей клетки, трансдуцированные частицами вирусного вектора.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaubam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; и Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунные клетки включают трансфекцию фосфатом кальция (например,

описанную в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, трансфекцию, опосредованную катионными липосомами; бомбардировку микрочастицами, усиленными частицами вольфрама Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и копреципитацию ДНК с фосфатом стронция (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки, например Т-клетки, могут быть сконструированы либо во время, либо после размножения, например, с Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Такая трансфекция для введения гена желаемого рецептора может быть проведена, например, с любым подходящим ретровирусным вектором. Затем генетически модифицированная клеточная популяция может быть освобождена от первоначального стимула (например, анти-CD3/анти-CD28 стимула) и впоследствии стимулирована вторым типом стимула, например, через рецептор, введенный *de novo*. Такой второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, родственного (перекрестно-сшитого) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который прямо связывается внутри рамки нового рецептора (например, через распознавание константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)*.

В некоторых случаях, может использоваться вектор, который не требует активации клеток, например Т-клеток. В некоторых таких случаях, клетки могут быть селектированы и/или трансдуцированы перед активацией. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток, и, в некоторых случаях, одновременно с или во время, по меньшей мере, части культивирования.

Дополнительные нуклеиновые кислоты, например, гены для введения, включают такие, которые улучшают эффективность терапии, например, способствуя жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены для обеспечения генетического маркера для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делая клетку восприимчивой к отрицательной селекции *in vivo*, как описано у Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al. описывающие использование бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных в результате слияния доминантно-положительного селектируемого маркера с негативным селектируемым маркером. См., например, Riddell et al., патент США № 6,040,177, столбцы 14-17.

4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, РАЗМНОЖЕНИЕ И СОСТАВЛЕНИЕ СКОНСТРУИРОВАННЫХ КЛЕТОК

В некоторых вариантах осуществления, способы получения сконструированных клеток, например, для клеточной терапии в соответствии с любым из представленных способов, применений, изделий производства или композиций, включают одну или несколько стадий культивирования клеток, например, культивирование клеток в условиях, способствующих пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, клетки культивируют в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению после стадии генетического конструирования, например, введения рекомбинантного полипептида в клетки путем трансдукции или трансфекции. В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют после того, как клетки инкубировали в стимулирующих условиях и трансдуцировали или трансфицировали рекомбинантным полинуклеотидом, например полинуклеотидом, кодирующим рекомбинантный рецептор. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, композицию CAR-положительных Т-клеток, сконструированную путем трансдукции или трансфекции рекомбинантным полинуклеотидом, кодирующим CAR, культивируют в условиях, которые способствуют пролиферации и/или размножению.

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

В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в условиях,

способствующих пролиферации и/или размножению. В некоторых вариантах осуществления, такие условия могут быть созданы для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции. В конкретных вариантах осуществления, стимулирующие условия могут включать одну или несколько из конкретных сред, температуры, содержания кислорода, содержания углекислого газа, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, предназначенные для стимуляции роста, деления и/или размножения клеток.

В конкретных вариантах осуществления, клетки культивируют в присутствии одного или нескольких цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, одним или несколькими цитокинами являются рекомбинантные цитокины. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими цитокинами являются рекомбинантные цитокины человека. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько цитокинов связываются и/или способны связываться с рецепторами, которые экспрессируются Т-клетками и/или являются эндогенными для них. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько цитокинов являются или включают члена семейства цитокинов, связанного с пучком 4-альфа-спирали. В некоторых вариантах осуществления, члены семейства цитокинов из пучка 4-альфа-спирали включают, но не ограничиваются ими, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-9 (IL-9), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько рекомбинантных цитокинов включают IL-2, IL-7 и/или IL-15. В некоторых вариантах осуществления, клетки, например сконструированные клетки, культивируют в присутствии цитокина, например рекомбинантного цитокина человека, в концентрации от 1 IU/мл до 2000 IU/мл, от 10 IU/мл до 100 IU/мл, от 50 IU/мл до 200 IU/мл, от 100 IU/мл до 500 IU/мл, от 100 IU/мл до 1000 IU/мл, от 500 IU/мл до 2000 IU/мл или между 100 IU/мл и 1500 IU/мл.

В некоторых вариантах осуществления, культивирование проводят в условиях, которые обычно включают температуру, подходящую для роста первичных иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты человека, например, по меньшей мере, примерно 25 градусов Цельсия, обычно, по меньшей мере, примерно 30 градусов и обычно при точно или примерно 37 градусов Цельсия. В некоторых вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток инкубируют при температуре от 25 до 38°C, например, от 30 до 37°C, например, при точно или примерно 37°C±2°C. В некоторых вариантах осуществления, инкубацию проводят в течение периода времени, пока культура, например культивирование или размножение, не приведет к желаемой или пороговой плотности, количеству или дозе клеток. В некоторых вариантах осуществления, инкубация длится больше или больше примерно или составляет примерно 24 часа, 48

часов, 72 часа, 96 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или более.

В конкретных вариантах осуществления, культивацию проводят в закрытой системе. В определенных вариантах осуществления, культивацию проводят в закрытой системе в стерильных условиях. В конкретных вариантах осуществления, культивацию проводят в той же закрытой системе, что и одну или несколько стадий представленных систем. В некоторых вариантах осуществления, композицию обогащенных Т-клеток удаляют из закрытой системы и помещают в биореактор для культивации и/или присоединяют к нему. Примеры подходящих биореакторов для культивации включают, но не ограничены ими, GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, биореакторные системы Finesse SmartRocker и биореакторные системы Pall XRS. В некоторых вариантах осуществления, биореактор используют для перфузии и/или смешивания клеток во время, по меньшей мере, части стадии культивации.

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

В некоторых вариантах осуществления, биореактор поддерживает температуру точно или примерно 37°C и уровни CO_2 точно или примерно 5% со стационарным потоком воздуха точно, примерно или, по меньшей мере, 0,01 л/мин, 0,05 л/мин, 0,1 л/мин, 0,2 л/мин, 0,3 л/мин, 0,4 л/мин, 0,5 л/мин, 1,0 л/мин, 1,5 л/мин или 2,0 л/мин или более 2,0 л/мин. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть культивирования проводят с перфузией, например, со скоростью 290 мл/день, 580 мл/день и/или 1160 мл/день, например, в зависимости от времени по отношению к началу культивирования и/или плотности культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, часть размножения клеточной культуры проводят с помощью качающего движения, например, под углом от 5° до 10° , например 6° , с постоянной скоростью качания, например, со скоростью от 5 до 15 об/мин, например, 6 об/мин или 10 об/мин.

В некоторых вариантах осуществления, способы производства, создания или

продуцирования клеточной терапии и/или сконструированных клеток в соответствии с представленными способами, применениями или готовыми изделиями могут включать составление клеток, такое как составление генетически сконструированных клеток, полученных в результате стадий обработки до или после инкубации, конструирования и культивирования и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько стадий обработки, включая составление клеток, можно проводить в закрытой системе. В некоторых случаях, клетки обрабатывают в одну или несколько стадий (например, выполняют в центрифужной камере и/или закрытой системе) для производства, создания или продуцирования клеточной терапии, и/или конструирование клеток может включать составление клеток, например составление генетически сконструированных клеток, полученных в результате стадий трансдукционной обработки до или после культивирования, например культивирования и размножения, и/или одной или нескольких других стадий обработки, как описано. В некоторых вариантах осуществления, генетически сконструированные клетки составляют в виде композиций стандартной дозированной формы, включающих множество клеток для введения в данной дозе или ее части.

В некоторых вариантах осуществления, доза клеток, содержащая клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, представлена в виде композиции или состава, такого как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать в соответствии с представленными способами, такими как лечение заболеваний, состояний и нарушений, или в способах определения, диагностики и прогнозирования, а также в применениях и в готовых изделиях. В некоторых случаях, клетки могут быть составлены в количестве для дозированного введения, например, для введения однократной дозировки или введения множества доз.

В некоторых вариантах осуществления, клетки могут быть составлены в контейнере, таком как пакет или флакон. В некоторых вариантах осуществления, флаконом может быть флакон для инфузии. В некоторых вариантах осуществления, флакон составлен в ампулу со стандартной дозой сконструированных клеток, например, включающей количество клеток для введения в данной дозе или ее части.

В некоторых вариантах осуществления, клетки составлены в фармацевтически приемлемом буфере, который, в некоторых аспектах, может включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В некоторых вариантах осуществления, обработка включает замену среды на среду или буфер для состава, который является фармацевтически приемлемым или желательным для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в фармацевтически приемлемом буфере, который может включать один или несколько необязательных фармацевтически приемлемых носителей или эксципиентов. Примеры таких фармацевтических форм, включая фармацевтически приемлемые носители или

эксципиенты, могут быть любыми, описанными ниже в связи с формами, приемлемыми для введения клеток и композиций субъекту. Фармацевтическая композиция, в некоторых вариантах осуществления, содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество.

В некоторых вариантах осуществления, буфер для состава содержит криоконсервант. В некоторых вариантах осуществления, клетки составляют с раствором криоконсерванта, который содержит от 1,0% до 30% раствор ДМСО, например, от 5% до 20% раствор ДМСО или от 5% до 10% раствор ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, раствор для криоконсервации является или содержит, например, PBS, содержащий 20% ДМСО и 8% сывороточного альбумина человека (HSA), или другую подходящую среду для замораживания клеток. В некоторых вариантах осуществления, раствор криоконсерванта является или содержит, например, по меньшей мере, или примерно 7,5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления, стадии обработки могут включать промывание трансдуцированных и/или размноженных клеток для замены клеток в растворе криоконсерванта. В некоторых вариантах осуществления, клетки замораживают, например криозащищают или криоконсервируют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно или примерно 12,5%, 12,0%, 11,5%, 11,0%, 10,5%, 10,0%, 9,5%, 9,0%, 8,5%, 8,0%, 7,5%, 7,0%, 6,5%, 6,0%, 5,5% или 5,0% ДМСО, или от 1% до 15%, от 6% до 12%, от 5% до 10% или от 6% до 8% ДМСО. В конкретных вариантах осуществления, клетки замораживают, например криозащищают или криоконсервируют, в среде и/или растворе с конечной концентрацией точно примерно 5,0%, 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,25%, 1,0%, 0,75%, 0,5% или 0,25% HSA, или от 0,1% до 5%, от 0,25% до 4%, от 0,5% до 2%, или от 1% до 2% HSA.

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

В некоторых вариантах осуществления, такие стадии обработки для составления

клеточной композиции проводят в закрытой системе. Типовые стадии обработки могут быть выполнены с использованием центрифужной камеры в сочетании с одной или несколькими системами или наборами, связанными с системой обработки клеток, такой как центрифужная камера, производимая и продаваемая Biosafe SA, включая камеры для использования с Serax® или Serax 2® системами обработки клеток. Типовая система и процесс описаны в международной публикации № WO2016/073602. В некоторых вариантах осуществления, способ включает проведение экспрессии из внутренней полости центрифужной камеры составленной композиции, которая является полученной композицией клеток, составленной в буфере для состава, таком как фармацевтически приемлемый буфер, в любом из вышеупомянутых вариантов осуществления, как описано. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия составленной композиции происходит в контейнер, такой как флаконы для сосудов для биомедицинского материала, описанных в настоящем документе, который функционально связан как часть закрытой системы с центрифужной камерой. В некоторых вариантах осуществления, сосуды для биомедицинского материала сконфигурированы для интеграции и/или функционального соединения и/или интегрированы или функционально соединены с закрытой системой или устройством, которое выполняет одну или несколько стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления, сосуд для биомедицинского материала соединен с системой на линии вывода или в положении вывода. В некоторых случаях, закрытая система соединена с флаконом сосуда для биомедицинского материала во входной трубке. Примеры закрытых систем для использования с сосудами для биомедицинских материалов, описанные в настоящем документе, включают системы Serax® и Serax® 2.

В некоторых вариантах осуществления, закрытая система, такая как связанная с центрифужной камерой или системой обработки клеток, включает в себя многопортовый выходной комплект, содержащий многонаправленный трубчатый коллектор, связанный на каждом конце трубопровода с портом, к которому могут быть подсоединены один или несколько контейнеров для экспрессирования оставленной композиции. В некоторых аспектах, желаемое количество или множество флаконов может быть стерильно соединено с одним или несколькими, обычно с двумя или более, например, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более портами многопортового вывода. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько контейнеров, например сосудов для биомедицинского материала, могут быть прикреплены к портам или к не всем портам. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, система может влиять на экспрессию выходной композиции во множество флаконов сосудов для биомедицинского материала.

В некоторых аспектах, клетки могут быть экспрессированы в одном или нескольких из множества выходных контейнеров, например флаконов, в количестве для введения дозы, например, для введения однократной дозировки или введения множественной дозировки. Например, в некоторых вариантах осуществления, каждый флакон может содержать множество клеток для введения в данной дозе или ее части.

Таким образом, каждый флакон, в некоторых аспектах, может содержать одну стандартную дозу для введения или может содержать часть желаемой дозы, так что более чем один флакон из множества, например два флакона или 3 флакона, вместе составляют дозу для введения. В некоторых вариантах осуществления, 4 флакона вместе составляют дозу для введения.

Таким образом, контейнеры, например пакеты или флаконы, обычно содержат клетки для введения, например, одну или несколько их стандартных доз. Стандартная доза может представлять собой множество или количество клеток, которые должны быть введены субъекту, или удвоенное количество (или более) клеток, которые должны быть введены. Это может быть наименьшая доза или наименьшая возможная доза клеток, которую можно было бы ввести субъекту. В некоторых аспектах, представленные готовые изделия включают один или несколько из множества выходных контейнеров.

В некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров, например пакетов или флаконов, индивидуально содержит стандартную дозу клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, каждый из контейнеров содержит одинаковое или приблизительно или по существу одинаковое количество клеток. В некоторых вариантах осуществления, каждая стандартная доза содержит точно или примерно или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 сконструированных клеток, всего клеток, Т-клеток или РВМС. В некоторых вариантах осуществления, каждая стандартная доза содержит точно или примерно или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 или 1×10^8 CAR+ Т клеток, которыми являются CD3+, такими как CD4+ или CD8+, или их жизнеспособной подгруппой. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 10 мл и до точно или примерно 100 мл, например, точно или примерно или, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 20 мл, 30 мл, 40 мл, 50 мл, 60 мл, 70 мл, 80 мл, 90 мл или 100 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 1 мл до точно или примерно 10 мл, например, от точно или примерно 1 мл до точно или примерно 5 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 4 мл до точно или примерно 5 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет точно или примерно 4,4 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет точно или примерно 4,5 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет точно или оставляет примерно 4,6 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет точно или

примерно 4,7 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 4,8 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 4,9 мл. В некоторых вариантах осуществления, объем составленной клеточной композиции в каждом контейнере, например, пакете или флаконе, составляет от точно или примерно 5,0 мл.

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

В некоторых вариантах осуществления, клетки в контейнере, например в пакете

или флаконах, могут быть криоконсервированы. В некоторых вариантах осуществления, контейнер, например флаконы, можно хранить в жидком азоте до дальнейшего использования.

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

СПОСОБЫ ВЫБОРА СУБЪЕКТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИЛИ МОНИТОРИНГА ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ

Также в настоящем документе представлены способы, которые включают одну или несколько стадий оценки или скрининга для выявления или выбора субъектов для лечения с помощью комбинированной терапии и/или для продолжения комбинированной терапии, и/или для прогнозирования или оценки ответа на лечение (например, ответа или резистентности к лечению) и/или для мониторинга результатов лечения. Предлагаемые способы основаны на наблюдениях, что экспрессия одного или нескольких генов, способствующих выживанию (то есть анти-апоптотических генов), может быть связана с повышенной резистентностью или отсутствием ответа на цитотоксическую терапию, такую как CAR-T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы повышают вероятность ответа или эффективность лечения субъекта, такую как вероятность или ответ, или эффективность клеточной терапии у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлен способ, который включает выбор субъекта для лечения цитотоксической терапией, такой как любая из описанных, например CAR T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, способы включают (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака; (b) выбор субъекта для лечения цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, ниже контрольного значения гена; и (c) введение выбранному пациенту цитотоксической терапии, которая связывает антиген, ассоциированный с, экспрессируемый или присутствующий на раковых клетках.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлен способ выбора субъекта для лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в котором субъекту следует вводить цитотоксическую терапию, такую как любая из описанных, например, CAR T-клетки. В некоторых случаях, субъект болен раком. В некоторых вариантах осуществления, способы включают (а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект должен получать введение цитотоксической

терапии, которой является иммунотерапия или клеточная терапия, которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным с, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и (b) выбор субъекта, страдающего раком, для лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена. В некоторых случаях, способ дополнительно включает введение выбранному субъекту ингибитора в сочетании с цитотоксической терапией, например, в соответствии с любым из представленных способов. В других случаях, если субъект не выбран для лечения ингибитором в соответствии с представленным способом, субъекту назначают только цитотоксическую терапию без комбинированного введения с ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлен способ идентификации субъекта, у которого есть рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, где: (1) если такое спрогнозировано, предоставление субъекту лечения, альтернативного запланированному или внесенного в схему дозирования цитотоксической терапии и (2) не такое не спрогнозировано, предоставление субъекту цитотоксической терапии, такой как запланирована или внесена в схему дозирования. В таких вариантах осуществления, способ включает (a) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект является кандидатом на введение дозы цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия, которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным с, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и (b) идентификацию субъекта как больного раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

В некоторых вариантах осуществления, если у субъекта идентифицирован рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, способ дополнительно включает введение альтернативного лечения идентифицированному субъекту, где альтернативное лечение выбрано из следующего: комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность цитотоксической терапии; повышенная доза цитотоксической терапии; и/или химиотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является увеличение дозы цитотоксической терапии по сравнению с дозой цитотоксической терапии, даваемой

субъекту, у которого не идентифицирован рак, который, как предполагается, является резистентным к лечению цитотоксической терапией. В некоторых аспектах, повышенная доза цитотоксической терапии содержит увеличенное количество клеток цитотоксической терапии по сравнению с дозой цитотоксической терапии, вводимой субъекту, идентифицированному как имеющий рак, для которого не спрогнозирована резистентность к лечению цитотоксической терапией. В некоторых вариантах осуществления, альтернативное лечение проводится химиотерапевтическим агентом, таким как циклофосфамид, доксорубин, преднизон, винкристин, флударабин, бендамустин и/или ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления, альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность Т-клеточной терапии, такой как дополнительный агент, который является ингибитором иммунных контрольных точек, модулятором метаболического пути, антагонистом аденозинового рецептора, ингибитором киназы, анти-TGF β антителом или анти-TGF β R антителом, цитокином. В некоторых вариантах осуществления, альтернативное лечение включает комбинированное лечение цитотоксической терапией и ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, в соответствии с любым из представленных способов. В некоторых из таких вариантов осуществления, цитотоксическая терапия содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, который связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака.

В некоторых вариантах осуществления, если у субъекта выявлен рак, резистентность которого к лечению цитотоксической терапией не прогнозируется, субъекту вводят запланированную дозу или схему цитотоксической терапии.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлен способ определения реакции субъекта, страдающего раком, на цитотоксическую терапию, где субъектом является тот, который получил введение цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает (а) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где биологический образец получают от субъекта в первый раз до того, как субъекту вводят цитотоксическую терапию, и где субъект должен получать лечение с помощью цитотоксической терапии; (b) оценка уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где биологический образец

получают во второй раз после введения цитотоксической терапии субъекту, и где субъекту вводили цитотоксическую терапию до оценки на стадии (b); и (c) определение того, что субъект отвечает на терапию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, во второй раз ниже, чем уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в первый раз. В таких способах, субъект получил введение цитотоксической терапии перед введением на стадии (b).

В следующих подразделах представлены конкретные особенности проведения любого из представленных способов.

A. ОБРАЗЦЫ

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генных продуктов измеряют, оценивают и/или определяют в образце. В представленных вариантах осуществления, образцом является биологический образец, который взят, собран и/или получен от субъекта. В конкретных вариантах осуществления, образцом является образец опухоли, например образец биопсии опухоли. В конкретных вариантах осуществления, образцом является образец крови. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает заболеванием или состоянием и/или подозревается в наличии заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, субъект получил, получит или является кандидатом на лечение. В конкретных вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают от субъекта, который проходил, будет или является кандидатом на терапию. В конкретных вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают до лечения или введения терапии.

В конкретных вариантах осуществления, субъект еще не получил терапию. В некоторых вариантах осуществления, субъект включен в схему или будет получать терапию после оценки. В других вариантах осуществления, субъект является кандидатом на получение терапии и, в зависимости от результатов оценки в соответствии с представленными способами, будет получать терапию или будет получать альтернативную терапию или лечение. В любом из таких вариантов осуществления, образцом является образец от субъекта до введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец опухоли, например образец биопсии опухоли. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец крови.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают мониторинг ответа у субъекта, где субъект получил введение терапии. В таких вариантах осуществления, способы включают оценку первого образца до введения терапии и второго образца после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, первым образцом является образец от субъекта до введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, вторым образцом является образец от субъекта после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец опухоли, например образец биопсии. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец крови.

В некоторых вариантах осуществления, терапией является введение клеточной

терапии. В конкретных вариантах осуществления, терапией является введение иммунотерапии. В конкретных вариантах осуществления, терапией является введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В конкретных вариантах осуществления, терапией является комбинированная терапия, включающая введение клеточной терапии и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В конкретных вариантах осуществления, терапией является комбинированная терапия, включающая введение иммунотерапии и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, клеточная терапия лечит и/или способна вылечить заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, терапией является клеточная терапия, которая включает одну или несколько сконструированных клеток. В некоторых вариантах осуществления, сконструированные клетки экспрессируют рекомбинантный рецептор. В конкретных вариантах осуществления, рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапия лечит и/или способна лечить заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления, иммунотерапией является Т-клеточная рекрутинговая терапия, например биспецифическая Т-клеточная рекрутинговая терапия (BiTE).

В конкретных вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают от субъекта, который проходил, будет проходить или является кандидатом на терапию. В конкретных вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают до лечения или введения цитотоксической терапии, например, клеточной терапии или иммунотерапии. В соответствии с описанными в настоящем документе способами, наборами и готовыми изделиями, образец можно оценить на предмет одного или нескольких генных продуктов, которые ассоциированы /или коррелируют с клиническим исходом. Типовые генные продукты, которые ассоциированы с и/или коррелируют с вероятностью и/или возможностью клинического исхода на основе экспрессии в образце, собранном или полученном от субъекта после получения иммунотерапии или клеточной терапии, включают один или несколько генов, способствующих выживанию ((т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), например гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53* и *EZH2*). Таким образом, в некоторых аспектах, представленные способы относятся к идентификации субъектов до получения цитотоксической терапии (например, клеточной терапии, такой как CAR-T-клетки), которые, вероятно, смогут достичь определенного клинического результата, например полного ответа (CR), частичного ответа (PR) или прогрессирующего заболевания (PD). Как описано в другом месте в настоящем документе, способы можно использовать для определения того, является ли субъект кандидатом на введение цитотоксической терапии, является ли субъект кандидатом для введения комбинированной терапии, включающей цитотоксическую терапию и ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, и/или будет ли субъект демонстрировать клинический результат в ответ на терапию, например, CR, PR или PD в ответ на введение цитотоксической терапии.

В некоторых аспектах, представленные способы относятся к идентификации субъектов до получения терапии, такой как клеточная терапия (например, CAR T-клеточная терапия), которые могут демонстрировать ответ на клеточную терапию, такой как полный ответ (CR) или частичный ответ (PR), или которые вероятно могут демонстрировать полный ответ (CR) или частичный ответ (PR) на введение терапии. В некоторых аспектах, представленные способы относятся к идентификации субъектов до получения терапии, такой как клеточная терапия (например, CAR T-клеточная терапия), которые могут быть или у которых спрогнозирована резистентность к терапии, например, может быть или спрогнозировано отсутствие ответа/стабильное заболевание (NR/SD) в ответ на терапию, неполный ответ/стабильное заболевание (SD) в ответ на терапию или прогрессирующее заболевание (PD) после терапии, и/или субъектов, которые маловероятно проявят полный ответ (CR) или частичный ответ (PR) на введение терапии. Как описано в другом месте в настоящем документе, эти способы можно использовать для определения вероятности того, будет ли субъект демонстрировать полный ответ (CR), частичный ответ (PR), отсутствие ответа/стабильное заболевание (NR/SD), неполный ответ/стабильное заболевание (SD) и/или прогрессирующее заболевание (PD) в ответ на введение терапии, например клеточной терапии или иммунотерапии.

В некоторых вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают до лечения или введения терапии, например иммунотерапии или клеточной терапии. В соответствии с описанными в настоящем документе способами, наборами и готовыми изделиями, образец можно оценить на наличие одного или нескольких генных продуктов, которые связаны и/или коррелируют с клиническими результатами (например, CR, PR или PD) после получения терапии. Типовые генные продукты, которые связаны и/или коррелируют с вероятностью и/или возможностью клинического результата на основе экспрессии в образце, собранном или полученном от субъекта после получения иммунотерапии или клеточной терапии, включают один или несколько генов, способствующих выживанию ((т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), например гены семейства мус (с-мус, l-мус и n-мус,) p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, образец собирают в пределах или примерно в пределах или примерно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18 или 24 часа, или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 21, 28 дней или более до начала введения терапии, например, иммунотерапии или клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают после лечения или введения терапии, например иммунотерапии или клеточной терапии. В соответствии с описанными в настоящем документе способами, наборами и готовыми изделиями, образец можно оценить на предмет одного или нескольких генных продуктов, которые связаны и/или коррелируют с клиническими результатами (например, CR, PR или PD) после получения терапии. Типовые генные продукты, которые связаны и/или коррелируют с вероятностью и/или возможностью клинического результата на основе экспрессии в образце, собранном или полученном от субъекта после получения иммунотерапии или клеточной терапии, включают один или несколько генов,

способствующих выживанию ((т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), например генов семейства мус (с-мус, l-мус и n-мус,) p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, образец собирают, отбирают и/или получают от субъекта в пределах или примерно в течение или примерно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18 или 24 часов, или 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 21, 28 дней или более после начала введения терапии. В некоторых аспектах, образец собирают до того, как субъект демонстрирует признак или симптом ответа после введения терапии, такой как CR, PR, NR/SD, SD и/или PD.

В некоторых вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают от субъекта, который имеет или подозревается в наличии состояния или заболевания. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подозревается в наличии рака или пролиферативного заболевания. В конкретных вариантах осуществления, субъект имеет заболевание или состояние, или подозревается в наличии заболевания или состояния, которое ассоциировано с антигеном и/или ассоциировано с больными клетками, экспрессирующими антиген. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или состояние, например, рак или пролиферативное нарушение, ассоциировано с $\alpha\upsilon\beta 6$ интегрином ($\alpha\upsilon\beta 6$ интегрином), антигеном созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразой 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярным антигеном, раково/тестикулярным антигеном 1B (CTAG, также известным как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональным антигеном (CEA), циклином, циклином A2, С-С мотивом хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, циклин-зависимой киназой 4 (CDK4), хондроитинсульфатом протеогликана 4 (CSPG4), белком эпидермального фактора роста (EGFR), мутацией III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиальным гликопротеином 2 (EPG-2), эпителиальным гликопротеином 40 (EPG-40), эфрином B2, рецептором эфрина A2 (EPHa2), рецептором эстрогена, рецептором Fc типа 5 (FCRL5; также известным как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетальным ацетилхолиновым рецептором (фетальным AchR), фолатсвязывающим белком (FBP), рецептором фолиевой кислоты альфа, ганглиозидом GD2, О-ацетилированным GD2 (OGD2), ганглиозидом GD3, гликопротеином 100 (gp100), глипиканом-3 (GPC3), сопряженным с G белком рецептором класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназой erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димерами erbB, высокомолекулярным меланома-ассоциированным антигеном человека (HMW-MAA), поверхностным антигеном гепатита В, лейкоцитарным антигеном человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарным антигеном человека A2 (HLA-A2), рецептором альфа IL-22 (IL-22R α), рецептором альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептором со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепью каппа, молекулами клеточной адгезии L1 (L1CAM), CE7 эпитопом L1-CAM, богатым лейцином повтором, содержащим 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированным антигеном (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелином (MSLN), с-Met, цитомегаловирусом мыши (CMV), муцином 1 (MUC1), MUC16, лигандом естественного

киллера группы 2 члена D (NKG2D), меланом А (MART-1), молекулами адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальным антигеном, предпочтительно экспрессируемым антигеном меланомы (PRAME), рецептором прогестерона, простат-специфическим антигеном, антигеном стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфическим мембранным антигеном (PSMA), орфанным рецептором типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивином, гликопротеином трофобласта (TPBG, также известным как 5T4), опухолеассоциированным гликопротеином 72 (TAG72), родственным тирозиназе белком 1 (TRP1, также известным как TYRP1 или gp75), родственным тирозинкиназе белком 2 (TRP2, также известным как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептором фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептором фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухолью Вильмса 1 (WT-1), патоген-специфическим или патоген-экспрессируемым антигеном. В некоторых вариантах осуществления, антигеном является вирусный антиген (такой как вирусный антиген из HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальные антигены и/или паразитарные антигены. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает заболеванием или состоянием или подозревается в наличии заболевания или состояния, которое ассоциировано с CD19 и/или ассоциировано с больными клетками, экспрессирующими CD19. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает заболеванием или состоянием или подозревается в наличии заболевания или состояния, которое ассоциировано с белком семейства BCL2, способствующим выживанию, и/или ассоциировано с больными клетками, которые экспрессируют белок семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает заболеванием или состоянием или подозревается в наличии заболевания или состояния, которое связано со сверхэкспрессией белка семейства BCL2, способствующего выживанию и/или связано с больными клетками, которые сверхэкспрессируют белок семейства BCL2, способствующий выживанию.

В некоторых вариантах осуществления, образец берут, собирают и/или получают от субъекта, у которого есть или подозревается рак или пролиферативное заболевание, которым является В-клеточное злокачественное образование или гематологическое злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, раком или пролиферативным заболеванием является миелома, *например*, множественная миелома (MM), лимфома или лейкоз, лимфобластный лейкоз (ALL), неходжкинская лимфома (NHL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), фолликулярная лимфома (FL) и/или острый миелоидный лейкоз (AML). В некоторых вариантах осуществления, раком или пролиферативным заболеванием является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления, раком или пролиферативным заболеванием является малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, раком или пролиферативным нарушением является NHL. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подозревается в наличии NHL. В некоторых вариантах осуществления, NHL является DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, NHL является подтип

DLBCL, подобный В-клеткам зародышевого центра (GCB). В некоторых вариантах осуществления, NHL не является активированным В-клеточным (ABC) подтипом DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, NHL является DLBCL взрослых. В конкретных вариантах осуществления, NHL является FL. В конкретных вариантах осуществления, NHL является SLL. В конкретных вариантах осуществления, NHL является FL у детей.

В некоторых вариантах осуществления, образцом является биологический образец. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец ткани. В конкретных вариантах осуществления, образцом является или включает ткань, пораженную или предположительно пораженную заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления, образцом является или включает ткань, пораженную или предположительно пораженную раком или пролиферативным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, образцом является биопсия.

В некоторых вариантах осуществления, образец берут из ткани, имеющей опухоль или подозреваемой в наличии опухоли. В конкретных вариантах осуществления, образцом является или включает опухоль и/или микроокружение опухоли. В конкретных вариантах осуществления, опухоль является предраковой или злокачественной, или предполагается, что она является злокачественной или предраковой. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является первичную опухоль, т.е. опухоль обнаруживается на анатомическом участке, где первоначально возникло или появилось поражение. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является вторичная опухоль, например злокачественная опухоль, которая возникла из клетки внутри первичной опухоли, расположенной в другом участке тела. В некоторых вариантах осуществления, образец содержит одну или несколько клеток, которыми являются раковые клетки и/или опухолевые клетки.

В конкретных вариантах осуществления, образец берут из места поражения и/или опухоли, которые ассоциированы с или вызваны, или предположительно ассоциированы с или вызваны не гематологическим раком, например, солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления, опухоль ассоциирована или вызвана, или предположительно ассоциирована или вызвана раком мочевого пузыря, легкого, мозга, меланомой (*например*, мелкоклеточной меланомой легкого), груди, шейки матки, яичников, прямой и ободочной кишки, поджелудочной железы, эндометрия, пищевода, почки, печени, простаты, кожи, щитовидной железы, лимфатического узла или матки. В некоторых вариантах осуществления, поражение ассоциировано или вызвано раком поджелудочной железы, раком мочевого пузыря, колоректальным раком, раком груди, раком простаты, раком почек, гепатоцеллюлярным раком, раком легких, раком яичников, раком шейки матки, раком поджелудочной железы, раком прямой кишки, раком щитовидной железы, раком матки, раком желудка, раком пищевода, раком головы и шеи, меланомой, нейроэндокринным раком, раком ЦНС, опухолями головного мозга, раком костей или саркомой мягких тканей. В некоторых вариантах осуществления, образец содержит ткань лимфатического узла, например биопсию лимфатического узла. В некоторых вариантах

осуществления, образец содержит одну или несколько раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления, образец содержит одну или несколько клеток, подозреваемых в злокачественности.

В некоторых вариантах осуществления, образец собирают из места поражения или опухоли, которые ассоциированы или вызваны В-клеточным злокачественным образованием или гематологическим злокачественным образованием. В некоторых вариантах осуществления, поражение или опухоль ассоциированы с миеломой, например множественной миеломой (MM), лимфомой или лейкозом, лимфобластным лейкозом (ALL), неходжкинской лимфомой (NHL), хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и/или острым миелоидным лейкозом (AML). В некоторых вариантах осуществления, поражение или опухоль ассоциированы с CLL. В некоторых вариантах осуществления, поражение или опухоль ассоциированы с или вызваны NHL, например, DLBCL или FL. В некоторых вариантах осуществления, поражение или опухоль ассоциированы с или вызваны малой лимфоцитарной лимфомой (SLL). В некоторых вариантах осуществления, поражением или опухолью является DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, поражением или опухолью является FL. В некоторых вариантах осуществления, поражением или опухолью является SLL.

В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец ткани, например биопсия ткани. В конкретных вариантах осуществления, образец получают, собирают или берут из соединительной ткани, мышечной ткани, нервной ткани или эпителиальной ткани. В некоторых вариантах осуществления, поражение присутствует на сердце, сосудистой сети, слюнных железах, пищеводе, желудке, печени, желчном пузыре, поджелудочной железе, кишечнике, толстой кишке, прямой кишке, гипоталамусе, гипофизе, шишковидной железе, щитовидной железе, паращитовидной железе, надпочечнике, почке, мочеточнике, мочевом пузыре, груди, уретре, лимфатической системе, коже, мышце, мозге, спинном мозге, нервах, яичниках, матке, яичках, простате, глотке, гортани, трахее, бронхах, легких, диафрагме, кости, хряще, связках или сухожилиях. В конкретных вариантах осуществления, образец получают, собирают или берут из костного мозга. В некоторых вариантах осуществления, образцом является аспират костного мозга.

В некоторых вариантах осуществления, образцом является физиологическая жидкость от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец крови, сыворотки, плазмы или мочи. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец плазмы.

В конкретных вариантах осуществления, образец не содержит терапию, например клеточную терапию или иммунотерапию. В конкретных вариантах осуществления, образец не содержит какие-либо клетки, например, сконструированные клетки клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления, терапия включает Т-клеточную терапию, и образец не содержит какие-либо сконструированные Т-клетки и/или какую-либо Т-клеточную терапию. В конкретных вариантах осуществления, образец не содержит

какие-либо сконструированные клетки, которые экспрессируют рекомбинантный рецептор, например CAR. В некоторых вариантах осуществления, образец не содержит клетки, экспрессирующие CAR.

В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с NHL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие NHL, и генным продуктом является полинуклеотид, такой как РНК, например иРНК. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с NHL или у которого есть вероятность или подозрение на наличие NHL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с DLBCL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие DLBCL, и генным продуктом является полинуклеотид, такой как РНК, например иРНК. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с DLBCL или у которого есть вероятность или подозрение на наличие DLBCL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с FL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие FL, и генным продуктом является полинуклеотид, такой как РНК, например иРНК. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с FL или у которого есть вероятность или подозрение на наличие FL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с SLL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие SLL, и генным продуктом является полинуклеотид, такой как РНК, например иРНК. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с SLL или у которого есть вероятность или подозрение на наличие SLL, и генным продуктом является белок.

В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта, страдающего лейкозом, или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на лейкоз, и генным продуктом является полинуклеотид, такой как РНК, например иРНК. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта, страдающего лейкозом или у которого есть вероятность или подозрение на наличие лейкоза, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с CLL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие CLL, и генным продуктом является полинуклеотид, такой как РНК, например иРНК. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является аспират костного мозга от субъекта с CLL или у которого есть вероятность или подозрение на наличие CLL, и генным продуктом является белок.

В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является биопсия лимфатического узла от субъекта с NHL или субъекта, у которого есть вероятность или

на наличие NHL, и генным продуктом является полинуклеотид. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с DLBCL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие DLBCL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления образцом является образец жидкости организма от субъекта с DLBCL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие DLBCL, и генным продуктом является полинуклеотид. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с FL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие FL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с FL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие FL, и генным продуктом является полинуклеотид. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с SLL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие SLL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с SLL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие SLL, и генным продуктом является полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, образцом жидкости организма является образец плазмы. В некоторых вариантах осуществления, образцом жидкости организма является образец крови.

В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта, страдающего лейкозом, или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на лейкоз, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма пациента, страдающего лейкозом, или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на лейкоз, и генным продуктом является полинуклеотид. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с CLL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие CLL, и генным продуктом является белок. В любом из представленных вариантов осуществления, образцом является образец жидкости организма от субъекта с CLL или субъекта, у которого есть вероятность или подозрение на наличие CLL, и генным продуктом является полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, образцом жидкости организма является образец плазмы. В некоторых вариантах осуществления, образцом жидкости организма является образец крови.

В. ИЗМЕРЕНИЕ ИЛИ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИЛИ ГЕННЫХ ПРОДУКТОВ

[0663] В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, включают одну или несколько стадий оценки, измерения, определения и/или количественного определения экспрессии одного или нескольких

генов в образце. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия гена, например, гена с экспрессией, которая положительно или отрицательно коррелирует с клиническим результатом, является или включает оценку, измерение, определение и/или количественное определение уровня, количества или концентрации генного продукта в образце. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия гена является или включает процесс, посредством которого информация гена используется в синтезе генного продукта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является любая биомолекула, которая собирается, создается и/или синтезируется с информацией, кодированной геном, и может включать полинуклеотиды и/или полипептиды. В конкретных вариантах осуществления, оценка, измерение и/или определение экспрессии гена включает определение или измерение уровня, количества или концентрации генного продукта. В некоторых вариантах осуществления, уровень, количество или концентрация генного продукта могут быть трансформированными (например, нормализованными) или непосредственно проанализированными (например, не обработанными). В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является белок, кодированный геном. В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является полинуклеотид, например иРНК, или белок, кодированный геном.

В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является полинуклеотид, который экспрессирован и/или кодирован геном. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидом является РНК. В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является информационная РНК (иРНК), транспортная РНК (тРНК), рибосомная РНК, малая ядерная РНК, малая ядрышковая РНК, антисмысловая РНК, длинная некодирующая РНК, микроРНК, Рiwi-взаимодействующая РНК, малая интерферирующая РНК и/или короткая шпилечная РНК. В конкретных вариантах осуществления, генным продуктом является иРНК.

В конкретных вариантах осуществления количество или уровень полинуклеотида в образце можно оценивать, измерять, определять и/или количественно определять любыми подходящими способами, известными в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления, количество или уровень полинуклеотидного генного продукта можно оценить, измерить, определить и/или количественно оценить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая ПЦР с обратной транскриптазой (rt), цифровую капельную ПЦР, ПЦР в реальном времени и количественную ПЦР (кПЦР) (включая, например, TAQMAN®, молекулярный маяк, LIGHTUP™, SCORPION™, SIMPLEPROBES®; см., например, патенты США №№ 5,538,848; 5,925,517; 6,174,670; 6,329,144; 6,326,145 и 6,635,427); нозерн-блоттинг; саузерн-блоттинг, например, продуктов обратной транскрипции и производных; способы на основе чипов, включая блотированные чипы, микрочипы или чипы, синтезированные *in situ*; и секвенирование, например, секвенирование путем синтеза, пиросеквенирование, дидеокси-секвенирование или секвенирование путем лигирования или любые другие способы, известные в данной области техники, такие как обсуждаются в Shendure et al., *Nat. Rev. Genet.* 5:335-44 (2004)

или Nowgousian, Euk. Cell 9(9): 1300-1310 (2010), включая такие специальные платформы, как HELICOS®, ROCHE® 454, ILLUMINA®/SOLEXA®, ABI SOLiD® и POLONATOR® секвенирование. В конкретных вариантах осуществления, уровни генных продуктов нуклеиновых кислот измеряют способами количественной ПЦР (кПЦР), такими как кРВ-ПЦР. В некоторых вариантах осуществления, кРВ-ПЦР использует три набора нуклеиновых кислот для каждого гена, где три нуклеиновые кислоты содержат пару праймеров вместе с зондом, который связывается между областями нуклеиновой кислоты-мишени, где связываются праймеры - известные коммерчески как TAQMAN® анализ.

В конкретных вариантах осуществления, оценка, измерение, определение и/или количественная оценка количества или уровня генного продукта РНК включает стадию создания, полимеризации и/или получения полинуклеотида кДНК и/или олигонуклеотида кДНК из генного продукта РНК. В некоторых вариантах осуществления, генный продукт РНК оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют путем непосредственной оценки, измерения, определения и/или количественного определения полинуклеотида кДНК и/или олигонуклеотида кДНК, который получают из генного продукта РНК.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько олигонуклеотидных праймеров контактируют с генным продуктом РНК и/или полинуклеотидом или олигонуклеотидом кДНК, полученным из генного продукта РНК, для оценки, измерения, определения и/или количественного определения уровня, количества или концентрации генного продукта РНК. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены олигонуклеотидные праймеры, которые подходят для оценки, измерения, определения и/или количественного определения уровня, количества или концентрации генного продукта РНК (или полученной из него кДНК). В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотидные праймеры гибридизуются и/или способны гибридизоваться с генным продуктом РНК и/или полученной из него кДНК. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид гибридизуется и/или способен гибридизоваться с генным продуктом РНК или полученной из него кДНК, которая экспрессирована и/или кодирована одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, оказывающими анти-апоптотическое действие), такими как гены семейства мус (с-мус, l-мус и n-мус), p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, наборы олигонуклеотидных праймеров могут быть приготовлены для любого из генных продуктов РНК, которые кодированы одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), такими, как гены семейства мус (с-мус, l- мус и n-мус), p53 и EZH2, или описанные в любом месте заявки. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотидные праймеры могут быть легко сконструированы обычным специалистом в области молекулярной биологии для получения праймеров, специфичных для данного генного продукта РНК. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотидный праймер имеет длину примерно 10-100 нуклеотидов, например, примерно 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 нуклеотидов или более), и последовательность праймеров может быть легко скорректирована для достижения желаемой температуры плавления («Tm»; например, примерно 45-72°C, например, примерно 45, 50, 55, 60, 65, 70, 72°C или более) и специфичности. Специалист в данной области техники легко примет во внимание такие факторы, как вторичные структуры, димеры праймеров, концентрации солей, концентрации нуклеиновых кислот и так далее. Олигонуклеотидные праймеры, представленные в настоящем документе, могут состоять из (или состоять по существу из) встречающихся в природе дезоксирибонуклеотидов или, необязательно, могут содержать модификации, такие как не природные нуклеотиды, искусственные скелеты (такие как PNA) и определяемые метки, такие как флуоресцентные метки. В конкретных вариантах осуществления, флуоресцентная метка присоединена, например, ковалентно присоединена, к олигонуклеотидному праймеру.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию двух или нескольких генов измеряют или оценивают одновременно. В некоторых вариантах осуществления, множественная ПЦР, например, множественная ОТ-ПЦР оценка или множественная количественная ПЦР (кПЦР) для измерения, определения и/или количественной оценки уровня, количества или концентрации двух или нескольких генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления, микрочипы (например, чипы AFFYMETRIX®, AGILENT® и ILLUMINA® стиля) используют для оценки, измерения, определения и/или количественного определения уровня, количества или концентрации двух или нескольких генных продуктов. В некоторых вариантах осуществления, микрочипы используют для оценки, измерения, определения и/или количественной оценки уровня, количества или концентрации полинуклеотида кДНК, который получен из генного продукта РНК.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессия одного или нескольких генных продуктов, например, полинуклеотидных генных продуктов, определяется секвенированием генного продукта и/или секвенированием полинуклеотида кДНК, полученного из генного продукта. В некоторых вариантах осуществления, секвенирование выполняют способом секвенирования не по Сэнгеру и/или методом секвенирования следующего поколения (NGS). Примеры методов секвенирования следующего поколения включают, но не ограничены ими, массивно-параллельное опознавательное секвенирование (MPSS), секвенирование Полони, пиросеквенирование, обратимое секвенирование dye-terminator, секвенирование SOLiD, ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование ДНК на наносферах, секвенирование отдельных молекул в гелиоскопе, секвенирование отдельных молекул в реальном времени (SMRT), секвенирование отдельных молекул в реальном времени (PHKP) и секвенирование ДНК через нанопоры.

В некоторых вариантах осуществления, методом NGS является секвенирование РНК (РНК-Seq). В конкретных вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких полинуклеотидных генных продуктов измеряют, определяют и/или

количественно определяют с помощью РНК-Seq. РНК-Seq, также называемое дробным секвенированием полного транскриптома, определяет присутствие и количество РНК в образце. Способы секвенирования РНК были адаптированы для наиболее распространенных платформ секвенирования ДНК [HiSeq systems (Illumina), 454 Genome Sequencer FLX System (Roche), Applied Biosystems SOLiD (Life Technologies), IonTorrent (Life Technologies)]. Эти платформы требуют начальной обратной транскрипции РНК в кДНК. И наоборот, секвенатор отдельной молекулы HeliScope (Helicos BioSciences) может использовать РНК в качестве шаблона для секвенирования. Также было продемонстрировано доказательство принципа прямого секвенирования РНК на платформе PacBio RS (Pacific Bioscience). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генных продуктов РНК оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют с помощью РНК-seq.

В некоторых вариантах осуществления, РНК-seq является РНК-seq на основе метки. В способах на основе метки каждый транскрипт представлен уникальной меткой. Первоначально подходы на основе метки были разработаны как способ на основе последовательностей для измерения количества транскриптов и идентификации дифференциально экспрессируемых генов, предполагая, что количество меток (число) напрямую соответствует копийности молекул иРНК. Сниженная сложность образца, полученная путем секвенирования определенной области, была важна для того, чтобы сделать способы на основе Сэнгера возможными. Когда технология NGS стала доступной, большое количество считываний, которые можно было сгенерировать, облегчило анализ дифференциальной экспрессии генов. Сдвиг длины транскрипта при количественной оценке уровней экспрессии генов, такая как наблюдаемая для дробных способов, не принимается во внимание в способах на основе метки. Все способы на основе метки по определению являются цепь-специфичными. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько генных продуктов РНК оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют с помощью РНК-seq на основе метки.

В некоторых вариантах осуществления, РНК-seq является дробной РНК-seq. Было описано множество протоколов для дробной РНК-seq, но у них много общих стадий: фрагментация (которая может происходить на уровне РНК или кДНК), превращение РНК в кДНК (проводимое олиго-dT или случайными праймерами), синтез второй цепи, лигирование адапторных последовательностей на 3' и 5' концах (на уровне РНК или ДНК) и конечная амплификация. В некоторых вариантах осуществления, РНК-seq может фокусироваться только на молекулах полиаденилированной РНК (в основном иРНК, но также и некоторых lncРНК, snoРНК, псевдогенах и гистонах), если поли (A)⁺ РНК выбирают до фрагментации, или могут также включать не полиаденилированные РНК, если селекцию не проводят. В последнем случае, рибосомная РНК (более 80% общего пула РНК) должна быть истощена до фрагментации. Таким образом, очевидно, что различия в захвате части иРНК транскриптома приводят к частичному наложению типов определенных транскриптов. Более того, различные протоколы могут влиять на

копийность и распределение секвенированных считываемых фрагментов. Это затрудняет сравнение результатов экспериментов с различными протоколами получения библиотек.

В некоторых вариантах осуществления, РНК из каждого образца, такого как образец биопсии каждого лимфатического узла, получают, фрагментируют и используют для создания образцов комплементарной ДНК (кДНК), таких как библиотеки кДНК для секвенирования. Считываемые фрагменты могут обрабатываться и выравниваться с геномом человека, и ожидаемое количество картирований на ген/изоформу оценивают и используют для определения количества считываемых фрагментов. В некоторых вариантах осуществления, подсчет считываемых фрагментов нормализован по длине генов/изоформ и количеству считываемых фрагментов в библиотеке, чтобы получить FPKM, нормализованный, например, по длине генов/изоформ и количеству считываемых фрагментов в библиотеке, чтобы получить количество фрагментов на тысячу нуклеотидов экзона на миллион картированных считываемых фрагментов (FPKM) в соответствии с длиной гена и общим количеством картированных считываемых фрагментов. В некоторых аспектах, нормализация между выборками достигается посредством нормализации, такой как нормализация 75-го квантиля, где каждый образец масштабируют по медиане 75-го квантиля из всех образцов, например, для получения значений FPKM (FPKQ), нормированных на квантиль. Значения FPKQ могут быть log-преобразованы (\log_2).

В некоторых вариантах осуществления, методы и способы, включающие нуклеотидные аптамеры, используют для измерения, оценки, количественного определения и/или определения уровня, количества или концентрации продукта полинуклеотидного гена. Подходящие нуклеотидные аптамеры известны и включают те, что описаны в Cox and Ellington, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2001) 9 (10): 2525-2531; Cox et al., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. (2002) 5 (4): 289-29; Cox et al., *Nucleic Acids Research*. (2002) 30(20): e108.

В некоторых вариантах осуществления, РНК-seq проводят для секвенирования общей РНК, например, общей РНК образца. В конкретных вариантах осуществления, РНК-seq проводят для секвенирования одной или нескольких из иРНК, тРНК, рибосомной РНК, малой ядерной РНК, малой ядрышковой РНК, антисмысловой РНК, длинной не кодирующей РНК, микроРНК, Рiwi-взаимодействующей РНК, малой интерферирующей РНК, и/или короткой шпилечной РНК. В некоторых вариантах осуществления, РНК-seq проводят для секвенирования только иРНК, тРНК, рибосомной РНК, малой ядерной РНК, малой ядрышковой РНК, антисмысловой РНК, длинной не кодирующей РНК, микроРНК, Рiwi-взаимодействующей РНК, малой интерферирующей РНК и/или короткой шпилечной РНК. В конкретных вариантах осуществления, РНК-seq проводят для секвенирования генных продуктов иРНК.

В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является или включает белок, т.е. полипептид, который кодирован и/или экспрессирован геном. В конкретных вариантах осуществления, генный продукт кодирует белок, который локализован и/или экспонирован на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления, белком

является растворимый белок. В некоторых вариантах осуществления, белок секретируется клеткой.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессией гена является количество, уровень и/или концентрация белка, который кодирован геном. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько белковых генных продуктов измеряют любыми подходящими способами, известными в данной области техники. Подходящие способы для оценки, измерения, определения и/или количественного определения уровня, количества или концентрации или более или более белковых генных продуктов включают, но не ограничиваются ими, определение с помощью иммуноанализа, методы аптамеров на основе нуклеиновых кислот или белков, ВЭЖХ (высокоточная жидкостная хроматография), пептидное секвенирование (такое как секвенирование деградации по Эдману или масс-спектрометрия (например, МС/МС), необязательно в сочетании с ВЭЖХ) и адаптации микрочипа любого из вышеперечисленных (включая чипы нуклеиновых кислот, антитела или белок-белок (т.е. не антитело)). В некоторых вариантах осуществления, иммуноанализ является или включает способы или анализы, которые обнаруживают белки на основе иммунологической реакции, например, путем определения связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела с генным продуктом. Иммуноанализы включают, но не ограничены ими, количественную иммуноцитохимию или иммуногистохимию, ELISA (включая прямой, непрямой, сэндвич, конкурентный, множественный и портативный ELISA (см., например, патент США № 7,510,687), вестерн-блоттинг (включая одно-, двух- или более мерный блоттинг или другие хроматографические средства, необязательно включая секвенирование пептидов), иммуноферментный анализ (EIA), RIA (радиоиммуноанализ) и SPR (поверхностный плазмонный резонанс).

В некоторых вариантах осуществления, продуктом экспрессии гена является белок. В конкретных вариантах осуществления, продуктом экспрессии гена является фракция, часть, вариант, версия и/или изоформа белка, например, белка, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), например, генами семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус), p53 и EZH2. В конкретных вариантах осуществления, фракция, часть, вариант, версия и/или изоформа белка являются растворимыми. В некоторых вариантах осуществления, во фракции, части, варианте, версии и/или изоформе белка отсутствует трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления, фракция, часть, вариант, версия и/или изоформа белка не экспрессируется на поверхности клетки или внутри нее. В некоторых вариантах осуществления, фракция, часть, вариант, версия и/или изоформа белка отщеплены от поверхности клетки.

Практика способов, наборов и композиций, представленных в настоящем документе, также может использовать обычные биологические способы, программное обеспечение и системы. Например, средства для измерения уровня экспрессии транскриптов или частичных транскриптов одного или нескольких генов,

способствующих выживанию (т. е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *p-muc*), *p53* и *EZH2*; средства для корреляции уровня экспрессии с классификацией вероятности и/или возможности (например, клинического результата, например CR, PR или PD) после введения и/или ассоциированного с терапией; и средства для вывода вероятности и/или возможности могут использовать обычные биологические способы, программное обеспечение и системы, как описано в настоящем документе или как иным образом известно. Компьютерные программные продукты для использования с представленными способами, композициями и наборами обычно включают машиночитаемый носитель с машиноисполняемыми инструкциями для выполнения логических этапов способа по изобретению. Подходящий машиночитаемый носитель включает гибкий диск, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, жесткий диск, флэш-память, ROM/RAM, магнитные ленты и т. д. Компьютерные исполняемые инструкции могут быть написаны на подходящем компьютерном языке или комбинации нескольких языков. Основные способы вычислительной биологии описаны, например, в Setubal and Meidanis et al., *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi and Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, London, 2000) и Ouelette and Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2^{sup}.nd ed., 2001). См. патент США. № 6,420,108.

В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, включают стадию оценки одного или нескольких генов в образце путем оценки, измерения, определения и/или количественного определения количества соответствующих одного или нескольких генных продуктов в образце. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов в образце, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциирован с клиническим ответом, например, CR, PR или PD, измеряют путем определения количества или уровня одного или нескольких соответствующих генных продуктов в образце. В некоторых вариантах осуществления, экспрессией гена в образце является уровень, количество или концентрация генного продукта, который кодируется геном.

В конкретных вариантах осуществления, в образце измеряют экспрессию одного или нескольких генов, которые отрицательно коррелируют и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом, например, CR, PR или PD. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов, которые отрицательно коррелируют и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом, оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют через определение количества или уровня продукта, кодированного, продуцированного и/или экспрессированного геном.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генных продуктов

кодируются, продуцируются и/или экспрессируются одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), такими как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc*, и *n-muc*), *p53* и *EZH2*. В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является одна из двух или нескольких изоформ, которые кодируются геном. В конкретных вариантах осуществления, одним или несколькими генными продуктами являются продукты одного или нескольких генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53* и *EZH2* или их часть.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов, которые отрицательно коррелируют и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом, например, *PD*, оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют через определение количества или уровня РНК продукта, кодированного, продуцированного и/или экспрессированного одним или несколькими генами. В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является иРНК. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генными продуктами являются иРНК, продуцированные или кодированные одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), такими как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53* и *EZH2*.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов, которые отрицательно коррелируют и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом, например, *PD*, оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют через определение количества или уровня белка, кодированного или экспрессированного одним или несколькими генами. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генными продуктами являются белки или их части или варианты, которые кодируются, продуцируются и/или экспрессируются одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), такими как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53* и *EZH2*.

В конкретных вариантах осуществления, в образце измеряют экспрессию одного или нескольких генов, которые положительно коррелируют и/или положительно ассоциированы с клиническим результатом, например *CR* или *PR*. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов, которые положительно коррелируют и/или положительно ассоциированы с токсичностью, оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют через определение количества или уровня продукта, кодируемого, продуцируемого и/или экспрессированного геном. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генных продуктов кодируются, продуцируются и/или экспрессируются одним или несколькими генами способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), например генами семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc*, и *n-muc*), *p53* и *EZH2*. В

некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является одна из двух или нескольких изоформ, которые кодированы геном. В конкретных вариантах осуществления, одним или несколькими генными продуктами являются продукты одного или нескольких генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53* и *EZH2*.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов, которые положительно коррелируют и/или положительно ассоциированы с клиническим результатом, например, *CR* или *PR*, оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют через определение количества или уровня РНК продукта, кодированного, продуцированного и/или экспрессированного одним или несколькими генами. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими генными продуктами являются одна или несколько иРНК или ее часть или частичный транскрипт одного или нескольких генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53* и *EZH2*.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию одного или нескольких генов, которые положительно коррелируют и/или положительно ассоциированы с клиническим результатом, например, *CR* или *PR*, оценивают, измеряют, определяют и/или количественно определяют через определение количества или уровня белка, кодированного или экспрессированного геном. В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является белок, кодированный, продуцированный и/или экспрессированный одним или несколькими генами, способствующими выживанию (т.е. генами, обеспечивающими анти-апоптотическое действие), такими как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc*, и *n-muc*), *p53* и *EZH2*.

В некоторых вариантах осуществления измерение, оценка, определение и/или количественное определение одного или нескольких генных продуктов в образце не является прогнозирующим и/или не ассоциировано или не коррелирует с клиническим результатом (например, *CR*, *PR* или *PD*) в момент времени взятия пробы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, профиль экспрессии любого из одного или нескольких генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства *muc* (*c-muc*, *l-muc* и *n-muc*), *p53*, и *EZH2*, не являются прогнозирующими, не коррелируют и/или не ассоциированы с клиническим результатом (например, *CR*, *PR* или *PD*) в момент, когда образец собирают во время или после того, как субъект получил лечение терапией, например, клеточной терапией, содержащей CAR-T-клетки.

1. НОРМАЛИЗАЦИЯ К КОНТРОЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЯМ

В некоторых вариантах осуществления, оценку, определение, измерение и/или количественное определение генного продукта, например, генного продукта РНК или белка, в образце нормализуют до контрольного значения. В некоторых вариантах

осуществления, нормализацию к одному или нескольким контрольным значениям можно проводить для анализа, оценки или определения того, указывает ли количество или уровень генного продукта на то, повышена или снижена экспрессия гена, и/или является высокой или низкой. В конкретных вариантах осуществления, нормализация до контрольных значений может использоваться для сравнения экспрессии гена одного образца с экспрессией гена другого образца.

В конкретных вариантах осуществления, контрольным значением является измерение или значение измерения другого генного продукта. В некоторых вариантах осуществления, другим генным продуктом является генный продукт домашнего гена. В некоторых вариантах осуществления, домашним геном является конститутивно активный ген, например ген, который требуется для поддержания основной клеточной функции. Примеры подходящих домашних генов известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, гены, кодирующие АКТВ (бета-актин), В2М (бета-2-микроглобулин), GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу), RPLP0 (60S кислый рибосомный белок P0), GUSB (бета-глюкуронидазу), HMBS (гидроксиметилбилансинтазу), HPRT1 (гипоксантинфосфорибозилтрансферазу 1), RPL13A (рибосомный белок L13a), SDHA, субъединица А комплекса сукцинатдегидрогеназы) TBP (связывающий белок ТАТА-бокса), TFRC (рецептор трансферрина 1) и UBC (убиквитин С). В некоторых вариантах осуществления, контрольное значение измеряют в том же образце, что и генный продукт.

В некоторых вариантах осуществления, генный продукт сравнивают и/или нормализуют с контрольным значением, которое является измерением или значением измерения генного продукта из того же гена. В некоторых вариантах осуществления, контрольным значением является измерение или значение измерения, полученное из одного или нескольких контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, генный продукт и контрольное значение измеряют в разных образцах. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько контрольных образцов имеют идентичный, такой же или аналогичный тканевый состав и/или клеточный состав, что и образец. В некоторых вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из одной, похожей и/или идентичной ткани от одного и того же субъекта. В конкретных вариантах осуществления, образец и контрольный образец являются разными образцами из одной и той же ткани у разных субъектов. В конкретных вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из одной, похожей и/или аналогичной ткани от разных субъектов. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими образцами являются образцы биопсии лимфатических узлов, и одним или несколькими контрольными образцами являются образцы биопсии лимфатических узлов. В конкретных вариантах осуществления, одним или несколькими образцами являются образцы крови, например образцы периферической крови, и одним или несколькими контрольными образцами являются образцы крови.

В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от

субъекта, у которого нет состояния и/или рака. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец не включает и/или не подозревается в наличии одной или нескольких опухолевых клеток. В конкретных вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из той же, похожей и/или идентичной ткани от разных субъектов. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, которого лечат ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, которого не лечат ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, который демонстрирует прогрессирующее заболевание (PD) после лечения терапией, например клеточной терапией или иммунотерапией. В некоторых вариантах осуществления, контрольные образцы получают от субъекта, демонстрирующего PD, по меньшей мере, через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, который демонстрирует частичный ответ (PR) или полный ответ (CR) после лечения терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, контрольные образцы получают от субъекта, демонстрирующего PR или CR, по меньшей мере, через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более после введения терапия.

В некоторых вариантах осуществления оценку, определение, измерение и/или количественную оценку генного продукта, например, РНК или белкового генного продукта, в образце нормализуют и/или сравнивают с двумя или несколькими контрольными значениями. В некоторых вариантах осуществления, два или несколько контрольных значений включают контрольное значение, которое является измерением, или значение измерения, которое является измерением того же генного продукта, и контрольное значение, которое является измерением, или значение измерения, которое другого генного продукта.

В некоторых вариантах осуществления, контрольное значение было определено заранее. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько контрольных значений измеряют или получают параллельно с оценкой, измерением, определением и/или количественным определением одного или нескольких генных продуктов в образце.

В конкретных вариантах осуществления, контрольным значением является среднее значение (например, среднее арифметическое) или медианное количество или уровень экспрессии одного или нескольких генных продуктов, полученных из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, множество контрольных образцов получают от отдельных контрольных субъектов. В конкретных вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии состояния или

заболевания. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии рака. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии NHL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип NHL фолликулярная лимфома (FL). В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип NHL диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип NHL малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии лейкоза. В конкретных вариантах осуществления, подтипом лейкоза является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является множество субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии рака. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии неходжкинской лимфомы (NHL). В некоторых вариантах осуществления, множество отдельных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или которые подозреваются в наличии определенного подтипа NHL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии NHL, но не конкретного подтипа NHL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип DLBCL для ALL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов с DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип FL для ALL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов с FL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является SLL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов с SLL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии лейкоза. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии определенного типа лейкоза. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL). В конкретных вариантах осуществления, типом лейкоза является CLL.

В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является множество субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии

рака. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии определенного подтипа DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии DLBCL, но не конкретного подтипа DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом DLBCL является подтип DLBCL В-клеток зародышевого центра (GCB). В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов GCB DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом DLBCL является подтип DLBCL активированных В-клеток (ABC). В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов ABC DLBCL.

В некоторых вариантах осуществления, контрольное значение получают из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, множество контрольных образцов содержит, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 15, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 25, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 300, по меньшей мере, 400 или по меньшей мере, 500 контрольных образцов.

В некоторых вариантах осуществления, оценка, измерение, определение или количественная оценка экспрессии гена, например, количества или уровня одного или нескольких генных продуктов, могут быть проанализированы любыми способами в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, до анализа, необработанные данные экспрессии гена, например значение измеренного и/или количественно определенного уровня, количества или концентрации генного продукта, могут быть нормализованы или преобразованы, например, логарифмически нормализованы, выражены как коэффициент экспрессии, процентильный и/или квантильный. В некоторых вариантах осуществления, данные экспрессии генов могут быть дополнительно модифицированы с помощью любого подхода непараметрического масштабирования данных. В некоторых вариантах осуществления преобразование измерения или оценки экспрессии одного или нескольких генных продуктов происходит до любой нормализации для контроля. В некоторых вариантах осуществления, преобразование измерения или оценки экспрессии одного или нескольких генных продуктов происходит после нормализации до контрольного значения. В некоторых вариантах осуществления, преобразованием является логарифмическое преобразование, преобразование степени или логит-преобразование. В некоторых вариантах осуществления, логарифмическим преобразованием является десятичный логарифм ($\log_{10}(x)$), натуральный логарифм ($\ln(x)$) или двоичный логарифм ($\log_2(x)$).

Шаблоны экспрессии могут быть оценены и классифицированы множеством средств, таких как общая линейная модель (GLM), ANOVA, регрессия (в том числе логистическая регрессия), метод опорных векторов (SVM), линейный дискриминантный анализ (LDA), анализ главных компонент (PCA), метод k-ближайших соседей (kNN), нейронная сеть (NN), ближайшее среднее/центр (NM) и байесовский ковариантный предиктор (BCP). Модель, такая как SVM, может быть разработана с использованием любого из подмножеств и комбинаций генов, описанных в настоящем документе, на основе идей изобретения. В более конкретных вариантах осуществления, модели экспрессии оценивают как в среднее лог-нормированных уровней экспрессии генов.

В некоторых вариантах осуществления, для определения вероятности и/или возможности клинического результата (например, CR, PR или PD) измеряют комбинацию одного или нескольких генов, которые положительно коррелируют, и одного или нескольких генов, которые отрицательно коррелируют. В некоторых вариантах осуществления, профиль экспрессии и/или профиль экспрессии гена является или указывается путем оценки, измерения, определения и/или количественного определения экспрессии, по меньшей мере, двух генов. Например, в некоторых вариантах осуществления, оценка или определение профиля экспрессии гена в образце может включать оценку, измерение, определение и/или количественное определение, по меньшей мере, двух генов, которые ассоциированы и/или коррелируют с клиническим результатом, например, CR, PR или PD. В некоторых вариантах осуществления, профиль экспрессии гена получают путем измерения, определения и/или количественной оценки экспрессии двух или нескольких генов, например, путем измерения, определения и/или количественной оценки генных продуктов двух или нескольких генов, которые являются положительно коррелирует с вероятностью и/или возможностью проявления клинического результата, например, CR, PR или PD.

C. ЭТАЛОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕНА

В некоторых вариантах осуществления, сравнение измерения одного или нескольких генных продуктов с эталонным значением одного или нескольких генных продуктов позволяет проводить оценку, измерение и/или определение вероятности и/или возможности клинического результата (например, CR, PR или PD) после введения и/или ассоциированного с терапией. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце сравнивают с эталонным значением, например эталонным значением гена. В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение уровня, количества или концентрации генного продукта и/или его трансформации. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена является или получено из количества или уровня РНК генного продукта или белкового генного продукта. В конкретных вариантах осуществления, эталонным значением гена является количество или уровень генного продукта или его трансформация, которая является границей или пороговым значением, которое разделяет количества или уровни генного продукта или их трансформации, которые указывают на вероятность клинического

результата (например, CR, PR или PD) и/или увеличенная, повышенная или высокая вероятность клинического результата (например, CR, PR или PD) после введения терапии и значений или измерений экспрессии гена, которая указывает на отсутствие или низкую вероятность и/или уменьшенную, сниженную или низкую вероятность клинического результата (например, CR, PR или PD) после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена является граничное, разделительное и/или пороговое значение между количествами или уровнями генного продукта, при которых большинство из одного или нескольких клинических ответов имело место или имело место ранее, и количествами или уровнями генного продукта, при которых меньшая часть из одного или нескольких клинических ответов имеет место или имело место ранее.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является количество или уровень генного продукта или его трансформация, которое является границей или пороговым значением, которое отделяет количества или уровни генного продукта, или их трансформации, ассоциированные с конкретным типом клинического ответа, от количества или уровней, ассоциированных с одним или несколькими другими типами клинического ответа. В конкретных вариантах осуществления, эталонным значением гена является количество или уровень генного продукта или его трансформации, которое является границей или пороговым значением, которое отделяет количества или уровни генного продукта или их трансформации, ассоциированные с CR и/или PR от количеств или уровней, которые ассоциированы с другими клиническими ответами, например CRU, NR/SD, SD и/или PD. В конкретных вариантах осуществления, эталонным значением гена является количество или уровень генного продукта или его трансформации, которое является границей или пороговым значением, которое отделяет количества или уровни генного продукта или их трансформации, ассоциированные с PD, от количеств или уровней, которые ассоциированы с другими клиническими ответами, например CRU, PR, NR/SD, SD и/или CR.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию генного продукта сравнивают с эталонным значением и/или эталонным значением гена, и указывается увеличенная, повышенная и/или высокая вероятность и/или возможность конкретного клинического ответа (например, CR, PR или PD). В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта сравнивают с эталонным значением гена, и указывается пониженная, уменьшенная и/или низкая вероятность и/или возможность конкретного клинического ответа. В некоторых вариантах осуществления, экспрессию генного продукта, которая была нормализована к контролю, сравнивают с контрольным значением и/или контрольным значением гена, и указывается увеличенная, повышенная и/или высокая вероятность и/или возможность конкретного клинического ответа. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта, которая была нормализована к контролю, сравнивают с эталонным значением гена, и указывается пониженная, уменьшенная и/или низкая вероятность и/или возможность конкретного клинического ответа. В некоторых вариантах осуществления, значение экспрессии генного продукта,

которое было нормализовано или преобразовано, сравнивают с эталонным значением и/или эталонным значением гена, и указывается увеличенная, повышенная и/или высокая вероятность и/или возможность конкретного клинического ответа. В конкретных вариантах осуществления, значение экспрессии генного продукта, которое было нормализовано или преобразовано, сравнивают с эталонным значением гена, и указывается пониженная, уменьшенная и/или низкая вероятность и/или возможность конкретного клинического ответа. В некоторых вариантах осуществления, конкретный клинический ответ выбирают из следующих: CR, CRU, PR, NR/SD, SD и/или PD.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию генного продукта, которая отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциирована с клиническим ответом (например, CR, PR или PD), сравнивают с эталонным значением гена. В некоторых вариантах осуществления, когда экспрессия одного или нескольких генов способствующих выживанию (т.е. генов, оказывающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус), p53 и EZH2, составляет больше, сверх и/или выше эталонного значения гена, то указывается пониженная, уменьшенная и/или низкая вероятность и/или возможность PR или CR. В конкретных вариантах осуществления, когда экспрессия одного или нескольких генов способствующих выживанию (т.е. генов, оказывающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус), составляет меньше, ниже и/или ниже эталонного значения гена, то указывается увеличенная, повышенная и/или высокая вероятность и/или возможность PR или CR.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта, которая положительно коррелирует и/или положительно ассоциирована с конкретным клиническим ответом (например, CR или PD), сравнивают с эталонным значением гена. В некоторых вариантах осуществления, когда экспрессия одного или нескольких генов способствующих выживанию (т.е. генов, оказывающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус), p53 и EZH2, составляет больше, сверх и/или выше эталонного значения гена, то указывается увеличенная, повышенная и/или высокая вероятность и/или возможность PD. В конкретных вариантах осуществления, когда экспрессия одного или нескольких генов способствующих выживанию (т.е. генов, оказывающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус), составляет меньше, ниже и/или ниже эталонного значения гена, то указывается пониженная, уменьшенная и/или низкая вероятность и/или возможность PD.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является заранее определенное значение. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена было вычислено и/или получено из данных исследования. В некоторых вариантах осуществления, исследованием является клиническое исследование. В конкретных вариантах осуществления, клиническим исследованием является завершённое клиническое исследование. В некоторых вариантах осуществления, данные исследования

включают экспрессию гена, например экспрессию генного продукта, в образцах, взятых или полученных от субъектов исследования. В конкретных вариантах осуществления, данные исследования включают количество и типы клинических ответов, испытываемых субъектами во время исследования. В некоторых вариантах осуществления, субъекты клинического исследования имели или имеют клинический ответ, такой как CR, CRU, PR, NR/SD, SD и/или PD. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом является CR. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом не является CR. В некоторых вариантах осуществления, данные исследования включают количество и типы заболеваний или состояний, таких как рак (например, NHL). В конкретных вариантах осуществления, данные исследования включают количество и типы лечения, которым подвергались субъекты во время исследования. В некоторых вариантах осуществления, субъекты получают или получали ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, субъекты не получают или не получали ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является заранее определенное значение. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена было вычислено и/или получено из данных исследования. В некоторых вариантах осуществления, исследованием является клиническое исследование. В конкретных вариантах осуществления, клиническим исследованием является завершённое клиническое исследование. В некоторых вариантах осуществления, данные исследования включают экспрессию гена, например экспрессию генного продукта, в образцах, взятых или полученных от субъектов исследования. В конкретных вариантах осуществления, данные исследования включают количество и типы терапии, которым подвергались субъекты во время исследования. В некоторых вариантах осуществления, субъекты клинического исследования получают или получали ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, субъекты клинического исследования не получают или не получали ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, данные исследования включают количество и типы заболеваний или состояний, таких как рак (например, NHL). В конкретных вариантах осуществления, данные исследования включают количество и типы клинических ответов, испытываемых субъектами во время исследования, такие как CR, CRU, PR, NR/SD, SD и/или PD.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение является или отражает минимальный определяемый уровень, значение или количество экспрессии гена, например значение, которое служит границей положительной или отрицательной экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, измерение экспрессии генного продукта сравнивают с эталонным значением, которое является или отражает минимальный определяемый уровень, значение или количество экспрессии гена, например, экспрессию генного продукта, и ген определяют как положительно

экспрессированный, если измерение является значением выше эталонного значения, и/или ген определяют как отрицательно экспрессированный, если измерение является значением, которое ниже эталонного значения.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитывают и/или получают из исследования, в которое были включены субъекты с таким же заболеванием или состоянием, что и субъект. В некоторых вариантах осуществления, тем же заболеванием или состоянием является рак. В конкретных вариантах осуществления, тем же заболеванием или состоянием является NHL. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, в которое были включены субъекты с таким же заболеванием или состоянием, что и субъект, но с другим подтипом того же заболевания или состояния, что и субъект. В некоторых вариантах осуществления, тем же заболеванием или состоянием является рак. В конкретных вариантах осуществления, тем же заболеванием или состоянием является NHL. В конкретных вариантах осуществления экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта с подтипом NHL DLBCL, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, которое включало субъектов с подтипом NHL FL. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта с подтипом NHL FL, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, в которое были включены субъекты с подтипом NHL DLBCL.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, в которое были включены субъекты с таким же клиническим ответом, что и субъект. В некоторых вариантах осуществления, таким же клиническим ответом является CR и/или PR. В некоторых вариантах осуществления, таким же клиническим ответом является PD. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта с CR и/или PR, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, в котором участвовали субъекты с PD. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта с PD, сравнивают с эталонным значением гена, которое было вычислено и/или получено из исследования, в котором участвовали субъекты с CR и/или PR.

В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта, сравнивают с эталонным значением гена, которое было вычислено и/или получено из исследования, в котором участвовали субъекты, получавшие такое же лечение, что и субъект. В некоторых вариантах осуществления,

таким же лечением является применение или лечение ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В некоторых вариантах осуществления, таким же лечением является отсутствие использования или лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта, лечившегося ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, которое включало субъектов, не получавших лечение ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В конкретных вариантах осуществления, экспрессию генного продукта в образце, взятом или полученном от субъекта, не получавшего лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, сравнивают с эталонным значением гена, которое было рассчитано и/или получено из исследования, которое включало субъектов, получавших лечение ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена определяют с применением алгоритма к уровню, концентрации или количеству экспрессии в контрольном образце или множестве контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец или множество контрольных образцов получают от субъекта или группы субъектов завершеного исследования, например, завершеного клинического исследования, где у субъектов наблюдали клинический ответ. В конкретных вариантах осуществления, образец или множество образцов собирают до получения субъектами терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов проявлялись клинические ответы после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъект или группа субъектов демонстрировали клинический ответ в течение 1 месяца, в течение 2 месяцев, в течение 3 месяцев, в течение 4 месяцев, в течение 5 месяцев, в течение 6 месяцев, в течение 7 месяцев, в течение 8 месяцев, в течение 9 месяцев или более от начала введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник клинический ответ CR, CRU, PR, NR/SD, SD или PD. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник клинический ответ CR. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник ответ CRU. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник ответ PR. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник ответ NR/SD. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник ответ SD. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта или группы субъектов развился и/или возник ответ PD. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена определяют с применением алгоритма к двум или нескольким контрольным образцам или множествам, полученным от двух или нескольких разных субъектов или разных групп субъектов.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена определяют с применением алгоритма к уровню, концентрации или количеству экспрессии в контрольном образце или множестве контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец или множество контрольных образцов получают от субъекта или группы субъектов завершеного исследования, например, завершеного клинического исследования, в котором субъектов наблюдали на предмет типа лечения, например, использования или лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию. В конкретных вариантах осуществления, образец или множество образцов были собраны у субъектов до получения лечения. В конкретных вариантах осуществления, образец или множество образцов были собраны после того, как субъекты получили лечение. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена определяют с применением алгоритма к двум или нескольким контрольным образцам или множествам, полученным от двух или нескольких разных субъектов или разных групп субъектов.

В некоторых вариантах осуществления, типовые алгоритмы включают, но не ограничены ими, способы, которые уменьшают количество переменных, такие как алгоритмы анализа главных компонент, способы частичных наименьших квадратов и алгоритмы анализа независимых компонент. Иллюстративные алгоритмы также включают, но не ограничены ими, способы, которые напрямую обрабатывают большое количество переменных, такие как статистические способы и способы, основанные на методах машинного обучения. Статистические способы включают выбраковывающую логистическую регрессию, прогнозный анализ микрочипов (PAM), способы, основанные на сжатых центроидах, вспомогательный векторный машинный анализ и регуляризованный линейный дискриминантный анализ. Методы машинного обучения включают процедуры бэггинга, процедуры бустинга, алгоритмы случайного леса и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, алгоритм метода опорных векторов (SVM), алгоритм случайного леса или их комбинация используют для классификации данных микрочипа или данных РНК-seq. В некоторых вариантах осуществления, идентифицированные маркеры, которые различают образцы или подтипы, выбирают на основе статистической значимости. В некоторых случаях, выбор статистической значимости выполняют после применения поправки Бенджамини Хохберга для уровня ложноположительных результатов (FDR). В некоторых вариантах осуществления, алгоритмические методы могут применяться к профилям экспрессии одного или нескольких генных продуктов в образце, таких как один или несколько генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), таких как гены семейства мус (с-мус, l-мус и n-мус,) p53 и EZH2.

В некоторых вариантах осуществления, алгоритм может быть дополнен подходом мета-анализа, например, описанным Fishel and Kaufman et al. 2007 *Bioinformatics* 23(13): 1599-606. Кроме того, алгоритм классификатора может быть дополнен подходом мета-анализа, таким как анализ повторяемости. В некоторых случаях, анализ повторяемости

выбирает маркеры, которые появляются, по меньшей мере, в одном наборе маркеров прогностической экспрессии продукта.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является количество или уровень генного продукта или его трансформаций, которое является границей или пороговым значением, которое отделяет количества или уровни генного продукта или их преобразования, где происходят или ранее имели место все или большинство клинических ответов, от количества или уровней генного продукта, или их превращений, где происходят или ранее имели место меньшинство клинических реакций. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена отделяет или разделяет значения или измерения экспрессии гена, ассоциированные с более чем половиной и/или более чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или точно или примерно 100% случаев клинического ответа, например CR, PR или PD, которые имели место в исследовании. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом является CR, CRU, PR, NR/SD, SD или PD. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом является CR. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом является PR. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом является PD. В некоторых вариантах осуществления, клиническим ответом не является CR или PR. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена отделяет или разделяет значения или измерения экспрессии гена, которые ассоциированы с, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или точно или примерно 100% частоты клинического ответа, такого как CR, CRU, PR, NR/SD, SD или PD.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является количество или уровень генного продукта или его трансформации, которое является границей или пороговым значением, которое отделяет количества или уровни генного продукта или их трансформаций, где происходят или ранее имели место все или большинство типов лечения, от количества или уровней генного продукта, или их трансформаций, где происходят или ранее имели место меньшинство типов лечения. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена отделяет или разделяет значения или измерения экспрессии гена, ассоциированные с более чем половиной и/или более чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или точно или примерно 100% случаев использования или лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, которые произошли в исследовании. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена отделяет или разделяет значения или измерения экспрессии гена, которые ассоциированы с, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 45%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере,

мере, 95% или точно или примерно 100% частоты использования или лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 25%, 20%, 15%, 10% или 5% от экспрессии гена в контрольном образце. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 25%, 20%, 15%, 10% или 5% от среднего или медианного уровня, концентрации или количества экспрессии гена во множестве контрольных образцов. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 2, 1,5, 1,25, 1, 0,75, 0,5, 0,25 или 0,1 стандартных отклонений от среднего или медианного уровня, концентрации или количества экспрессии гена во множестве контрольных образцов, где каждый из субъектов группы демонстрировал клинический ответ, например CR, PR или PD, после получения цитотоксической терапии для лечения того же заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение получают из и/или получают из контрольных образцов, которые были получены от субъектов до введения терапии, где у субъектов группы в дальнейшем проявился PD. В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта гена, который положительно коррелирует и/или положительно ассоциирован с PD после введения, и/или ассоциирован с терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией, такой как один или несколько генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус,) p53 и EZH2.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 2-кратного, в пределах 1,5-кратного, 1,0-кратного, в пределах 100%, в пределах 50%, в пределах 40%, в пределах 30%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% выше среднего уровня, концентрации или количества и/или в пределах 2,0, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,5 или 0,25 стандартных отклонений выше среднего уровня, концентрации или количества генного продукта во множестве контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена выше наивысшего уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 100%, 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10% или 5% выше наивысшего уровня, концентрации или количества наблюдаемого генного продукта в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение выше уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно

ассоциирован с PD после введения и/или ассоциирован с терапией, и множество контрольных образцов получают из группа субъектов до получения терапии, где каждый из субъектов группы продолжал демонстрировать PD. В некоторых вариантах осуществления, у субъектов продолжался CR. В некоторых вариантах осуществления, значение составляет ниже самого низкого уровня, концентрации или количества, по меньшей мере, одного генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов, в которых в дальнейшем не проявлялся PD. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение находится в пределах 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов, в которых в не продолжали демонстрировать PD. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или по меньшей мере, 95%, или по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов, полученных от группы субъектов до получения клеточной терапии, которые не демонстрируют PD.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена получают из и/или получают из контрольных образцов, которые были получены от субъектов до введения терапии, где у субъектов группы в дальнейшем проявлялся CR. В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта гена, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциирован с CR после введения и/или ассоциирован с терапией, например, иммунотерапией или клеточной терапией, такой как один или несколько генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус), p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 2-кратного, в пределах 1,5-кратного, 1,0-кратного, в пределах 100%, в пределах 50%, в пределах 40%, в пределах 30%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% выше среднего уровня, концентрации или количества и/или в пределах 2,0, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,5 или 0,25 стандартных отклонений выше среднего уровня, концентрации или количества генного продукта во множестве контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена выше наивысшего уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена на 100%, 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10% или 5% выше наивысшего уровня, концентрации или количества наблюдаемого генного продукта в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение выше уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%,

по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциирован с CR после введения и/или ассоциирован с терапией, и множество контрольных образцов получают из группы субъектов до получения терапии, где каждый из субъектов группы не продолжал демонстрировать проявлений CR. В некоторых вариантах осуществления, субъекты продолжали демонстрировать PD. В некоторых вариантах осуществления, значение ниже самого низкого уровня, концентрации или количества по меньшей мере, одного генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов, в которых в дальнейшем не проявлялся CR. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение находится в пределах 50%, в пределах 40%, в пределах 30%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов, которые не демонстрируют CR. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или по меньшей мере, 95%, или по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов, полученных от группы субъектов до получения клеточной терапии, которые не демонстрируют CR.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциирован с клиническим ответом после введения и/или ассоциирован с терапией, и множество контрольных образцов получают от группы субъектов до получения терапии, где каждый из субъектов группы не развил или не продолжил развивать PD. В некоторых вариантах осуществления, субъекты демонстрировали или продолжали демонстрировать CR после получения терапии. В некоторых вариантах осуществления, значение ниже самого низкого уровня, концентрации или количества по меньшей мере, одного генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов, которые не испытали серьезной нейротоксичности. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение находится в пределах 50%, в пределах 40%, в пределах 30%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов, которые не

демонстрировали PD. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или по меньшей мере, 95%, или по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов, полученных от группы субъектов до получения клеточной терапии, которые не демонстрировали или продолжали демонстрировать PD.

В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение получают из и/или получают из контрольных образцов, которые были получены от субъектов до введения терапии, где субъекты группы в продолжали демонстрировать PD. В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта гена, который положительно коррелирует и/или положительно ассоциирован с PD после введения и/или ассоциирован с терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией, такой как один или несколько генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обладающих анти-апоптотическим действием), таких как гены семейства тус (с-тус, l-тус и n-тус,) p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 2-кратного, в пределах 1,5-кратного, 1,0-кратного, в пределах 100%, в пределах 50%, в пределах 40%, в пределах 30%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже среднего уровня, концентрации или количества и/или в пределах 2,0, 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,5 или 0,25 стандартных отклонений ниже среднего уровня, концентрации или количества генного продукта во множестве контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение гена ниже самого низкого уровня, концентрации или количества генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В конкретных вариантах осуществления, эталонное значение гена находится в пределах 100%, 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10% или 5% ниже самого низкого уровня, концентрации или количества наблюдаемого генного продукта в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение ниже уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов.

В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является значение генного продукта, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциировано с клиническим ответом после введения и/или ассоциировано с терапией, и получают множество контрольных образцов от группы субъектов до получения клеточной терапии, содержащей клетки, генетически сконструированные с рекомбинантным рецептором, где каждый из субъектов группы продолжал демонстрировать CR. В некоторых вариантах осуществления, значение ниже самого низкого уровня, концентрации или количества по меньшей мере, одного генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления,

значение находится в пределах 100%, в пределах 75%, в пределах 50%, в пределах 40%, в пределах 30%, в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 10% или в пределах 5% ниже самого низкого уровня, концентрации, или количество по меньшей мере, одного генного продукта, наблюдаемого в образце из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение выше уровня, концентрации или количества, наблюдаемого в, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или, по меньшей мере, 98% образцов из множества контрольных образцов, полученных от группы субъектов до получения терапии, которые не продолжали демонстрировать PD.

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию, по меньшей мере, одного, по меньшей мере, двух, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере, девяти, по меньшей мере, десяти, по меньшей мере, одиннадцати, по меньшей мере, двенадцати, по меньшей мере, тринадцати, по меньшей мере, четырнадцати, по меньшей мере, пятнадцати, по меньшей мере, шестнадцати, по меньшей мере, семнадцати, по меньшей мере, восемнадцати, по меньшей мере, двадцати, по меньшей мере, двадцати одного, по меньшей мере, двадцати двух, по меньшей мере, двадцати трех, по меньшей мере, двадцати четырех, по меньшей мере, двадцати пяти, по меньшей мере, двадцати шести, по меньшей мере, двадцати семи, по меньшей мере, двадцати восьми, по меньшей мере, двадцати девяти, по меньшей мере, тридцати, по меньшей мере, тридцати пяти, по меньшей мере, сорока, по меньшей мере, пятидесяти, по меньшей мере, шестидесяти, по меньшей мере, семидесяти, по меньшей мере, восьмидесяти, по меньшей мере, девяноста, по меньшей мере, ста или, по меньшей мере, ста двадцати генных продуктов в образце, полученном от субъекта, сравнивают с соответствующими контрольными значениями генов, например, контрольными значениями гена для одного и того же гена, для определения вероятности, риска или возможности того, что субъект продемонстрирует клинический результат (например, CR, PR или PD). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет увеличенный, повышенный и/или высокий риск клинического результата (например, CR, PR или PD) при сравнении экспрессии, по меньшей мере, одного, по меньшей мере, двух, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере, девяти, по меньшей мере, десяти, по меньшей мере, одиннадцати, по меньшей мере, двенадцати, по меньшей мере, тринадцати, по меньшей мере, четырнадцати, по меньшей мере, пятнадцати, по меньшей мере, шестнадцати, по меньшей мере, семнадцати, по меньшей мере, восемнадцати, по меньшей мере, двадцати, по меньшей мере, двадцати одного, по меньшей мере, двадцати двух, по меньшей мере, двадцати трех, по меньшей мере, двадцати четырех, по меньшей мере, двадцати пяти, по меньшей мере, двадцати шести, по меньшей мере, двадцати семи, по меньшей мере, двадцати восьми, по меньшей мере, двадцати девяти, по меньшей мере, тридцати, по меньшей мере, тридцати пяти, по

меньшей мере, сорока, по меньшей мере, пятидесяти, по меньшей мере, шестидесяти, по меньшей мере, семидесяти, по меньшей мере, восьмидесяти, по меньшей мере, девяноста, по меньшей мере, ста или, по меньшей мере, ста двадцати генных продуктов с соответствующим контрольным значением гена указывают на то, что экспрессия ассоциирована с увеличенным, повышенным и/или высоким риском клинического результата (например, CR, PR или PD).

В некоторых вариантах осуществления, экспрессию, по меньшей мере, одного генного продукта, который положительно коррелирует и/или положительно ассоциирован с клиническим результатом (например, CR, PR или PD), и экспрессию, по меньшей мере, одного генного продукта, который отрицательно коррелирует с и/или отрицательно ассоциирован с клиническим результатом (например, CR, PR или PD), сравнивают с соответствующими эталонными значениями для определения вероятности, риска или возможности того, что у субъекта будет клинический результат (например, CR, PR или PD).

В конкретных вариантах осуществления, субъект имеет и/или считается имеющим высокий, повышенный и/или увеличенный риск клинического результата (например, CR, PR или PD), если экспрессия одного или нескольких генных продуктов отрицательно коррелированная и/или отрицательно ассоциированная с результатом, ответом и/или подтипом, находится ниже контрольного значения. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или считается имеющим высокий, повышенный и/или увеличенный риск развития клинического результата (например, CR, PR или PD), если экспрессия экспрессии, по меньшей мере, одного, по меньшей мере, двух, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере, девяти, по меньшей мере, десяти, по меньшей мере, одиннадцати, по меньшей мере, двенадцати, по меньшей мере, тринадцати, по меньшей мере, четырнадцати, по меньшей мере, пятнадцати, по меньшей мере, шестнадцати, по меньшей мере, семнадцати, по меньшей мере, восемнадцати, по меньшей мере, девятнадцати, по меньшей мере, двадцати, по меньшей мере, двадцати пяти, по меньшей мере, пятидесяти, по меньшей мере, ста или, по меньшей мере, ста двадцати генных продуктов, которые отрицательно коррелируют и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом ниже контрольного значения.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или считается имеющим высокий, повышенный и/или увеличенный риск развития клинического результата (например, CR, PR или PD), если экспрессия одного или нескольких генных продуктов, которые положительно коррелированы и/или положительно ассоциированы с клиническим результатом, превышают эталонное значение. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или считается имеющим высокий, повышенный и/или увеличенный риск развития клинического результата (например, CR, PR или PD), если экспрессия, по меньшей мере, одного, по меньшей мере, двух, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере

мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере, девяти, по меньшей мере, десяти, по меньшей мере, одиннадцати, по меньшей мере, двенадцати, по меньшей мере, тринадцати, по меньшей мере, четырнадцати, по меньшей мере, пятнадцати, по меньшей мере, шестнадцати, по меньшей мере, семнадцати, по меньшей мере, восемнадцати, по меньшей мере, девятнадцати, по меньшей мере, двадцати, по меньшей мере, двадцати пяти, по меньшей мере, пятидесяти, по меньшей мере, ста или, по меньшей мере, ста двадцати генных продуктов, которые положительно коррелируют и/или положительно ассоциированы с клиническим результатом, выше контрольного значения.

В конкретных вариантах осуществления, субъект имеет и/или считается имеющим низкий, уменьшенный и/или пониженный риск клинического результата (например, CR, PR или PD), если экспрессия одного или нескольких генных продуктов отрицательно коррелированы и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом, выше контрольного значения. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет и/или считается имеющим низкий, уменьшенный и/или сниженный риск развития клинического результата (например, CR, PR или PD), если экспрессия, по меньшей мере, одного, по меньшей мере, двух, по меньшей мере, трех, по меньшей мере, четырех, по меньшей мере, пяти, по меньшей мере, шести, по меньшей мере, семи, по меньшей мере, восьми, по меньшей мере, девяти, по меньшей мере, десяти, по меньшей мере, одиннадцати, по меньшей мере, двенадцати, по меньшей мере, тринадцати, по меньшей мере, четырнадцати, по меньшей мере, пятнадцати, по меньшей мере, шестнадцати, по меньшей мере, семнадцати, по меньшей мере, восемнадцати, по меньшей мере, девятнадцати, по меньшей мере, двадцати, по меньшей мере, двадцати пяти, по меньшей мере, пятидесяти, по меньшей мере, ста или, по меньшей мере, ста двадцати генных продуктов, которые отрицательно коррелируют и/или отрицательно ассоциированы с клиническим результатом, выше контрольного значения.

В некоторых вариантах осуществления, генным продуктом является белок, например белок, измеренный в образце плазмы, полученном от субъекта до или после введения клеточной терапии, и эталонным значением гена является концентрация белка в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления, белком является генный продукт, который отрицательно коррелирует и/или отрицательно ассоциирован с PR и/или CR. В некоторых вариантах осуществления, белком является генный продукт, который положительно коррелирует и/или положительно ассоциирован с PR и/или CR. В некоторых вариантах осуществления, образец плазмы получают от субъекта до введения клеточной терапии, например, за 1 день до этого. В некоторых вариантах осуществления, образец плазмы получают от субъекта после введения клеточной терапии, например, через 2 дня, 4 дня или 7 дней после введения клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, образец плазмы получают от субъекта до введения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, белком является белок или часть одного или нескольких генов, способствующих выживанию (т.е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие), таких как гены семейства тус (с-тус,

l-мус и n-мус), p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, эталонным значением гена является концентрация генного продукта, например белка или его части, в сыворотке.

D. ВЫБОР СУБЪЕКТОВ

В некоторых вариантах осуществления, субъекту с высокой, повышенной и/или увеличенной вероятностью проявления или продолжения проявления частичного ответа (PR) или полного ответа (CR) после введения цитотоксической терапии (например, клеточной терапии, такой как CAR-T-клеточная терапия) не вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, для лечения, профилактики, задержки или ослабления прогрессирующего заболевания (PD). В некоторых вариантах осуществления, субъекту с высоким, повышенным и/или увеличенным риском проявления или продолжения проявления прогрессирующего заболевания (PD) после введения цитотоксической терапии (например, клеточной терапии, такой как CAR T-клеточная терапия) вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, для лечения, профилактики, задержки или ослабления (PD). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлена комбинированная терапия, включающая введение цитотоксической терапии и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, для лечения, профилактики, задержки или ослабления развития или риска развития прогрессирующего заболевания (PD). Также представлены композиции и составы, например фармацевтические составы, содержащие один или несколько агентов.

В некоторых вариантах осуществления, способы, представленные в настоящем документе, позволяют выбрать субъекта для комбинированной терапии, например, введения цитотоксической терапии и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, для лечения, профилактики, отсрочки, снижения или ослабления развития или риска развития прогрессирующего заболевания (PD) после введения цитотоксической терапии, путем идентификации субъекта с вероятностью и/или повышенным риском, вероятностью или возможностью развития или испытания прогрессирующего заболевания (PD) после введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор вводят (i) до, (ii) в течение одного, двух или трех дней, (iii) одновременно с и/или (iv) после начала введения иммунотерапии или клеточной терапии субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или не дают ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, способный лечить, предотвращать, отсрочивать, уменьшать или ослаблять развитие или риск развития прогрессирующего заболевания (PD) до введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или не дают ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в течение периода времени до начала введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, период времени составляет от точно или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней, и/или составляет или составляет примерно за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более 6 недель до введения

цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту не вводят или не дают ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию до введения цитотоксической терапии, до того, как субъект проявит или если субъект не проявит признак или симптом прогрессирующего заболевания (PD).

В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят или дают ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, способный лечить, предотвращать, отсрочивать, уменьшать или ослаблять развитие или риск развития прогрессирующего заболевания (PD), до введения иммунотерапии или клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта был определен высокий, повышенный или увеличенный риск PD. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят или дают ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в течение периода времени до начала введения цитотоксической терапии, например, в пределах или в пределах примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дней и/или в пределах или в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более 6 недель до введения цитотоксической терапии. В некоторых вариантах осуществления, субъекту вводят или дают ингибитор при первом признаке или симптоме PD.

В некоторых вариантах осуществления, субъект идентифицируется как имеющий вероятность и/или повышенную вероятность или возможность развития или испытания прогрессирующего заболевания (PD) после введения цитотоксической терапии на основании количества или уровней транскрипции гена или экспрессии белка у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, количества или уровни транскрипции гена или экспрессии белка одного или нескольких генов, способствующих выживанию (т. е. генов, обеспечивающих анти-апоптотическое действие) идентифицируют субъекта как имеющего вероятность и/или повышенную вероятность или возможность развития или испытания прогрессирующего заболевания (PD) после введения терапии. В некоторых вариантах осуществления, количества или уровни транскрипции гена или экспрессии белка одного или нескольких генов, способствующих выживанию, идентифицируют субъекта как имеющего вероятность и/или повышенную вероятность или возможность развития или испытания прогрессирующего заболевания (PD) после введения терапии, когда количество или уровни увеличиваются или выше по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления, количества или уровни транскрипции гена или экспрессии белка одного или нескольких генов, способствующих выживанию, идентифицируют субъекта как не имеющего вероятности и/или повышенной вероятности или возможности развития или возникновения прогрессирующего заболевания (PD) после введения иммунотерапии или клеточной терапии, когда количества или уровни уменьшаются или ниже по сравнению с контрольным значением. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов, способствующих выживанию включают гены семейства мус (с-мус, l-мус, n-мус), p53 и EZH2. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов, способствующих выживанию включают гены, ассоциированные с генами семейства мус (с-мус, l-мус, n-мус), p53 и EZH2.

В некоторых вариантах осуществления, оценку, определение, измерение и/или количественное определение генного продукта, например, РНК или белкового генного продукта в образце, нормализуют до контрольного значения. В некоторых вариантах осуществления, нормализация к одному или нескольким контрольным значениям может выполняться для анализа, оценки или определения того, указывает ли количество или уровень генного продукта на то, повышена или снижена экспрессия гена, и/или она высокая или низкая. В конкретных вариантах осуществления, нормализация до контрольных значений может использоваться для сравнения экспрессии гена одного образца с экспрессией гена другого образца.

В конкретных вариантах осуществления, контрольным значением является измерение или значение измерения другого генного продукта. В некоторых вариантах осуществления, другим генным продуктом является генный продукт домашнего гена. В некоторых вариантах осуществления, домашним геном является конститутивно активный ген, например ген, который требуется для поддержания основной клеточной функции. Примеры подходящих домашних генов известны в данной области техники и включают, но не ограничены ими, гены, кодирующие АКТВ (бета-актин), В2М (бета-2-микроглобулин), GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу), RPLP0 (60S кислый рибосомный белок P0), GUSB (бета-глюкуронидазу), HMBS (гидроксиметилбилансинтазу), HPRT1 (гипоксантинфосфорибозилтрансферазу 1), RPL13A (рибосомный белок L13a), SDHA, субъединицу А комплекса сукцинатдегидрогеназы), TBP (связывающий белок ТАТА-бокса), TFRC (рецептор трансферрина 1) и UBC (убиквитин С). В некоторых вариантах осуществления, контрольное значение измеряют в том же образце, что и генный продукт.

В некоторых вариантах осуществления, генный продукт сравнивают и/или нормализуют с контрольным значением, которое является измерением или значением измерения генного продукта из того же гена. В некоторых вариантах осуществления, контрольным значением является измерение или значение измерения, полученное из одного или нескольких контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, генный продукт и контрольное значение измеряют в разных образцах. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько контрольных образцов имеют идентичный, такой же или аналогичный тканевый состав и/или клеточный состав, что и образец. В некоторых вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из одной, похожей и/или аналогичной ткани от одного и того же субъекта. В конкретных вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из одной и той же ткани у разных субъектов. В конкретных вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из одной, похожей и/или аналогичной ткани от разных субъектов. В некоторых вариантах осуществления, одним или несколькими образцами являются образцы биопсии лимфатических узлов, и одним или несколькими контрольными образцами являются образцы биопсии лимфатических узлов. В конкретных вариантах осуществления, одним

или несколькими образцами являются образцы крови, например, образцы периферической крови, и одним или несколькими контрольными образцами являются образцами крови.

В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, у которого нет состояния и/или рака. В конкретных вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, у которого нет NHL, такой как FL или DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец не содержит и/или не подозревается в наличии одной или нескольких опухолевых клеток. В конкретных вариантах осуществления, образцом и контрольным образцом являются разные образцы из одной, похожей и/или аналогичной ткани от разных субъектов. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, которого лечат ингибитором EZH2. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, которого не лечат ингибитором EZH2. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, который не демонстрирует полный ответ (CR) после лечения с помощью терапии, например клеточной терапии или иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, который не демонстрирует прогрессирующее заболевание (PD) после лечения с помощью терапии, например иммунотерапии или клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, у которого не наблюдается инфильтрации Т-клеток в микроокружение опухоли (TME) после лечения терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, контрольный образец получают от субъекта, у которого действительно наблюдается инфильтрация Т-клеток в микроокружение опухоли (TME) после лечения терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией.

В некоторых вариантах осуществления, оценку, определение, измерение и/или количественную оценку генного продукта, например, РНК или белкового генного продукта, в образце нормализуют и/или сравнивают с двумя или несколькими контрольными значениями. В некоторых вариантах осуществления, два или несколько контрольных значений включают контрольное значение, которое является измерением, или значение измерения, которое является измерением одного и того же генного продукта, и контрольное значение, которое является измерением, или значением измерения, другого генного продукта.

В некоторых вариантах осуществления, контрольное значение было определено заранее. В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько контрольных значений измеряют или получают параллельно с оценкой, измерением, определением и/или количественным определением одного или генных продуктов в образце.

В конкретных вариантах осуществления, контрольным значением является среднее значение (например, среднее арифметическое) или медианное количество или уровень экспрессии одного или нескольких генных продуктов, полученных из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, множество контрольных образцов получают от отдельных контрольных субъектов. В конкретных вариантах

осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии состояния или заболевания. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии рака. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии NHL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии подтипа NHL, такого как FL или DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, у которых нет и/или которые не подозреваются в наличии подтипа NHL, такого как SLL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип NHL фолликулярная лимфома (FL). В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип NHL диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL). В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип NHL малая лимфоцитарная лимфома (SLL). В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, у которых нет и/или у которых не подозревается наличие NHL. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, у которых нет и/или у которых не подозревается наличие определенного типа лейкоза, такого как CLL. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, у которых нет и/или у которых не подозревается наличие CLL.

В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является множество субъектов, у которых есть и/или есть подозрение на наличие рака. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии неходжкинской лимфомы (NHL). В некоторых вариантах осуществления, множество отдельных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии определенного подтипа NHL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии NHL, но не конкретного подтипа NHL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип DLBCL для ALL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является субъектом или содержит DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип FL для ALL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом NHL является подтип FL для SLL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъекта FL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые

имеют и/или подозреваются в наличии лейкоза. В некоторых вариантах осуществления, лейкозом является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов является множество субъектов, у которых есть и/или есть подозрение на наличие рака. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии определенного подтипа DLBCL. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов, которые имеют и/или подозреваются в наличии DLBCL, но не конкретного подтипа DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом DLBCL является подтип DLBCL В-клеток зародышевого центра (GCB). В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов GCB DLBCL. В конкретных вариантах осуществления, подтипом DLBCL является подтип DLBCL активированных В-клеток (ABC). В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов является или включает субъектов ABC DLBCL.

В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, которых не лечат или не лечили ингибитором EZH2. В некоторых вариантах осуществления, множество индивидуальных контрольных субъектов являются субъектами, которых лечат или лечили ингибитором EZH2. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, которые не демонстрируют или не демонстрировали CR после лечения с помощью терапии, например иммунотерапии или клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, которые не демонстрируют или не демонстрировали PD после лечения с помощью терапии, например иммунотерапии или клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, которые не демонстрируют или не демонстрировали Т-клеточный ответ, например инфильтрацию Т-клеток в микросреду опухоли, после лечения терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией. В некоторых вариантах осуществления, множеством индивидуальных контрольных субъектов являются субъекты, которые демонстрируют или демонстрировали Т-клеточный ответ, например инфильтрацию Т-клеток в микроокружение опухоли, после лечения терапией, например иммунотерапией или клеточной терапией.

В некоторых вариантах осуществления, контрольное значение получают из множества контрольных образцов. В некоторых вариантах осуществления, множество контрольных образцов включает по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 15, по меньшей мере, 20, по меньшей

мере, 25, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере, 100, по меньшей мере, 200, по меньшей мере, 300, по меньшей мере, 400 или по меньшей мере, 500 контрольных образцов.

В некоторых вариантах осуществления, оценка, измерение, определение или количественная оценка экспрессии гена, например, количества или уровня одного или нескольких генных продуктов, могут быть проанализированы любыми способами в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, до анализа, необработанные данные экспрессии гена, например значение измеренного и/или количественно определенного уровня, количества или концентрации генного продукта, могут быть нормализованы или преобразованы, например, логарифмически нормализованы, выражены как коэффициент экспрессии, процентильный и/или квантильный. В некоторых вариантах осуществления, данные экспрессии генов могут быть дополнительно модифицированы с помощью любого подхода непараметрического масштабирования данных. В некоторых вариантах осуществления преобразование измерения или оценки экспрессии одного или нескольких генных продуктов происходит до любой нормализации для контроля. В некоторых вариантах осуществления, преобразование измерения или оценки экспрессии одного или нескольких генных продуктов происходит после нормализации до контрольного значения. В некоторых вариантах осуществления, преобразованием является логарифмическое преобразование, преобразование степени или логит-преобразование. В некоторых вариантах осуществления, логарифмическим преобразованием является десятичный логарифм ($\log_{10}(x)$), натуральный логарифм ($\ln(x)$) или двоичный логарифм ($\log_2(x)$).

Шаблоны экспрессии могут быть оценены и классифицированы множеством средств, таких как общая линейная модель (GLM), ANOVA, регрессия (в том числе логистическая регрессия), метод опорных векторов (SVM), линейный дискриминантный анализ (LDA), анализ главных компонент (PCA), метод k-ближайших соседей (kNN), нейронная сеть (NN), ближайшее среднее/центр (NM) и байесовский ковариантный предиктор (BCP). Модель, такая как SVM, может быть разработана с использованием любого из подмножеств и комбинаций генов, описанных в настоящем документе, на основе идей изобретения. В более конкретных вариантах осуществления, модели экспрессии оценивают как в среднее лог-нормированных уровней экспрессии генов.

ТИПОВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ОЦЕНКИ

В некоторых вариантах осуществления, способов, комбинаций, применений, наборов и готовых изделий, представленных в настоящем документе, представленная комбинированная терапия приводит к одному или нескольким результатам лечения, например, признаку, ассоциированному с любым одним или несколькими параметрами, ассоциированными с терапией или лечением, как описано ниже. В некоторых вариантах осуществления, способ включает оценку цитотоксичности Т-клеток по отношению к раковым клеткам, *например*, Т-клеткам, вводимым для Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ включает оценку воздействия, жизнестойкости и

пролиферации Т-клеток, *например*, Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, воздействие или пролонгированное размножение и/или жизнестойкость клеток и/или изменения клеточных фенотипов или функциональной активности клеток, *например*, клеток, вводимых для иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, в способах, представленных в настоящем документе, можно измерить путем оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления, такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, *например*, Т-клеточной терапии, до, во время или после введения комбинированной терапии, представленной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия может дополнительно включать одну или несколько стадий скрининга для выявления субъектов для лечения с помощью комбинированной терапии и/или продолжения комбинированной терапии, и/или стадию для оценки результатов лечения и/или мониторинга результатов лечения. В некоторых вариантах осуществления, стадия оценки результатов лечения может включать стадии оценки и/или мониторинга лечения и/или определения субъектов для введения дополнительных или оставшихся стадий терапии и/или для повторной терапии. В некоторых вариантах осуществления, стадию скрининга и/или оценки результатов лечения могут использовать для определения дозы, частоты, продолжительности, времени и/или порядка комбинированной терапии, представленной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, любую из стадий скрининга и/или оценки результатов лечения, описанных в настоящем документе, можно использовать до, во время, во время курса или после введения одной или нескольких стадий представленной комбинированной терапии, *например*, введения Т-клеточной терапии (*например*, CAR-экспрессирующих Т-клеток), и/или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, *например*, венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, оценку выполняют до, во время, в ходе или после выполнения любого из способов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, оценку выполняют перед проведением способов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, оценку выполняют после выполнения одной или нескольких стадий способов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, оценку выполняют до введения одной или нескольких стадий представленной комбинированной терапии, *например*, для скрининга и выявления пациентов, подходящих и/или восприимчивых к получению комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, оценку выполняют во время, в ходе или после введения одного или нескольких стадий представленной комбинированной терапии, *например*, для оценки промежуточного или окончательного результата лечения, *например*, для определения эффективности лечения и/или для определения того, следует ли продолжать или повторять лечение, и/или для определения того, следует ли проводить оставшиеся стадии комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, результаты лечения включают улучшенную иммунную функцию, *например*, иммунную функцию Т-клеток, вводимых для клеточной терапии, и/или эндогенных Т-клеток в организме. В некоторых вариантах осуществления, типовые результаты лечения включают, но не ограничены ими, усиленную пролиферацию Т-клеток, повышенную функциональную активность Т-клеток, изменения экспрессии фенотипических маркеров иммунных клеток, таких, как признаки, которые ассоциированы с сконструированными Т-клетками, *например*, CAR-Т клетками, вводимыми субъекту. В некоторых вариантах осуществления, типовые результаты лечения включают снижение бремени заболевания, *например*, массы опухоли, улучшенные клинические результаты и/или повышенную эффективность терапии.

В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценка лечения результатов включает оценку выживания и/или функции Т-клеток, вводимых для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценка лечения результатов включает оценку уровней цитокинов или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления, стадия скрининга и/или оценка лечения результатов включает оценку бремени болезни и/или улучшений, *например*, оценку массы опухоли и/или клинических результатов. В некоторых вариантах осуществления, любая из стадий скрининга и/или оценки лечения результатов может включать любой из способов оценки и/или анализов, описанных в настоящем документе и/или известных в данной области техники, и может выполняться один или несколько раз, *например*, до, во время, во время курса или после введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Типичные наборы параметров, ассоциированных с результатом лечения, которые можно оценить в некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, включают профиль популяции иммунных клеток периферической крови и/или опухолевую массу.

В некоторых вариантах осуществления, способы влияют на эффективность клеточной терапии у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксичность клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, *например*, CAR-экспрессирующих, у субъекта после введения дозы клеток в способе с ингибитором белка семейства BCL2, обеспечивающего выживание, таким как ингибитор BCL2, например, венетоклак, больше по сравнению с той, которая достигается с помощью способа без введения ингибитора, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксичность клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, *например*, экспрессирующих CAR, у субъекта после введения дозы клеток в способе с субтерапевтически эффективным количеством ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, больше по сравнению с той, которая достигается с помощью способа без введения ингибитора, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксичность у субъекта, которому вводят Т-клеточную терапию, *например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки, оценивают по сравнению со способом, в котором Т-клеточную терапию вводят субъекту в отсутствие ингибитора

белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к тому, что вводимые Т-клетки проявляют повышенную или пролонгированную цитотоксичность у субъекта по сравнению со способом, в котором Т-клеточную терапию вводят субъекту в отсутствие ингибитора, например венетоклакса.

В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, снижает бремя заболевания, *например*, массу опухоли, у субъекта по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят в субъекту в отсутствие ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, введение субтерапевтически эффективного количества ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, снижает бремя болезни, *например*, массу опухоли, у субъекта по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в отсутствие ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, снижает бластный костный мозг у субъекта по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в отсутствие ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, приводит к улучшенным клиническим результатам, *например*, частоте объективного ответа (ORR), выживаемости без прогрессирования (PFS) и общей выживаемости (OS) по сравнению с способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в отсутствие ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса.

В некоторых вариантах осуществления, субъект может быть подвергнут скринингу перед введением одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Например, субъект может быть подвергнут скринингу на характеристики заболевания и/или бремени заболевания, *например*, массы опухоли, перед введением комбинированной терапии, чтобы определить пригодность, чувствительность и/или предрасположенность к введению комбинированной терапии. Например, субъект может быть подвергнут скринингу на характеристики заболевания, *например*, сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию белка семейства BCL2, способствующего выживанию или про-апоптотического, перед введением комбинированной терапии, чтобы определить пригодность, чувствительность и/или предрасположенность к введению комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления, стадию скрининга и/или оценку результатов лечения могут использовать для определения дозы, частоты, продолжительности, времени и/или порядка комбинированной терапии, представленной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, субъект может быть подвергнут скринингу после введения одной из стадий комбинированной терапии для определения и идентификации субъектов, которым будут введены оставшиеся стадии комбинированной терапии, и/или для мониторинга эффективности терапии. В некоторых вариантах осуществления, число, уровень или количество введенных Т-клеток и/или пролиферацию и/или активность введенных Т-клеток оценивают до введения и/или после введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления определяют или оценивают замену и/или изменение, *например*, увеличение, повышение, уменьшение или снижение уровней, значений или измерений параметра или результата по сравнению с уровнями, значениями или измерениями того же параметра или результата в другой момент времени оценки, при другом состоянии, контрольной точке и/или другом субъекте. Например, в некоторых вариантах осуществления, может быть определена кратность изменения, *например*, увеличения или уменьшения, конкретных параметров, *например*, экспрессии белка семейства BCL2, по сравнению с тем же параметром при другом состоянии, *например*, до введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, определяют уровни, значения или измерения двух или нескольких параметров и сравниваются относительные уровни. В некоторых вариантах осуществления, определенные уровни, значения или измерения параметров сравнивают с уровнями, значениями или измерениями контрольного образца или необработанного образца. В некоторых вариантах осуществления, определенные уровни, значения или измерения параметров сравнивают с уровнями из образца от того же субъекта, но в другой момент времени. Значения, полученные при количественной оценке отдельного параметра, могут быть объединены с целью оценки заболевания, *например*, путем формирования арифметической или логической операции на уровнях, значениях или измерениях параметров с использованием многопараметрического анализа. В некоторых вариантах осуществления, может быть вычислено соотношение двух или нескольких конкретных параметров.

Оценка и определение параметров, ассоциированных со здоровьем, функцией, активностью и/или результатами Т-клеток, такими как ответ, эффективность и/или токсичность, можно оценивать в различные моменты времени. В некоторых аспектах, оценка может выполняться несколько раз, например, перед введением клеточной терапии, до, во время или после производства клеток и/или в начале введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса, во время продолжающегося, возобновленного и/или дальнейшего введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, в начале введения клеточной терапии и/или до, во время или после начала введения клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, функциональные характеристики вводимых клеток и/или клеточных композиций включают мониторинг фармакокинетических (ФК) параметров, размножения и жизнестойкости клеток, функциональные анализы клеток (например, любые из описанных в настоящем документе, такие как анализ цитотоксичности, анализ секреции цитокинов и анализы *in vivo*), оценку двумерной передачи сигналов Т-клетками и оценку фенотипов истощения и/или сигнатур Т-клеток. В некоторых аспектах, другие атрибуты, которые можно оценивать или отслеживать, включают отслеживание и оценку минимального остаточного заболевания (MRD). В некоторых аспектах, другие атрибуты, которые можно оценивать или отслеживать, включают фармакодинамические параметры ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса.

А. ОТВЕТ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ

В некоторых вариантах осуществления, параметры, ассоциированные с терапией или результатом лечения, которые включают параметры, которые можно оценивать на стадиях скрининга и/или оценки лечения результатов и/или мониторинга результатов лечения, включают массу опухоли или бремя заболевания. Введение терапии, которой является иммунотерапия или клеточная терапия, такая как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки) и/или ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс, может снизить или предотвратить распространение или бремя заболевания или состояния у субъекта. Например, если заболеванием или состоянием является опухоль, способы обычно уменьшают размер опухоли, объем, метастазирование, долю бластов в костном мозге или молекулярно определяемую злокачественность В-клеток и/или улучшают прогноз или выживаемость или другие симптомы, ассоциированные с опухолевой массой.

В некоторых аспектах, введение в соответствии с представленными способами и/или представленными готовыми изделиями или композициями, обычно снижает или предотвращает распространение или бремя заболевания или состояния у субъекта. Например, если заболеванием или состоянием является опухоль, способы обычно уменьшают размер опухоли, объем, метастазирование, долю бластов в костном мозге или молекулярно определяемую злокачественность В-клеток и/или улучшают прогноз или выживаемость или другие симптомы, ассоциированные с опухолевой массой.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы приводят к снижению опухолевой массы у леченных субъектов по сравнению с альтернативными способами, в которых терапию, такую как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки), вводят без введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, представленные способы приводят к уменьшению опухолевой массы у субъектов, получавших субтерапевтически эффективное количество ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по сравнению с альтернативными способами, в которых иммунотерапию, такую как Т-клеточная терапия

(например, CAR-экспрессирующие Т-клетки) вводят без введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс. Не обязательно, чтобы опухолевая масса действительно снижалась у всех субъектов, получающих комбинированную терапию, но эта опухолевая масса снижается в среднем у субъектов, проходящих лечение, например, на основании клинических данных, в которых большинство субъектов, получавших такую комбинированную терапию, демонстрируют сниженную опухолевую массу, например, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более субъектов, получавших комбинированную терапию, демонстрируют уменьшенную опухолевую массу.

В некоторых вариантах осуществления, представленные способы приводят к повышенной цитотоксической активности цитотоксической терапии по сравнению с альтернативными способами, в которых терапию, такую как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), вводят без введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы приводят к повышенной цитотоксичности у субъектов, которых лечат субтерапевтически эффективным количеством ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по сравнению с альтернативными способами, в которых иммунотерапию, такую как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), вводят без введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс. В некоторых случаях, представленные способы приводят к повышенной цитотоксичности цитотоксической терапии, необязательно через опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз одной или нескольких раковых клеток, по сравнению с альтернативными способами, при которых иммунотерапию, например, Т-клеточную терапию (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки) вводят без введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклакс. Не обязательно, чтобы цитотоксичность действительно увеличивалась у всех субъектов, получающих комбинированную терапию, но эта цитотоксичность повышается в среднем у субъектов, которых лечили, например, на основании клинических данных, у которых большинство субъектов, получавших такую комбинированную терапию, демонстрируют уменьшенную опухолевую массу, например, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более субъектов, получавших комбинированную терапию, демонстрируют уменьшенную опухолевую массу.

Бремя заболевания может охватывать общее количество клеток заболевания у субъекта или в органе, ткани или физиологической жидкости субъекта, например, в органе или ткани опухоли или в другой локации, например, которое может указывать на метастазирование. Например, опухолевые клетки могут быть определены и/или количественно определены в крови, лимфе или костном мозге в контексте определенных гематологических злокачественных образований. Бремя заболевания может включать, в некоторых вариантах осуществления, массу опухоли, количество или степень метастазов

и/или долю бластных клеток, присутствующих в костном мозге.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта есть миелома, лимфома или лейкоз. Степень бремени болезни можно определить путем оценки остаточного лейкоза в крови или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), малую лимфоцитарную лимфому (SLL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL) или миелому, *например*, множественную миелому (ММ). В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет лейкоз или лимфому. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет лейкоз. В некоторых случаях, лейкозом является CLL. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет лимфому. В некоторых случаях, субъект имеет NHL, включая DBCBL. В некоторых случаях, лимфомой является SLL.

В некоторых аспектах частота ответов у субъектов, например субъектов с NHL, основана на критериях Лугано. (Cheson et al., (2014) JCO., 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin. Clin. Oncol. 4(1):5). В некоторых аспектах, для оценки ответа используют любой из клинических, гематологических и/или молекулярных способов. В некоторых аспектах, ответ оценивают с применением критериев Лугано, включающих использование позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) - компьютерной томографии (КТ) и/или КТ, в зависимости от ситуации. Оценка ПЭТ-КТ может дополнительно включать использование фтордезоксиглюкозы (FDG) для FDG-авидных лимфом. В некоторых аспектах, если ПЭТ-КТ будут использовать для оценки ответа в FDG-авидных гистологиях, может применяться 5-балльная шкала. В некотором варианте, 5-балльная шкала включает следующие критерии: 1, отсутствие поглощения выше фонового; 2, поглощение \leq средостения; 3, поглощение $>$ средостения, но \leq печени; 4, поглощение умеренно $>$ печени; 5, поглощение заметно выше, чем печень и/или новые очаги поражения; X, новые области поглощения вряд ли ассоциированы с лимфомой.

В некоторых аспектах, полный ответ, описанный с использованием критериев Лугано, включает полный метаболический ответ и полный радиологический ответ на различных измеримых участках. В некоторых аспектах, эти участки включают лимфатические узлы и экстралимфатические участки, где CR описывается как оценка 1, 2 или 3 с или без остаточной массы по 5-балльной шкале, когда используется ПЭТ-КТ. В некоторых аспектах, в кольце Вальдейера или в экстранодальных участках с высоким физиологическим поглощением или с активацией в селезенке или костном мозге (*например*, с химиотерапией или миелоидными колониестимулирующими факторами) поглощение может быть больше, чем в нормальном средостении и/или печени. В этих обстоятельствах можно сделать вывод о полном метаболическом ответе, если поглощение в участках первоначального вовлечения не больше, чем в окружающей нормальной ткани, даже если ткань имеет высокое физиологическое поглощение. В некоторых аспектах, ответ оценивают в лимфатических узлах с помощью КТ, где CR описывается как

отсутствие экстралимфатических участков заболевания, и узлы/узловые массы-мишени должны регрессировать до $\leq 1,5$ см в самом длинном поперечном диаметре очага поражения (LDi). Дополнительные участки оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать на отсутствие доказательств FDG-avidного заболевания в костном мозге, и оценка на основе КТ должна указывать на нормальную морфологию, которая, если она не определена, должна быть отрицательной по IGН. Дополнительные участки могут включать оценку увеличения органа, которое должно вернуться к норме. В некоторых аспектах, оценивают неизмеряемые очаги поражения и новые очаги поражения, которые в случае CR должны отсутствовать (Cheson et al., (2014) JCO., 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin. Clin. Oncol. 4(1):5).

В некоторых аспектах, частичный ответ (PR), описанный с использованием критериев Лугано, включает частичный метаболический и/или радиологический ответ в различных измеряемых участках. В некоторых аспектах, эти участки включают лимфатические узлы и экстралимфатические участки, где PR описывается как оценка 4 или 5 с уменьшенным поглощением по сравнению с базовой и остаточной массами любого размера, когда используется ПЭТ-КТ. На промежуточной стадии, такие открытия могут указывать на отвечающее заболевание. По окончании лечения, такие открытия могут указывать на остаточное заболевание. В некоторых аспектах, ответ оценивают в лимфатических узлах с использованием КТ, где PR описывается как $\geq 50\%$ снижение SPD для вплоть до 6 измеряемых узлов и экстранодальных участков-мишеней. Если очаг поражения слишком мал для измерения КТ, значение по умолчанию составляет 5 мм x 5 мм; если очага поражения больше не видно, значение составляет 0 мм x 0 мм; для узла размером > 5 мм x 5 мм, но меньше обычного, для расчета используют фактические измерения. Другие участки для оценки включают костный мозг, где оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать на остаточное поглощение выше, чем поглощение в нормальном костном мозге, но сниженное по сравнению с базовым уровнем (диффузное поглощение, совместимое с реактивными изменениями от допустимой химиотерапии). В некоторых аспектах, если есть стойкие очаговые изменения в костном мозге в контексте узлового ответа, следует рассмотреть возможность дальнейшей оценки с помощью МРТ или биопсии или интервального сканирования. В некоторых аспектах, дополнительные участки могут включать оценку увеличения органа, при котором селезенка должна регрессировать $> 50\%$ по длине по сравнению с нормой. В некоторых аспектах, оценивают неизмеряемые очаги поражения и новые очаги поражения, которые в случае PR должны отсутствовать/быть нормальными, регрессировать, но не увеличиваться. Отсутствие ответа/стабильное заболевание (SD) или прогрессирующее заболевание (PD) также можно измерить с помощью оценок на основе ПЭТ-КТ и/или КТ. (Cheson et al., (2014) JCO., 32(27):3059-3067; Johnson et al., (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin. Clin. Oncol., 4(1):5).

В некоторых отношениях, выживаемость без прогрессирования (PFS) описывается

как период времени во время и после лечения заболевания, такого как В-клеточное злокачественное образование, в течение которого субъект живет с этим заболеванием, но не ухудшается. В некоторых аспектах, объективный ответ (OR) описывается как измеримый ответ. В некоторых аспектах, частота объективного ответа (ORR) описывается как доля пациентов, достигших CR или PR. В некоторых аспектах, общая выживаемость (OS) описывается как период времени с даты постановки диагноза или начала лечения заболевания, такого как В-клеточное злокачественное образование, в течение которого субъекты, у которых диагностировано заболевание, все еще живы. В некоторых аспектах, бессобытийная выживаемость (EFS) описывается как период времени после окончания лечения В-клеточного злокачественного образования, в течение которого субъект остается свободным от определенных осложнений или событий, для профилактики или отсрочки которых было предназначено лечение. Эти события могут включать возвращение В-клеточного злокачественного образования или появление определенных симптомов, таких как боль в костях из-за В-клеточного злокачественного образования, распространившегося на кость, или смерть.

В некоторых вариантах осуществления, показатель продолжительности ответа (DOR) включает время от документирования ответа опухоли до прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления, параметр для оценки ответа может включать стойкий ответ, *например*, ответ, который сохраняется через некоторый период времени от начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, стойкий ответ обозначается скоростью ответа приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала терапии. В некоторых вариантах осуществления, ответ сохраняется более 3 месяцев или более 6 месяцев.

В некоторых аспектах, критерии RECIST используют для определения объективного ответа опухоли. (Eisenhauer et al., European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247). В некоторых аспектах, критерии RECIST используют для определения объективного ответа опухоли на очаги поражения-мишени. В некоторых отношениях, полный ответ, определяемый с использованием критериев RECIST, описывают как исчезновение всех очагов поражения-мишеней, и любые патологические лимфатические узлы (как мишени, так и вне мишени) должны иметь уменьшение по короткой оси до <10 мм. В других аспектах, частичный ответ, определяемый с использованием критериев RECIST, описывается как уменьшение суммы диаметров очагов поражения-мишеней, по меньшей мере, на 30% с учетом суммы диаметров очагов поражения-мишеней. В других аспектах, прогрессирующее заболевание (PD) описывается как увеличение суммы диаметров очагов поражения-мишеней, по меньшей мере, на 20%, принимая в качестве эталона наименьшую сумму в исследовании (она включает базовую сумму, если она является наименьшей в исследовании). Помимо относительного увеличения на 20%, сумма должна также демонстрировать абсолютное увеличение на, по меньшей мере, 5 мм (в некоторых аспектах, появление одного или нескольких новых очагов поражения также считается прогрессирующим). В других аспектах, стабильное заболевание (SD) описывается как ни

достаточное уменьшение, чтобы соответствовать критериям PR, ни достаточное увеличение, чтобы соответствовать критериям PD, принимая за эталон наименьшую сумму диаметров во время исследования.

В случае MM, типовые параметры для оценки степени бремени болезни включают такие параметры, как количество клональных плазматических клеток (*например*, >10% при биопсии костного мозга или в любом количестве при биопсии из других тканей; плазмцитомы), присутствие моноклонального белка (парапротеина) либо в сыворотке, либо в моче, свидетельство повреждения конечных органов, которые считаются связанными с нарушением плазматических клеток (*например*, гиперкальциемией (скорректированный кальций >2,75 ммоль/л); почечной недостаточностью, ассоциированной с миеломой; анемией (гемоглобин <10 г/дл); и/или поражения костей (литические поражения или остеопороз с компрессионными переломами)).

В случае DLBCL, типовые параметры для оценки степени бремени болезни включают такие параметры, как клеточная морфология (*например*, центробластные, иммунобластные и анапластические клетки), экспрессия генов, экспрессия миРНК и экспрессия белков (*например*, экспрессия BCL2, BCL6, MUM1, LMO2, MYC и p21).

В некоторых аспектах, показатели ответа у субъектов, таких как субъекты с CLL, основаны на критериях ответа International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) (Hallek, et al., Blood 2008, Jun 15; 111(12): 5446-5456). В некоторых аспектах, эти критерии описываются следующим образом: полная ремиссия (CR), которая в некоторых аспектах требует отсутствия клональных лимфоцитов периферической крови по данным иммунофенотипирования, отсутствие лимфаденопатии, отсутствие гепатомегалии или спленомегалии, отсутствие конституциональных симптомов и удовлетворительные показатели крови; полная ремиссия с неполным восстановлением костного мозга (CRi), которая в некоторых аспектах описана выше как CR, но без нормальных показателей крови; частичная ремиссия (PR), которая в некоторых аспектах описывается как снижение количества лимфоцитов на $\geq 50\%$, снижение лимфаденопатии на $\geq 50\%$ или снижение уровня печени или селезенки на $\geq 50\%$ вместе с улучшением показателей периферической крови; прогрессирующее заболевание (PD), которое в некоторых аспектах описывается как $\geq 50\%$ увеличение количества лимфоцитов до $> 5 \times 10^9/\text{л}$, $\geq 50\%$ увеличение лимфаденопатии, $\geq 50\%$ увеличение размера печени или селезенки, трансформация Рихтера или новые цитопении из-за CLL; и стабильное заболевание, которое в некоторых аспектах описывается как не отвечающее критериям CR, CRi, PR или PD.

В некоторых вариантах осуществления, субъекты демонстрируют CR или OR, если в течение 1 месяца после введения дозы клеток, лимфатические узлы у субъекта имеют размер меньше чем точно или примерно 20 мм, меньше чем точно или примерно 10 мм или меньше чем точно или примерно 10 мм.

В некоторых вариантах осуществления, маркерный клон CLL не обнаруживается в костном мозге субъекта (или в костном мозге более 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более субъектов), получавшего лечение в соответствии со способами. В некоторых вариантах

осуществления, маркерный клон CLL оценивают посредством глубокого секвенирования IgH. В некоторых вариантах осуществления, маркерный клон не обнаруживается в момент времени, который равен точно или примерно, или, по меньшей мере, точно или примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 или 24 месяца после введения клеток.

В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если количество бластов в костном мозге составляет больше или равно 5%, например, по данным световой микроскопии, например, больше или равно 10% бластов в костном мозге, больше или равно 20% бластов в костном мозге, больше или равно 30% бластов в костном мозге, больше или равно 40% бластов в костном мозге или больше или равно 50% бластов в костном мозге. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта наблюдается полная или клиническая ремиссия, если в костном мозге имеется менее 5% бластов.

В некоторых вариантах осуществления, субъект может демонстрировать полную ремиссию, но присутствует небольшая часть морфологически не определяемых (методами световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Считается, что субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD), если у субъекта обнаруживается менее 5% бластов в костном мозге и обнаруживается молекулярно определяемая В-клеточное злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, молекулярно определяемое В-клеточное злокачественное образование может быть оценено с использованием любого из множества молекулярных методов, которые позволяют чувствительное определение небольшого числа клеток. В некоторых аспектах, такие методы включают в себя анализы ПЦР, которые могут определять уникальные перестройки генов Ig/T-клеточных рецепторов или слитые транскрипты, продуцируемые хромосомными транслокациями. В некоторых вариантах осуществления, проточная цитометрия может использоваться для идентификации В-клеточных злокачественных образований на основе лейкоз-специфичных иммунофенотипов. В некоторых вариантах осуществления, молекулярное определение В-клеточных злокачественных образований позволяет выявить всего 1 лейкозную клетку на 100000 нормальных клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует MRD, который можно обнаружить на молекулярном уровне, если выявляется, по меньшей мере, или более 1 лейкозной клетки на 100000 клеток, например, с помощью ПЦР или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания у субъекта является молекулярно неопределимым или MRD⁻ таким образом, что, в некоторых случаях, никаких лейкозных клеток не может быть определено у субъекта с использованием ПЦР или методов проточной цитометрии.

В случае лейкоза, степень бремени болезни может быть определена путем оценки остаточного лейкоза в крови или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если количество бластов в костном мозге больше или равно 5%, например, по данным световой микроскопии. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта наблюдается полная или клиническая ремиссия,

если в костном мозге содержится менее 5% бластов.

В некоторых вариантах осуществления, при лейкозе, субъект может демонстрировать полную ремиссию, но присутствует небольшая часть морфологически не определяемых (методами световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Считается, что субъект демонстрирует минимальное остаточное заболевание (MRD), если у субъекта определяется менее 5% бластов в костном мозге и обнаруживается молекулярно определяемое В-клеточное злокачественное образование. В некоторых вариантах осуществления, молекулярно определяемое В-клеточное злокачественное образование может быть оценено с использованием любого из множества молекулярных методов, которые позволяют чувствительное определение небольшого числа клеток. В некоторых аспектах, такие методы включают в себя анализы ПЦР, которые могут определять уникальные перестройки генов Ig/T-клеточных рецепторов или слитые транскрипты, продуцируемые хромосомными транслокациями. В некоторых вариантах осуществления, проточная цитометрия может использоваться для идентификации В-клеточных злокачественных образований на основе лейкоз-специфичных иммунофенотипов. В некоторых вариантах осуществления, молекулярное определение В-клеточных злокачественных образований позволяет выявить всего 1 лейкозную клетку на 100000 нормальных клеток. В некоторых вариантах осуществления, субъект демонстрирует MRD, которое может быть молекулярно определено, если выявляется, по меньшей мере, или более 1 лейкозной клетки на 100000 клеток, например, с помощью ПЦР или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания у субъекта молекулярно не определяется или MRD⁻ таким образом, что, в некоторых случаях, никаких лейкозных клеток не может быть определено у субъекта с использованием ПЦР или методом проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления, способы и/или введение клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (*например*, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и/или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такого как ингибитор BCL2, например венетоклак, снижают бремя болезни по сравнению с бременем болезни во момент времени непосредственно перед введением иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии и/или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса.

В некоторых аспектах, введение иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии и/или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, может предотвратить увеличение бремени болезни, и об этом может свидетельствовать отсутствие изменения бремени болезни.

В некоторых вариантах осуществления, способ снижает бремя заболевания или состояния, *например*, количество опухолевых клеток, размер опухоли, продолжительность выживания пациента или бессобытийной выживаемость, в большей степени и/или в течение более длительного периода времени, по сравнению со снижением, которое можно было бы наблюдать с помощью сопоставимого способа с использованием альтернативной

терапии, такой как та, при которой субъект получает иммунотерапию, *например*, терапию только Т-клетками, в отсутствие введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса. В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания снижается в большей степени или на более длительный срок после комбинированной терапии, состоящей из введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, по сравнению со снижением, которого можно было бы достигнуть при введении каждого агента по отдельности, *например*, при введении ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, субъекту, не получавшему иммунотерапию, *например*, Т-клеточную терапию; или при введении иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, субъекту, не получавшему ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания или состояния у субъекта определяют, оценивают или измеряют. Бремя заболевания может быть определено в некоторых аспектах путем определения общего количества клеток заболевания или ассоциированных с заболеванием, *например*, опухолевых клеток, у субъекта или в органе, ткани или физиологической жидкости субъекта, такой как кровь или сыворотка. В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания, *например*, бремя опухоли, оценивают путем измерения количества или степени метастазов. В некоторых аспектах, оценивают выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, присутствие или продолжительность бессобытийного или бессимптомного выживания или безрецидивного выживания. В некоторых вариантах осуществления, оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, указана мера бремени заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления, типовые параметры для определения включают конкретные клинические результаты, указывающие на облегчение или улучшение заболевания или состояния, *например*, опухоли. Такие параметры включают: продолжительность контроля заболевания, включая полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) (*см.*, *например*, рекомендации Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST)), частоту объективного ответа (ORR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и общую выживаемость (OS). Конкретные пороговые значения для параметров могут быть установлены для определения эффективности способа комбинированной терапии, представленного в настоящем документе.

В некоторых аспектах, бремя заболевания измеряют или определяют до введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, после введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, но до введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, и/или после введения как иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, так и ингибитора белка семейства BCL2,

способствующего выживанию, например венетоклакса. В контексте многократного введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии, бремя заболевания в некоторых вариантах осуществления, может быть измерено до или после введения любой из стадий, доз и/или циклов введения, или во момент времени между введением любой из стадий, доз и/или циклов введения. В некоторых вариантах осуществления, введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, проводят, по меньшей мере, в две стадии (*например*, 28-дневного цикла), и бремя болезни измеряют или определяют до, во время и/или после каждого цикла.

В некоторых вариантах осуществления, бремя снижается на или на, по меньшей мере, точно или примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов с помощью представленных способов по сравнению с таковым непосредственно перед введением ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, и иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, бремя заболевания, размер опухоли, объем опухоли, масса опухоли и/или нагрузка или объем опухоли снижаются после введения иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, и ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например венетоклакса, по меньшей мере, на примерно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с тем, что было непосредственно перед введением иммунотерапии, *например*, Т-клеточной терапии, и/или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, например, венетоклакса.

В некоторых вариантах осуществления, снижение бремени болезни с помощью этого способа включает индукцию морфологической полной ремиссии, например, по оценке через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев или более чем через 6 месяцев после введения, *например*, начала комбинированной терапии.

В некоторых аспектах, анализ минимального остаточного заболевания, например, по данным многопараметрической проточной цитометрии, является отрицательным, или уровень минимального остаточного заболевания составляет менее примерно 0,3%, менее примерно 0,2%, менее примерно 0,1%, или менее примерно 0,05%.

В некоторых вариантах осуществления, показатель бессобытийного выживания или общий показатель выживания субъекта улучшается с помощью этих способов по сравнению с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления, показатель или вероятность бессобытийного выживания для субъектов, леченных указанными способами, через 6 месяцев после способа комбинированной терапии, представленного в настоящем документе, составляет более примерно 40%, более примерно 50%, более примерно 60%, более примерно 70%, более примерно 80%, более примерно 90% или более примерно 95%. В некоторых аспектах, общая выживаемость составляет более примерно 40%, более примерно 50%, более примерно 60%, более примерно 70%, более примерно 80%, более примерно 90% или более примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления, субъект, леченный этими способами, демонстрирует бессобытийную выживаемость, безрецидивную выживаемость или выживаемость до, по

меньшей мере, 6 месяцев или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления, время до прогрессирования улучшается, например, время до прогрессирования составляет более 6 месяцев или примерно 6 месяцев, или, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

В некоторых вариантах осуществления, после лечения данным способом вероятность рецидива снижается по сравнению с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления, вероятность рецидива через 6 месяцев после способа комбинированной терапии составляет менее примерно 80%, менее примерно 70%, менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20% или менее примерно 10%.

В некоторых случаях, фармакокинетика вводимых клеток, *например*, адоптивно перенесенных клеток, определяют для оценки доступности, *например*, биодоступности вводимых клеток. Способы определения фармакокинетики адоптивно перенесенных клеток могут включать забор периферической крови у субъектов, которым вводили сконструированные клетки, и определение количества или соотношения сконструированных клеток в периферической крови. Подходы к селекции и/или выделению клеток могут включать использование антител, специфичных к химерному антигенному рецептору (CAR) (*например*, Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 2013 Mar; 5(177): 177ra38) Protein L (Zheng et al., J. Transl. Med. 2012 Feb; 10:29), эпитопных меток, таких как последовательности Strep-Tag, введенные непосредственно в определенные сайты в CAR, посредством чего связывающие реагенты для Strep-Tag используют для непосредственной оценки CAR (Liu et al. (2016) Nature Biotechnology, 34:430; публикация международной патентной заявки № WO2015095895) и моноклональных антител, которые специфически связываются с CAR полипептидом (*см.* публикацию международной патентной заявки № WO2014190273). Внешние маркерные гены могут, в некоторых случаях, использоваться в связи со сконструированными клеточными терапиями, чтобы позволить определение или селекцию клеток, и, в некоторых случаях, также способствовать самоубийству клеток. Усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt), в некоторых случаях, может коэкспрессироваться с представляющим интерес трансгеном (*например*, CAR) в трансдуцированных клетках (*см.*, *например*, патент США № 8,802,374). EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbix®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, которые были сконструированы с конструкцией EGFRt и другим рекомбинантным рецептором, таким как химерный антигенный рецептор (CAR), и/или для устранения или отделения клеток, экспрессирующих рецептор. *См.* патент США № 8,802,374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434).

В некоторых вариантах осуществления, количество CAR⁺ Т-клеток в биологическом образце, полученном от пациента, *например*, крови, может быть определено в период времени после введения клеточной терапии, *например*, для

определения фармакокинетики клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество CAR+ Т-клеток, необязательно CAR+ CD8+ Т-клеток и/или CAR+ CD4+ Т-клеток, определяемых в крови субъекта или у большинства субъектов, получавших лечение данным способом, превышает 1 клетку на мкл., более 5 клеток на мкл или более 10 клеток на мкл.

ГОТОВЫЕ ИЗДЕЛИЯ И НАБОРЫ

Также представлены готовые изделия, содержащие ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклакс, и компоненты для иммунотерапии или клеточной терапии, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или Т-клеточную терапию, например сконструированные клетки и/или их композиции. Готовые изделия могут включать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с ВВ растворами и т. д. Контейнеры могут быть получены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер, в некоторых вариантах осуществления, содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией, эффективна для лечения, профилактики и/или диагностики состояния. В некоторых вариантах осуществления, контейнер имеет стерильное отверстие для доступа. Примеры контейнеров включают пакеты с раствором для внутривенного введения, флаконы, в том числе с пробками, прокалываемыми иглой для инъекции, или бутылки или флаконы для перорально вводимых агентов. Этикетка или вкладыш в упаковку может указывать на то, что композиция используется для лечения заболевания или состояния.

Изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит сконструированные клетки, используемые для иммунотерапии, например, Т-клеточной терапии; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклакс.

В некоторых вариантах осуществления, первый контейнер содержит первую композицию и вторую композицию, где первая композиция содержит первую популяцию сконструированных клеток, используемых для иммунотерапии, например, CD4+ Т-клеточной терапии, и вторая композиция содержит вторую популяцию сконструированных клеток, где вторая популяция может быть сконструирована отдельно от первой популяции, например, CD8+ Т-клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления, первая и вторая клеточные композиции содержат определенное соотношение сконструированных клеток, например, CD4+ и CD8+ клеток (например, соотношение CD4+:CD8+ CAR+ Т-клеток 1:1).

Готовое изделие может дополнительно содержать вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции можно использовать для лечения определенного состояния. Альтернативно или дополнительно, готовое изделие может дополнительно включать другой или такой же контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый

буфер. Оно может дополнительно содержать другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и/или шприцы.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

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

Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков и не ограничиваются минимальной длиной. Полипептиды, включая представленные рецепторы и другие полипептиды, например линкеры или пептиды, могут включать аминокислотные остатки, включая природные и/или не природные аминокислотные остатки. Термины также включают постэкспрессионные модификации полипептида, например гликозилирование, сиалирование, ацетилирование и фосфорилирование. В некоторых аспектах, полипептиды могут содержать модификации по отношению к нативной или природной последовательности, пока белок поддерживает желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, посредством мутаций хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок из-за амплификации ПЦР.

В настоящем контексте «субъектом» является млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человек. В некоторых вариантах осуществления, субъектом, *например*, пациентом, которому вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, такой как ингибитор BCL2, например венетоклакс, сконструированные клетки или композиции, является млекопитающее, обычно примат, такой как человек. В некоторых вариантах осуществления, приматом является обезьяна или человекообразная обезьяна. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и пожилых людей. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является млекопитающее, не являющееся приматом, например грызун.

В настоящем контексте «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «лечимый») относится к полному или частичному облегчению или уменьшению заболевания или состояния или нарушения, или симптома, побочного эффекта или результата, или ассоциированного с ними фенотипа. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничены ими, профилактику возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, профилактику метастазирования, снижение

скорости прогрессирования заболевания, облегчение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссию или улучшенный прогноз. Термины не подразумевают полного излечения заболевания или полного устранения какого-либо симптома или действия на все симптомы или результаты.

В настоящем документе, «задержка развития заболевания» означает отсрочку, сдерживание, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или отсрочку развития заболевания (например, рака). Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, которого лечат. В некоторых вариантах осуществления, достаточная или значительная задержка, по сути, может включать профилактику в том смысле, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, может быть отсрочена поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов.

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

В настоящем документе термин «подавление» функции или активности означает уменьшение функции или активности по сравнению с такими же условиями, за исключением представляющего интерес условия или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другим условием. Например, клетки, подавляющие рост опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

«Эффективное количество» агента, например, сконструированных клеток или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, или его фармацевтического состава или композиции, в контексте введения, относится к количеству, эффективному, в дозировках/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, например терапевтического или профилактического результата.

«Терапевтически эффективное количество» агента, например, сконструированных клеток или ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, или его фармацевтического состава или композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, такого, как лечение заболевания, состояния или нарушения, и/или фармакокинетический или фармакодинамический эффект лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес субъекта, а также популяции вводимых клеток. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например, терапевтически эффективных количествах. В некоторых вариантах осуществления, предложенные способы включают введение ингибитора белка семейства BCL2, способствующего

выживанию, такого как ингибитор BCL2, например, венетоклакс, сконструированных клеток (*например*, клеточной терапии) или композиций в эффективных количествах, *например*, терапевтически эффективных количествах. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества. В контексте более низкой опухолевой массы, профилактически эффективное количество в некоторых аспектах будет выше, чем терапевтически эффективное количество.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличному от активного ингредиента, который не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, без ограничения, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, который известен специалисту в данной области техники. Ссылка на «примерное» значение или параметр в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя множественное число, если контекст явно не диктует иное. Например, «а» или «an» означает «по меньшей мере, один» или «один или несколько». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем документе, включают в себя «состоящие» и/или «состоящие по существу из» аспектов и вариаций.

Во всем описании, различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое ограничение объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, если представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом указанном диапазоне охватывается заявленным объектом изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также включены в заявленный объект изобретения с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон содержит один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленный объект изобретения. Это применимо независимо от широты диапазона.

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой

смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, неводный или любая их комбинация.

В контексте настоящего описания термин «обогащение», относящийся к одному или нескольким конкретным типам клеток или популяции клеток, относится к увеличению количества или доли этого типа или популяции клеток, например, по сравнению с общим количеством клеток в или объеме композиции, или относительно других типов клеток, например, путем положительной селекции на основе маркеров, экспрессируемых популяцией или клеткой, или путем отрицательной селекции на основе маркера, отсутствующего в популяции клеток или в подлежащей истощению клетке. Этот термин не требует полного удаления других клеток, типов клеток или популяций из композиции и не требует, чтобы обогащенные таким образом клетки присутствовали на уровне или даже примерно 100% в обогащенной композиции.

В настоящем документе, утверждение о том, что клетка или популяция клеток является «положительной» для конкретного маркера, относится к определяемому присутствию на или в клетке конкретного маркера, обычно поверхностного маркера. При упоминании поверхностного маркера этот термин относится к наличию поверхностной экспрессии, определяемой проточной цитометрией, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и определения указанного антитела, где окрашивание определяется проточной цитометрией на уровне, значительно превышающем окрашивание, определенное при проведении той же процедуры с изотипически подобранным контролем или стробирующим контролем флуоресценции минус один (FMO) в других идентичных условиях и/или на уровне, по существу аналогичном таковому для клетки, заведомо положительной для маркера и/или на уровне, существенно более высоком, чем уровень для клетки, заведомо отрицательной для маркера.

[0819] В настоящем контексте утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» для конкретного маркера, относится к отсутствию существенного определяемого присутствия на клетке или в клетке конкретного маркера, обычно поверхностного маркера. При упоминании поверхностного маркера этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, определенной с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и определения указанного антитела, где окрашивание не обнаруживается с помощью проточной цитометрии. на уровне, по существу превышающем определяемое окрашивание, выполняя ту же процедуру с изотипически подобранным контролем или пропускающим контролем флуоресценции с комбинацией определяемых меток без одной (FMO) в других идентичных условиях, и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клеток, заведомо положительных для маркера, и/или на уровне, по существу выше уровня для клетки, заведомо отрицательной для маркера.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к молекуле

нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии».

Используемый в настоящем документе термин «композиция» относится к любой смеси двух или нескольких продуктов, веществ или к ингибитору белка семейства BCL2, способствующему выживанию, такому как ингибитор BCL2, например, венетоклакс, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водный, неводный или любая их комбинация.

В настоящем контексте «субъектом» является млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человек.

Типовые варианты осуществления

Предоставленные варианты осуществления включают:

1. Способ лечения рака, где способ включает:

(1) введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и

(2) введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, достаточной для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора в период времени от точно или примерно 1 дня до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии и/или во время до того, как пиковые уровни цитотоксической терапии будут определены в крови субъекта после введения цитотоксической терапии.

2. Способ лечения рака, где способ включает введение субъекту, страдающему раком, ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, достаточной для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора в период времени от точно или примерно 1 дня до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии и/или во время до того, как пиковые уровни цитотоксической терапии будут обнаруживаться в крови субъекта после введения цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках.

3. Способ лечения рака, где способ включает:

(1) введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и

(2) введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 7 дней до и до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии.

4. Способ лечения рака, где способ включает введение субъекту, страдающему раком, ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, где ингибитор вводят по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 7 дней до и до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака.

5. Способ лечения рака у субъекта, где способ включает введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках, где субъекту вводят или он нуждается в введении ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в течение периода времени по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора во период времени от точно или примерно 7 дней до и до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии.

6. Способ по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 7 дней до и до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 3 дней до и до точно или примерно 14 дней после начала введения цитотоксической терапии.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 1 дня до и до точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одну дозу ингибитора по схеме дозирования вводят одновременно с цитотоксической терапией и/или в тот же день, что и цитотоксическую терапию.

10. Способ по любому из вариантов осуществления 3-9, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора является достаточной для достижения стационарной концентрации (C_{ss}) ингибитора в период времени между точно или примерно 1 днем и точно или примерно 14 днями после начала введения цитотоксической терапии и/или перед тем, как пиковые уровни цитотоксической терапии будут обнаруживаться в крови

субъекта после введения цитотоксической терапии.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, отличающийся тем, что субъекту не вводили или не давали ритуксимаб и/или ибрутиниб в течение 7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия способна вызывать или приводит к клеточно-опосредованной цитотоксичности одной или нескольких клеток рака.

13. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия способна или опосредует опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз одной или нескольких раковых клеток.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 1-13, отличающийся тем, что цитотоксической терапией является иммунотерапия.

15. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающийся тем, что иммунотерапией является Т-клеточная рекрутинговая терапия, которая увеличивает активность Т-клеток.

16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-15, отличающийся тем, что цитотоксической терапией является биспецифическая Т-клеточная рекрутинговая (BiTE) терапия.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, отличающийся тем, что цитотоксической терапией является клеточная терапия.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-17, где клеточная терапия содержит клетки, которые являются аутологичными к субъекту.

19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, отличающийся тем, что клеточная терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), эндогенной Т-клеточной терапии, терапии натуральными киллерами (NK), терапии трансгенными TCR и клеточной терапии, экспрессирующей рекомбинантный рецептор, которой необязательно является клеточная терапия, экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR).

20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, отличающийся тем, что введение клеточной терапии включает введение от точно или примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего клеток клеточной терапии, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); от точно или примерно 1×10^5 до 2×10^8 всего клеток клеточной терапии, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); от точно или примерно 1×10^6 до 1×10^8 всего клеток клеточной терапии, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); или от 1×10^6

до 5×10^7 всего клеток клеточной терапии, клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, всего Т-клеток или всего мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-21, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит или обогащена Т-клетками.

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит или обогащена CD3+, CD4+, CD8+ или CD4+ и CD8+ Т-клетками.

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, где клеточная терапия содержит или обогащена CD4+ и CD8+ Т-клетками.

25. Способ по варианту осуществления, 24, отличающийся тем, что CD4+ и CD8+ Т-клетки клеточной терапии содержат определенное соотношение CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, и/или CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, где клеточная терапия включает введение CD4+ и CD8+ Т-клеток, где Т-клетки каждой дозы содержат рецептор, необязательно CAR, который специфически связывается с антигеном, где введение включает введение множества отдельных композиций, множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую или обогащенную CD8+ Т-клетками, и вторую композицию, содержащую или обогащенную CD4+ Т-клетками.

27. Способ по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что:

CD4+ Т-клетки, содержащие рецептор, в одной из первой и второй композиций, и CD8+ Т-клетки, содержащие рецептор, в другой из первой и второй композиций, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1; и/или

CD4+ Т-клетки, содержащие рецептор, и CD8+ Т-клетки, содержащие рецептор, вводимые в первой и второй композициях, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит или обогащена натуральными киллерами (NK).

29. Способ по любому из вариантов осуществления 1-28, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит или обогащена клетками, производными из iPS.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 20-29, где рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

31. Способ по любому из вариантов осуществления 20-30, где рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

32. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, отличающийся тем, что клеточная терапия включает введение от точно или примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^7 до 1×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, включительно.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-32, отличающийся тем, что клеточная терапия включает введение по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^5$ CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^5 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 1×10^6 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^6$ CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 5×10^6 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^7 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^7$ CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 5×10^7 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 1×10^8 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^8$ CAR экспрессирующих клеток, или по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^8 CAR экспрессирующих клеток.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-33, отличающийся тем, что клеточная терапия включает введение примерно 5×10^7 CAR экспрессирующих Т-клеток.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-34, отличающийся тем, что клеточная терапия включает введение примерно 1×10^8 CAR экспрессирующих клеток.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, отличающийся тем, что клеточная терапия включает клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

37. Способ по варианту осуществления 36, где антигеном является опухолевый антиген или он экспрессируется на раковых клетках.

38. Способ по любому из вариантов осуществления 1-37, отличающийся тем, что антиген выбран из $\alpha v \beta 6$ интегрина ($\alpha v \beta 6$ интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, С-С мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40),

эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека А1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека А2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1).

39. Способ по любому из вариантов осуществления 1-38, где антигеном является CD19.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 36-39, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ).

41. Способ по любому из вариантов осуществления 36-40, отличающийся тем, что внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

42. Способ по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область включает сигнальный домен CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

43. Способ по варианту осуществления 42, отличающийся тем, что костимулирующим доменом является или содержит сигнальный домен CD28.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-43, отличающийся тем, что

клеточная терапия содержит аутологичные клетки от субъекта.

45. Способ по варианту осуществления, изобретения 44, отличающийся тем, что способ включает сбор биологического образца от субъекта, содержащего аутологичные клетки, до начала введения ингибитора.

46. Способ по варианту осуществления, 45, отличающийся тем, что биологический образец от субъекта является или включает образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), образец не фракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкофереза.

47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-46, отличающийся тем, что способ включает, перед введением цитотоксической терапии, введение субъекту противолимфомного агента или терапии.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 1-47, отличающийся тем, что субъекта ранее лечили ингибитором белка семейства Bcl-2, способствующего выживанию, необязательно, где субъекта ранее лечили венетоклаксом.

49. Способ по варианту осуществления 48, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором вводят во период времени между сбором аутологичных клеток и до противолимфомной терапии.

50. Способ по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, за точно или примерно 3 дней, или, по меньшей мере, за точно или примерно 4 дней до введения противолимфомной терапии и/или, по меньшей мере, за некоторое время до того, как концентрация ингибитора в кровотоке субъекта снизится примерно на три периода полужизни или примерно на четыре периода полужизни и/или, по меньшей мере, на время, пока ингибитор не будет удален из кровотока субъекта.

51. Способ по любому из вариантов осуществления 47-50, отличающийся тем, что противолимфомную терапию завершают за 2-7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

52. Способ по любому из вариантов осуществления 47-51, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфида.

53. Способ по любому из вариантов осуществления 47-52, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение циклофосфида в концентрации примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$, необязательно, в концентрации точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в концентрации примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней, или где противолимфомная терапия включает введение циклофосфида в дозе примерно 500 мг/м^2 .

54. Способ по любому из вариантов осуществления 47-53, отличающийся тем, что: противолимфомная терапия включает введение циклофосфида в концентрации примерно 300 мг/м^2 и флударабина в дозе примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней;

и/или

противолимфомная терапия включает введение циклофосфида в дозе приблизительно 500 мг/м² и флударабина в дозе приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней.

55. Способ по любому из вариантов осуществления 1-54, отличающийся тем, что начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно 3 дней до начала введения цитотоксической терапии.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 1-55, отличающийся тем, что начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно 2 дней до начала введения цитотоксической терапии.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 1-56, отличающийся тем, что начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно 1 дня до начала введения цитотоксической терапии.

58. Способ по любому из вариантов осуществления 1-57, отличающийся тем, что начало введения ингибитора происходит одновременно или в тот же день, что и начало введения ингибитора.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 1-54, где начало введения ингибитора происходит не более чем через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии, необязательно, где начало введения ингибитора происходит в пределах 1 дня после начала введения цитотоксической терапии.

60. Способ по любому из вариантов осуществления 1-59, отличающийся тем, что: схема дозирования ингибитора включает субтерапевтическое количество ингибитора;

схема дозирования ингибитора является недостаточной для уменьшения опухолевой массы у субъекта или снижает опухолевую массу менее чем на 10% при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией; и/или

схема дозирования ингибитора не приводит к полному или частичному ответу в группе субъектов, леченных аналогичным образом, или приводит к такому ответу не более чем у 10% таких субъектов при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией.

61. Способ по любому из вариантов осуществления 1-60, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает дозирование один раз в сутки.

62. Способ по любому из вариантов осуществления 1-61, где однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 150 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или

примерно 100 мг, включительно.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, отличающийся тем, что однократной суточной дозой является количество ингибитора, равное точно или примерно 20 мг.

67. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, отличающийся тем, что однократной суточной дозой является количество ингибитора, равное точно или примерно 40 мг.

68. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, отличающийся тем, что однократной суточной дозой является количество ингибитора, равное точно или примерно 50 мг.

69. Способ по любому из вариантов осуществления 1-65, где однократной суточной дозой является количество ингибитора, равное точно или примерно 100 мг.

70. Способ по любому из вариантов осуществления 1-57, отличающийся тем, что ингибитор вводят по схеме увеличения дозы перед введением схемы дозирования ингибитора, где схема увеличения дозы необязательно включает введение увеличивающихся количеств ингибитора вплоть до однократной суточной дозы.

71. Способ по любому из вариантов осуществления 1-70, отличающийся тем, что ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинаций.

72. Способ по любому из вариантов осуществления 1-71, где одним или несколькими белками семейства BCL2, способствующими выживанию, являются BCL2, BCLXL и/или BCLW.

73. Способ по любому из вариантов осуществления 1-72, отличающийся тем, что ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, с полумаксимальной ингибирующей концентрацией (IC50) меньше или меньше примерно 1000 нМ, 900 нМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ или меньше или меньше примерно 10 нМ.

74. Способ по любому из вариантов осуществления 1-73, отличающийся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина.

75. Способ по любому из вариантов осуществления 1-74, отличающийся тем, что ингибитором является навитоклакс.

76. Способ по любому из вариантов осуществления 1-74, отличающийся тем, что ингибитором является венетоклакс.

77. Способ по любому из вариантов осуществления 1-74, отличающийся тем, что раком является гематологическое злокачественное образование.

78. Способ по любому из вариантов осуществления 1-77, отличающийся тем, что раком является В-клеточная злокачественная опухоль.

79. Способ по любому из вариантов осуществления 1-78, отличающийся тем, что

раком является миелома, лейкоз или лимфома.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 1-79, отличающийся тем, что раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская лимфома (NHL), В-крупноклеточная лимфома.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 1-80, отличающийся тем, что раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

82. Способ по любому из вариантов осуществления 1-80, отличающийся тем, что раком является не ходжкинская лимфома (NHL).

83. Способ по варианту осуществления 82, отличающийся тем, что NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL).

84. Способ по любому из вариантов осуществления 1-80, отличающийся тем, что раком является первичная В-клеточная лимфома средостения (PMBCL) или фолликулярная лимфома (FL), необязательно, фолликулярная лимфома 3В степени (FL3В).

85. Способ по любому из вариантов осуществления 1-84, отличающийся тем, что у субъекта произошел рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, не достиг успеха и/или не перенес лечение одним или несколькими предшествующими видами терапии для лечения рака.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 1-85, отличающийся тем, что рак является резистентным к лечению только цитотоксической терапией.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 1-86, отличающийся тем, что рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

88. Способ по любому из вариантов осуществления 1-87, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение до 6 месяцев после начала введения цитотоксической терапии.

89. Способ по любому из вариантов осуществления 1-88, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение до 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии.

90. Способ по любому из вариантов осуществления 1-89, отличающийся тем, что введение ингибитора по схеме дозирования прекращают, если субъект демонстрирует клиническую ремиссию.

91. Способ по любому из вариантов осуществления 1-90, отличающийся тем, что: способ увеличивает цитотоксическую активность цитотоксической терапии по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора; и/или

способ увеличивает цитолитическое уничтожение одной или нескольких раковых клеток, необязательно через опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз, по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора.

92. Способ по любому из вариантов осуществления 1-91, отличающийся тем, что:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полного ответа (CR), который является длительным, или является длительным у, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR, в течение точно или более 6 месяцев или точно или более 9 месяцев; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR через шесть месяцев, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение более точно или более чем 3 месяцев и/или в течение более точно или более чем 6 месяцев и/или более девяти месяцев; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают объективного ответа (OR), необязательно, где OR является длительным или длительным, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR в течение точно или более чем 6 месяцев, или точно или более чем 9 месяцев; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, остаются в ответе или выживают в течение более или более чем 3 месяцев и/или более или более чем 6 месяцев.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 1-92, отличающийся тем, что субъектом является человек.

94. Способ лечения цитотоксической терапией, включающий:

(а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака;

(b) выбор субъекта для лечения цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, ниже контрольного значения гена; и

(с) введение выбранному пациенту цитотоксической терапии, которая связывает антиген, ассоциированный, экспрессируемый или присутствующий на клетках рака.

95. Способ выбора субъекта, страдающего раком, для введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, где способ включает:

(а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта,

где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект должен получать введение цитотоксической терапии, которая является иммунотерапией или клеточной терапией, которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и

(b) выбор субъекта, страдающего раком, для лечения ингибитором белка семейства

BCL2, способствующего выживанию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

96. Способ по варианту осуществления, изобретения 95, дополнительно включающий введение выбранному субъекту ингибитора в сочетании с цитотоксической терапией.

97. Способ по варианту осуществления, изобретения 95, отличающийся тем, что, если субъект не выбран для лечения ингибитором, субъекту вводят только цитотоксическую терапию.

98. Способ идентификации субъекта, страдающего раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, включающий:

(а) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта,

где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект является кандидатом на введение дозы цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является иммунотерапия или клеточная терапия, которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и

(b) идентификацию субъекта как больного раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

99. Способ по варианту осуществления 98, отличающийся тем, что, если у субъекта выявлен рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, способ дополнительно включает введение альтернативного лечения идентифицированному субъекту, где альтернативное лечение выбрано из следующих: комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность цитотоксической терапии; повышенная доза цитотоксической терапии; и/или химиотерапевтический агент.

100. Способ по варианту осуществления, 99, отличающийся тем, что альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность Т-клеточной терапии, необязательно где дополнительным агентом является ингибитор иммунных контрольных точек, модулятор метаболического пути, антагонист аденозинового рецептора, ингибитор киназы, анти-TGF β антитело или анти-TGF β R антитело, цитокин и/или ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

101. Способ по варианту осуществления 99 или варианту осуществления 100, отличающийся тем, что альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и ингибитор белка семейства BCL2,

способствующего выживанию.

102. Способ по варианту осуществления 99, отличающийся тем, что альтернативным лечением является увеличенная доза цитотоксической терапии по сравнению с дозой цитотоксической терапии, вводимой субъекту, у которого выявлен рак, который, по прогнозам, не будет резистентным к лечению цитотоксической терапией, необязательно, где цитотоксическая терапия содержит клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, который связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака.

103. Способ по варианту осуществления 102, отличающийся тем, что повышенная доза цитотоксической терапии содержит увеличенное количество клеток цитотоксической терапии по сравнению с дозой цитотоксической терапии, введенной субъекту, у которого выявлен рак, который, по прогнозам, не будет резистентным к лечению цитотоксической терапией.

104. Способ по варианту осуществления 99, отличающийся тем, что альтернативным лечением является химиотерапевтический агент, необязательно, где химиотерапевтическим агентом является циклофосфамид, доксорубин, преднизон, винкристин, флударабин, бендамустин и/или ритуксимаб.

105. Способ по варианту осуществления 98, отличающийся тем, что, если у субъекта выявлен рак, который, по прогнозам, не будет резистентным к лечению цитотоксической терапией, пациенту вводят только дозу цитотоксической терапии.

106. Способ по любому из вариантов осуществления 98-100, дополнительно включающий введение идентифицированному субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

107. Способ по любому из вариантов осуществления 94-106, отличающийся тем, что эталонное значение гена находится в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% от среднего уровня или количества одного или нескольких генов в (а) популяции субъектов, не страдающих раком, или (б) популяции субъектов, страдающих раком и которым вводили терапию, которые продолжают демонстрировать частичный ответ (PR) или полный ответ (CR) после введения терапии.

108. Способ по варианту осуществления 107, отличающийся тем, что популяция субъектов, страдающих раком, продолжала демонстрировать PR или CR по меньшей мере, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более после введения терапии.

109. Способ по любому из вариантов осуществления 94-108, отличающийся тем, что уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, оценивают в биологическом образце перед введением субъекту противолимфомной терапии, необязательно в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до 3 дней до, 2 дней до, 1 дня до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часов до или 1 часа до введения субъекту противолимфомной терапии.

110. Способ определения чувствительности субъекта, страдающего раком, к

цитотоксической терапии, где способ включает:

(а) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта,

где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где биологический образец получают от субъекта в первый раз до того, как субъекту вводят цитотоксическую терапию, и где субъект должен получать лечение цитотоксической терапией;

(b) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии,

где уровнем или количеством одного или более генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемых одним или несколькими генами, способствующих выживанию, где биологический образец получают во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии, и где субъекту вводили цитотоксическую терапию до оценки на стадии (b); и

(c) определение того, что субъект реагирует на терапию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, во второй раз ниже, чем уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в первый раз.

111. Способ по варианту осуществления, изобретения 110, дополнительно включающий до оценки на стадии (b) введение субъекту цитотоксической терапии.

112. Способ по варианту осуществления 110 или варианту осуществления 111, отличающийся тем, что биологический образец получают от субъекта до введения субъекту противолимфомной терапии, необязательно в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до 3 дней до, 2 дней до, 1 дня до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часов до или 1 часа до введения субъекту противолимфомной терапии.

113. Способ по любому из вариантов осуществления 94-112, отличающийся тем, что один или несколько генов, способствующих выживанию, выбраны из следующих: ген семейства *tms*, *p53* и энхансер гомолога 2 *zeste* (*EZH2*).

114. Способ по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является ген семейства *tms*.

115. Способ по варианту осуществления 114, отличающийся тем, что ген семейства *tms* включает один или несколько из *c-tms*, *l-tms* и *n-tms*.

116. Способ по любому из воплощений 113-115, отличающийся тем, что одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является *p53*.

117. Способ по любому из вариантов осуществления 113-116, отличающийся тем, что одним или несколькими генами, способствующими выживанию, является *EZH2*.

118. Способ по любому из вариантов осуществления 94-117, отличающийся тем,

что цитотоксической терапией является клеточная терапия.

119. Способ по любому из вариантов осуществления 94-118, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит клетки, которые являются аутологичными к субъекту.

120. Способ по любому из вариантов осуществления 94-119, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), эндогенной Т-клеточной терапии, терапии натуральными киллерами (NK), трансгенной TCR терапии и экспрессирующей рекомбинантный рецептор клеточной терапии, которой необязательно является экспрессирующая химерный антигенный рецептор (CAR) клеточная терапия.

121. Способ по любому из вариантов осуществления 94-120, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном.

122. Способ по любому из вариантов осуществления 94-121, отличающийся тем, что, если субъекту вводят цитотоксическую терапию, введение цитотоксической терапии включает введение от точно или от примерно 1×10^5 до 5×10^8 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); от точно или от примерно 1×10^5 до 2×10^8 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); от точно или от примерно 1×10^6 до 1×10^8 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC); или от 1×10^6 до 5×10^7 общих клеток клеточной терапии, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

123. Способ по любому из вариантов осуществления 94-122, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена Т-клетками.

124. Способ по любому из вариантов осуществления 94-123, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена CD3+, CD4+, CD8+ или CD4+ и CD8+ Т-клетками.

125. Способ по любому из вариантов осуществления 94-124, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена CD4+ и CD8+ Т-клетками.

126. Способ по варианту осуществления, 125, отличающийся тем, что CD4+ и CD8+ Т-клетки цитотоксической терапии содержат определенное отношение CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, и/или CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, что составляет точно или приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 94-126, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия включает введение CD4+ и CD8+ Т-клеток, где Т-клетки каждой дозы содержат рецептор, необязательно CAR, который специфически связывается

с антигеном, где введение включает введение множества отдельных композиций, где множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую или обогащенную CD8+ Т-клетками, и вторую композицию, содержащую или обогащенную CD4+ Т-клетками.

128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что:

CD4+ Т-клетки, содержащие рецептор, в одной из первой и второй композиций, и CD8+ Т-клетки, содержащие рецептор, в другой из первой и второй композиций, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1; и/или

CD4+ Т-клетки, содержащие рецептор, и CD8+ Т-клетки, содержащие рецептор, вводимые в первой и второй композициях, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

129. Способ по любому из вариантов осуществления 94-128, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена натуральными киллерами (NK).

130. Способ по любому из вариантов осуществления 94-129, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена клетками, производными от iPS.

131. Способ по любому из вариантов осуществления 120-130, отличающийся тем, что рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не-Т-клеточный рецептор.

132. Способ по любому из вариантов осуществления 120-130, где рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

133. Способ по любому из вариантов осуществления 94-132, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия включает введение от точно или примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^7 до 1×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, включительно.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 94-133, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия включает введение по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^5$ CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^5 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 1×10^6 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^6$ CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 5×10^6 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 1×10^7 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^7$ CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 5×10^7 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или по меньшей мере, примерно 1×10^8 CAR экспрессирующих клеток, по меньшей мере, или,

по меньшей мере, примерно $2,5 \times 10^8$ CAR экспрессирующих клеток, или по меньшей мере, или, по меньшей мере, примерно 5×10^8 CAR экспрессирующих клеток.

135. Способ по любому из вариантов осуществления 94-134, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия включает введение примерно 5×10^7 CAR экспрессирующих Т-клеток.

136. Способ по любому из вариантов осуществления 94-135, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия включает введение примерно 1×10^8 CAR экспрессирующих клеток.

137. Способ по любому из вариантов осуществления 94-136, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

138. Способ по любому из вариантов осуществления 94-137, отличающийся тем, что антиген выбран из $\alpha\beta6$ интегрина ($\alpha\beta6$ интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), В7-Н3, В7-Н6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина А2, С-С мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса С группы 5 члена D (GPC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека А1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека А2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства А (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена

меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1).

139. Способ по любому из вариантов осуществления 94-138, где антигеном является CD19.

140. Способ по любому из вариантов осуществления 137-139, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен цепи CD3-дзета (CD3ζ).

141. Способ по любому из вариантов осуществления 137-140, отличающийся тем, что внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

142. Способ по варианту осуществления, изобретения 141, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

143. Способ по варианту осуществления, изобретения 142, отличающийся тем, что костимулирующий домен является или включает сигнальный домен CD28.

144. Способ по любому из вариантов осуществления 94-143, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит аутологичные клетки от субъекта.

145. Способ в соответствии с вариантом осуществления, 144, отличающийся тем, что, если субъекту вводят белок семейства BCL2, способствующий выживанию, способ включает сбор у субъекта биологического образца, содержащего аутологичные клетки, до начала введения ингибитора.

146. Способ по варианту осуществления 145, отличающийся тем, что биологический образец от субъекта является или включает образец цельной крови, образец лейкоцитарной пленки, образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), образец не фракционированных Т-клеток, образец лимфоцитов, образец лейкоцитов, продукт афереза или продукт лейкафереза.

147. Способ по любому из вариантов осуществления 94-146, отличающийся тем, что если субъекту вводят белок семейства BCL2, способствующий выживанию, способ дополнительно включает введение субъекту противолимфомного агента или терапии перед введением цитотоксической терапии.

148. Способ по любому из вариантов осуществления 94-147, отличающийся тем, что субъекта ранее лечили ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, необязательно, где субъект ранее лечили венетоклаксом.

149. Способ по варианту осуществления, изобретения 148, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором вводят во период времени между сбором аутологичных клеток и до противолимфомной терапии.

150. Способ по варианту осуществления, изобретения 149, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, за точно или примерно 3 дней, или, по меньшей мере, за точно или примерно 4 дней до введения противолимфомной терапии и/или, по меньшей мере, за некоторое время до того, как концентрация ингибитора в кровотоке субъекта снизится примерно на три периода полужизни или примерно на четыре периода полужизни и/или, по меньшей мере, на время, пока ингибитор не будет удален из кровотока субъекта.

151. Способ по любому из вариантов осуществления 147-150, отличающийся тем, что противолимфомную терапию завершают за 2-7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

152. Способ по любому из вариантов осуществления 147-151, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида.

153. Способ по любому из вариантов осуществления 147-152, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$, необязательно, в концентрации точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в концентрации примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней, или где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе примерно 500 мг/м^2 .

154. Способ по любому из вариантов осуществления 147-153, отличающийся тем, что:

противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации примерно 300 мг/м^2 и флударабина в дозе примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней; и/или

противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе приблизительно 500 мг/м^2 и флударабина в дозе приблизительно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней.

155. Способ по любому из вариантов осуществления 94-154, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно за 3 дня до начала введения цитотоксической терапии.

156. Способ по любому из вариантов осуществления 95-155, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно за 2 дня до начала введения цитотоксической терапии.

157. Способ по любому из вариантов осуществления 95-156, отличающийся тем, что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий

выживанию, начало введения ингибитора происходит в пределах точно или примерно за 1 день до начала введения цитотоксической терапии.

158. Способ по любому из вариантов осуществления 95-157, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, начало введения ингибитора происходит одновременно или в тот же день, что и начало введения ингибитора.

159. Способ по любому из вариантов осуществления 95-154, отличающийся тем, что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, начало введения ингибитора происходит не более чем через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии, необязательно, где начало введения ингибитора происходит в пределах 1 дня после начала введения цитотоксической терапии.

160. Способ по любому из вариантов осуществления 95-159, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, то:

схема дозирования ингибитора включает субтерапевтическое количество ингибитора;

схема дозирования ингибитора является недостаточной для уменьшения опухолевой массы у субъекта или снижает опухолевую массу менее чем на 10% при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией; и/или

схема дозирования ингибитора не приводит к полному или частичному ответу в группе субъектов, леченных аналогичным образом, или приводит к такому ответу не более чем у 10% таких субъектов при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией.

161. Способ по любому из вариантов осуществления 95-160, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, схема дозирования ингибитора включает дозирование один раз в сутки.

162. Способ по любому из вариантов осуществления 95-161, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 250 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 200 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 150 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 100 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 50 мг, от точно или примерно 20 мг и до точно или примерно 40 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 800 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 400 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 350 мг, от точно или примерно 40 мг и до точно или примерно 300 мг, от точно или примерно

что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 20 мг.

167. Способ по любому из вариантов осуществления 94-165, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 40 мг.

168. Способ по любому из вариантов осуществления 94-165, отличающийся тем, что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 50 мг.

169. Способ по любому из вариантов осуществления 95-165, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, однократной суточной дозой является количество ингибитора точно или примерно 100 мг.

170. Способ по любому из вариантов осуществления 95-157, отличающийся тем, что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, ингибитор вводят по схеме увеличения дозы перед введением схемы дозирования ингибитора, где схема увеличения дозы необязательно включает введение увеличивающихся количеств ингибитора вплоть до однократной суточной дозы.

171. Способ по любому из вариантов осуществления 95-170, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, этот ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинации.

172. Способ по варианту осуществления, изобретения 171, отличающийся тем, что одним или несколькими белками семейства BCL2, способствующими выживанию, являются BCL2, BCLXL и/или BCLW.

173. Способ по любому из вариантов осуществления 95-172, отличающийся тем, что ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, с полумаксимальной ингибирующей концентрацией (IC50) меньше или меньше примерно 1000 нМ, 900 нМ, 800 нМ, 600 нМ, 500 нМ, 400 нМ, 300 нМ, 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ или меньше или меньше примерно 10 нМ.

174. Способ по любому из вариантов осуществления 95-173, отличающийся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина.

175. Способ по любому из вариантов осуществления 94-174, отличающийся тем, что ингибитором является навитоклакс.

176. Способ по любому из вариантов осуществления 95-174, отличающийся тем, что ингибитором является венетоклакс.

177. Способ по любому из вариантов осуществления 95-174, отличающийся тем, что раком является гематологическое злокачественное образование.

178. Способ по любому из вариантов осуществления 94-177, отличающийся тем, что раком является В-клеточное злокачественное образование.

179. Способ по любому из вариантов осуществления 94-178, отличающийся тем, что раком является миелома, лейкоз или лимфома.

180. Способ по любому из вариантов осуществления 94-179, отличающийся тем, что раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская лимфома (NHL), В-крупноклеточная лимфома.

181. Способ по любому из вариантов осуществления 94-810, отличающийся тем, что раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

182. Способ по любому из вариантов осуществления 94-180, отличающийся тем, что раком является неходжкинская лимфома (NHL).

183. Способ по варианту осуществления, изобретения 182, отличающийся тем, что NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL).

184. Способ по любому из вариантов осуществления 94-180, отличающийся тем, что раком является первичная В-клеточная лимфома средостения (PMBCL) или фолликулярная лимфома (FL), необязательно, фолликулярная лимфома 3В степени (FL3В).

185. Способ по любому из вариантов осуществления 94-184, отличающийся тем, что у субъекта произошел рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, не достиг успеха и/или не перенес лечение одним или несколькими предшествующими видами терапии для лечения рака.

186. Способ по любому из вариантов осуществления 94-185, отличающийся тем, что рак является резистентным к лечению только цитотоксической терапией.

187. Способ по любому из вариантов осуществления 96-186, отличающийся тем, что рак демонстрирует сверхэкспрессию или aberrантную экспрессию белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

188. Способ по любому из вариантов осуществления 95-187, отличающийся тем, что если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение до 6 месяцев после начала введения цитотоксической терапии.

189. Способ по любому из вариантов осуществления 95-188, отличающийся тем, что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию, схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно один раз в сутки, в течение до 3 месяцев после начала введения цитотоксической терапии.

190. Способ по любому из вариантов осуществления 95-189, отличающийся тем,

что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, введение ингибитора по схеме дозирования прекращают, если субъект демонстрирует клиническую ремиссию.

191. Способ по любому из вариантов осуществления 95-190, отличающийся тем, что, если субъекту вводят ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию:

способ увеличивает цитотоксическую активность цитотоксической терапии по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора; и/или

способ увеличивает цитолитическое уничтожение одной или нескольких раковых клеток, необязательно через опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз, по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора.

192. Способ по любому из вариантов осуществления 94-191, отличающийся тем, что:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полного ответа (CR), который является длительным, или является длительным у, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR, в течение точно или более 6 месяцев или точно или более 9 месяцев; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR через шесть месяцев, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение более точно или более чем 3 месяцев и/или в течение более точно или более чем 6 месяцев и/или более девяти месяцев; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают объективного ответа (OR), необязательно, где OR является длительным или длительным, по меньшей мере, у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR в течение точно или более чем 6 месяцев, или точно или более чем 9 месяцев; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, остаются в ответе или выживают в течение более или более чем 3 месяцев и/или более или более чем 6 месяцев.

193. Способ по любому из вариантов осуществления 94-192, отличающийся тем, что биологический образец является биопсия опухоли, необязательно биопсия лимфатического узла.

194. Способ по любому из вариантов осуществления 94-193, отличающийся тем, что субъектом является человек.

Примеры

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

Пример 1: Оценка CAR T-опосредованного уничтожения опухолевых клеток

Композиции T-клеток, содержащие анти-CD19 CAR-экспрессирующие T-клетки,

получают из образцов лейкофереза от двух взрослых доноров человека с помощью процесса, включающего селекцию на основе иммуноаффинности Т-клеток (включая клетки CD4⁺ и CD8⁺) из образцов, с получением двух композиций, обогащенных CD8⁺ и CD4⁺ клетками, соответственно. Клетки обогащенных CD4⁺ и CD8⁺ композиций по отдельности активируют анти-CD3/анти-CD28 гранулами и подвергают лентивирусной трансдукции с вектором, кодирующим анти-CD19 CAR. Анти-CD19 CAR содержит анти-CD19scFv, полученный из антитела мыши (вариабельную область, полученную из FMC63), спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и CD3-дзета внутриклеточный сигнальный домен. Конструкция экспрессии в вирусном векторе дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит суррогатным маркером для экспрессии CAR, который отделяют от последовательности CAR с помощью последовательности проскока рибосомы T2A. Затем трансдуцированные популяции инкубируют отдельно в присутствии стимулирующих реагентов для размножения клеток. Размноженные CD8⁺ и CD4⁺ клетки составляют и криоконсервируют отдельно и хранят.

Криоконсервированные CD4⁺ и CD8⁺ анти-CD19 CAR-экспрессирующие клетки от каждого донора размораживают и перед использованием объединяют в соотношении CAR⁺ CD4⁺:CD8⁺ приблизительно 1:1.

Композиции анти-CD19 CAR Т-клеток культивируют с экспрессирующими CD19 клетками-мишенями, включая клетки K562, трансдуцированные для экспрессии CD19 (K562.CD19) и экспрессирующими CD19 клеточными линиями лимфомы DОНН2, WSU-FSCLL и RL. В качестве контроля, композиции анти-CD19 CAR Т-клеток совместно культивируют с клетками K562, не экспрессирующими CD19 (родительские K562). Совместные культуры с Т-клетками, не экспрессирующими CAR (имитация), также используют в качестве контроля. Композиции CAR⁺ Т-клеток и клеточные линии совместно культивируют в течение 24 часов при соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) от 0:1 до 10:1 (0:1, 0,3:1, 1:1, 3:1 и 10:1). Клетки-мишени метят CellTrace Violet (CTV). После культивирования, клетки-мишени собирают и окрашивают LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain и анализируют проточной цитометрией. Жизнеспособные клетки-мишени идентифицируют как CTV положительные, LIVE/DEAD отрицательные. Как показано на **ФИГ. 1А**, доля жизнеспособных клеток-мишеней снижается с увеличением соотношения Е:Т в совместных культурах анти-CD19 CAR Т-клеток с экспрессирующими CD19 линиями клеток-мишеней DОНН2, WSU-FSCLL и K562.CD19. Напротив, клетки RL являются более резистентными к цитолитическому уничтожению анти-CD19 CAR Т-клетками, полученными от обоих доноров.

Отдельно, сфероиды RL получают путем культивирования экспрессирующих CD19 клеток RL, сконструированных с лентивирусным реагентом для экспрессии NucLight Red в культуральных планшетах в течение 72 часов. Композицию экспрессирующих CD19 CAR Т-клеток получают от взрослого донора-человека, по существу, как описано выше.

анти-CD19 CAR T-клетки совместно культивируют со сфероидами RL в течение вплоть до 196 часов при соотношениях E:T 0,25:1, 0,5:1 и 1:1. Размер сфероида измеряют с течением времени с помощью общей площади красного объекта ($\text{мкм}^2/\text{изображение}$). Размер сфероидов, совместно культивируемых с анти-CD19 CAR T-клетками с течением времени показан на **ФИГ. 1В**.

Цитолитическая активность анти-CD19 CAR T-клеток против двух дополнительных экспрессирующих CD19 линий клеток-мишеней лимфомы, SUDHL6 и WSU-DLCL2, оценивают и сравнивают с цитолитической активностью против клеток-мишеней K562.CD19. Клетки-мишени конструируют с помощью лентивирусного реагента для экспрессии NucLight Red (NLR), что позволяет отслеживать клетки-мишени микроскопией. Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих T-клеток получают от двух взрослых доноров-людей, по существу, как описано выше. Клетки-мишени совместно культивируют с композициями CAR T-клеток, полученных от доноров, в течение до 120 часов при соотношении E:T 2,5:1. Количество эритроцитов-мишеней отслеживают с течением времени с помощью визуализации живых клеток, и количество нормализуют к количеству эритроцитов-мишеней на базовом уровне, чтобы определить кратное изменение клеток-мишеней с течением времени. Как показано на **ФИГ. 2**, анти-CD19 CAR T-клетки проявляют значительную цитолитическую активность против клеток-мишеней лимфомы K562.CD19 и SUDHL6. Однако кратное изменение количества клеток-мишеней лимфомы WSU-DLCL2 увеличивалось в ходе анализа, указывая на то, что эти клетки менее чувствительны к уничтожению анти-CD19 CAR T-клетками. Эти результаты показывают, что определенные CD19-экспрессирующие клетки резистентны к CD19-направленному CAR-опосредованному уничтожению клеток и подтверждают гипотезу о том, что некоторые CD19-экспрессирующие опухоли могут быть менее чувствительными к CD19-направленному CAR-опосредованному уничтожению клеток.

Пример 2: Влияние ингибитора члена семейства BНЗ (BCL-2) на анти-CD19 CAR T-клетки

Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих T-клеток получают от трех взрослых доноров-людей, по существу, как описано в Примере 1. Анти-CD19 CAR T-клетки стимулируют в течение 96 часов с анти-идиотипическим антителом в присутствии типового ингибитора BCL2 венетоклакса, солюбилизованного в диметилсульфоксиде (ДМСО). Контрольные анти-CD19 CAR T-клетки стимулируют в течение 96 часов с анти-идиопатическим антителом в присутствии равного количества ДМСО. В частности, анти-CD19 CAR экспрессирующие клетки добавляют в лунки 96-луночного планшета, который был предварительно покрыт анти-идиотипическим антителом, специфичным к scFv анти-CD19 CAR экспрессирующих T-клеток, описанных в примере 1, в концентрации 30 мкг/мл. Клетки культивируют в присутствии 5% сыворотки человека при 37°C и 5% CO₂. Через 96 часов клетки лизируют и АТФ из жизнеспособных клеток определяют с помощью анализа люциферинового репортера и сообщают в виде относительных единиц люминесценции. Количество CAR T-клеток, обработанных венетоклаксом, оценивают и

нормализуют до количества CAR T-клеток в контрольном ДМСО.

Как показано на **ФИГ. 3**, доля жизнеспособных анти-CD 19 CAR-экспрессирующих T-клеток снижается с увеличением доз венетоклакса. Среди трех доноров, средняя IC₅₀ венетоклакса составляет 7,9 мкМ, и средняя IC₁₀ венетоклакса составляет 0,88 мкМ. В некоторых случаях, клинические наблюдения показывают, что суточная доза венетоклакса 400 миллиграммов дает максимальную концентрацию в сыворотке (C_{max}) 2,4±1,3 мкМ. Эти результаты согласуются с наблюдением, что усиление активности анти-CD19 CAR-T-клеток можно увидеть при более низких концентрациях, чем те, которые могут оказывать пагубное влияние на жизнеспособность CAR-T-клеток, при определенных условиях.

Пример 3: Влияние ингибитора члена семейства ВНЗ (BCL-2) на CD19-направленную резистентность опухолевых клеток

Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих T-клеток получают, как описано в Примере 1, и культивируют с линиями клеток-мишеней лимфомы, экспрессирующими CD19, SUDHL6, WSU-DLCL2 или Granta-519 при соотношении E:T 2,5:1. Совместное культивирование проводят в присутствии 20 нМ или 200 нМ типового ингибитора BCL2, венетоклакса. В качестве контроля, линии опухолевых клеток-мишеней инкубируют только в присутствии ингибитора или анти-CD19 CAR T-клеток. Клетки-мишени метят NucLight Red (NLR), чтобы обеспечить отслеживание клеток-мишеней микроскопией, и гибель клеток-мишеней отслеживают по потере флуоресцентного сигнала с течением времени, по существу, как описано в Примере 1.

Как показано на **ФИГ. 4A**, анти-CD19 CAR T-клетки проявляют цитолитическую активность против клеток SUDHL6, но клеточные линии WSU-DLCL2 и Granta-519 являются более резистентными к CD19-направленному уничтожению CAR T-клеток. Присутствие одного венетоклакса в концентрации 20 нМ или 200 нМ не оказывает существенного влияния на уничтожение опухолевых клеток в этом анализе для линий резистентных опухолевых клеток, хотя уничтожение линии чувствительных опухолевых клеток SUDHL6 было достигнуто в культурах, инкубированных с 200 нМ венетоклакса. CD19-направленное уничтожение CAR T-клетками клеточных линий, резистентных к опухолям, усиливается в совместных культурах, которые инкубируют с 20 или 200 нМ венетоклакса. Эти результаты предполагают, что даже низкие дозы венетоклакса, например 20 нМ, могут сенсibilизировать опухолевые клетки к CD19-направленной, опосредованной CAR-T-клетками цитотоксичности, которые в другом случае являются резистентными.

В дополнительном эксперименте, композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих T-клеток, полученные, как описано выше, культивируют с CD19 экспрессирующей линией клеток-мишеней лимфомы Granta-519. Клетки Granta-519 конструируют с лентивирусным реагентом для экспрессии NucLight Red (NLR), чтобы можно было отслеживать клетки-мишени микроскопией. Как описано выше, клеточная линия Granta-519 определена как относительно резистентная к CD19-направленной, опосредованной

CAR T-клетками цитотоксичности, так что совместное культивирование CAR T-клеток и клеток-мишеней происходит при соотношении E:T, равном 1:1 представляет субоптимальную дозу CAR T-клеток. Анти-CD19 CAR T-клетки представляют в совместных культурах в субоптимальной дозе, и совместное культивирование проводят в присутствии 0, 0,01, 0,1 или 1 мкМ типового ингибитора BCL2, венетоклакса. Для сравнения, линии опухолевых клеток-мишеней инкубируют только в присутствии 0, 0,01, 0,1 или 1 мкМ ингибитора. Количество эритроцитов-мишеней подсчитывают с помощью визуализации живых клеток и отслеживают с течением времени.

Как показано на **ФИГ. 4В**, клетки-мишени лимфомы относительно резистентны к CD19-направленному уничтожению CAR T-клетками при субоптимальной дозе CAR T-клеток, на что указывает умеренное уменьшение количества клеток-мишеней после совместного культивирования с анти-CD19 CAR T-клетками в отсутствие венетоклакса. Присутствие одного венетоклакса в концентрации 0,01 мкМ существенно не влияет на количество клеток-мишеней в этом анализе, тогда как присутствие одного венетоклакса в концентрациях 0,1 мкМ и 1,0 мкМ оказывает умеренное влияние на количество клеток-мишеней. Однако совместные культуры, содержащие клетки-мишени лимфомы и анти-CD19 CAR T-клетки в присутствии даже 0,01 мкМ венетоклакса, демонстрируют уменьшение количества клеток-мишеней по сравнению с клетками-мишенями, обработанными только 0,01 мкМ ингибитора, что согласуется с потенциально синергическим эффектом комбинации. Совместные культуры, содержащие клетки-мишени лимфомы и анти-CD19 CAR T-клетки в присутствии 0,1 мкМ и 1,0 мкМ венетоклакса, демонстрируют еще большее CD19-направленное уничтожение CAR T-клетками.

Эти результаты согласуются с наблюдением, что низкие дозы венетоклакса могут сенсibilизировать клетки, которые в других случаях относительно резистентны к субоптимальной дозе анти-CD19 CAR T-клеток.

Пример 4: Влияние ингибитора члена семейства BHLH (BCL-2) на резистентность клеток RL к CD19-таргетирующим CAR T-клеткам

Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих T-клеток, полученные, как описано в примере 1, культивируют с CD19-экспрессирующей линией клеток-мишеней лимфомы, RL. Клетки-мишени конструируют с лентивирусным реагентом для экспрессии NucLight Red (NLR), что позволяет отслеживать клетки микроскопией. Определяют, что линия клеток RL относительно устойчива к CD19-направленной цитотоксичности, опосредованной CAR T-клетками, так что совместное культивирование CAR T-клеток и клеток-мишеней при соотношении E:T 1:1 представляет субоптимальную дозу CAR T-клеток. Анти-CD19 CAR T-клетки совместно культивируют с клетками-мишенями RL при соотношении E:T 1:1, и совместное культивирование проводят в присутствии 0,1 мкМ типового ингибитора BCL2, венетоклакса. Для сравнения, клетки-мишени инкубируют только в присутствии CAR T-клеток или 0,1 мкМ ингибитора.

Как показано на **ФИГ. 5А**, клетки RL относительно резистентны только к CD19-

направленным CAR T-клеткам, но сенсibilизированы к CD19-направленному уничтожению CAR T-клетками в присутствии 0,1 мкМ венетоклакса.

Резистентность линии клеток RL к CD19-направленным CAR T-клеткам дополнительно оценивают на трехмерной модели опухоли. Композицию CD19 CAR экспрессирующих T-клеток получают от взрослого донора-человека, по существу, как описано в Примере 1. Опухолевым клеткам RL, сконструированным для экспрессии NLR, дают возможность сформировать сфероиды в течение 72 часов, затем совместно культивируют в течение 9 дней с анти-CD19 CAR T-клетками при соотношении E:T 1:1. Субтерапевтическую концентрацию типового ингибитора BCL2 венетоклакса (0,1 мкМ) добавляют в начале совместного культивирования и измеряют объем опухоли с течением времени (**ФИГ. 5B**). В то время как изначальный объем опухоли не уменьшается в присутствии одних только анти-CD19 CAR T-клеток, добавление 0,1 мкМ венетоклакса приводит к уменьшению объема опухоли.

В родственном эксперименте, сфероиды создают из CD19 экспрессирующих клеток RL, как описано, и совместно культивируют в течение 9 дней с анти-CD19 CAR T-клетками и увеличивающимися концентрациями венетоклакса (0,01 мкМ, 0,1 мкМ или 1,0 мкМ), или только с соответствующими концентрациями венетоклакса. Как показано на **ФИГ. 5C**, на 9 день совместного культивирования более высокие концентрации венетоклакса приводят к большему уменьшению размера опухоли. Однако размер сфероидов RL, культивируемых как с анти-CD19 CAR T-клетками, так и с венетоклаксом, уменьшается значительно больше по сравнению с размером сфероидов RL, культивированных только с венетоклаксом.

В обоих экспериментах со сфероидом RL наблюдают, что комбинация венетоклакса и анти-CD19 CAR T-клеток индуцирует апоптоз опухолевых клеток (данные не показаны), несмотря на то, что такие эффекты не наблюдают в присутствии только CAR T-клеток. Эти результаты показали, что венетоклаксом может сенсibilизировать опухолевые клетки к гибели клеток, опосредованной анти-CD19 CAR T-клетками, так что комбинация демонстрирует более сильную противоопухолевую активность, чем только венетоклаксом или только анти-CD19 CAR T-клетки.

Пример 5: Влияние ингибитора BCL-2 на хронически стимулированные анти-CD19 CAR T-клетки против CD19-направленной резистентности опухолевых клеток

Анти-CD19 CAR экспрессирующие T-клетки, полученные от здоровых доноров, как описано выше, подвергают хронической стимуляции в условиях истощения активности T-клеток путем инкубации в течение 8 дней с гранулами, покрытыми анти-идиотипическим (анти-ID) антителом, направленным против CAR. После 8 дней хронической стимуляции анти-CD19 CAR экспрессирующие T-клетки собирают и затем совместно культивируют с клетками RL, сконструированными для экспрессии NLR в течение 8 дней при соотношении E:T 1:1. В качестве контроля, клетки RL культивируют в отсутствие анти-CD19 CAR T-клеток. К культурам добавляют субтерапевтические концентрации типового ингибитора BCL2 венетоклакса (0,01 мкМ или 0,1 мкМ), и

количество клеток оценивают с течением времени (**ФИГ. 6А**).

В другом эксперименте, сфероиды получают из CD19-экспрессирующих клеток RL, как описано ранее, и совместно культивируют в течение 8 дней с анти-CD19 CAR Т-клетками при отношении E:T 1:1, и возрастающими концентрациями венетоклакса (0,01 мкМ, 0,1 мкМ или 1,0 мкМ), или только с соответствующими концентрациями венетоклакса. Как и прежде, анти-CD19 CAR Т-клетки были постоянно стимулируют гранулами, покрытыми анти-ID антителами, перед совместным культивированием со сфероидами RL. Как показано на **ФИГ. 6В**, уменьшение размера опухоли наблюдают только с 1 мкМ венетоклакса, когда клетки-мишени культивируют в отсутствие CD19-таргетных CAR Т-клеток. Напротив, большее уменьшение размера опухоли наблюдают с увеличением концентрации венетоклакса, когда клетки-мишени культивируют в присутствии CD19-таргетных CAR Т-клеток. В целом, размер сфероидов RL, культивируемых как с анти-CD19 CAR Т-клетками, так и с венетоклаксом, уменьшается больше и с более низкими концентрациями венетоклакса по сравнению с размером сфероидов RL, культивированных только с венетоклаксом.

Эти данные показывают, что лечение ингибитором BCL2 увеличивает эффективность постоянно стимулированных анти-CD19 CAR Т-клеток. Не желая быть связанными теорией, результаты показывают, что добавление ингибитора BCL2 может восстановить или обратить вспять истощенное или постоянно стимулированное состояние в CAR Т-клетках, такое как может быть определено у пациентов с терминально дифференцированными CAR Т-клетками и/или тяжелым бременем заболевания.

Пример 6: Данные экспрессии гена от субъектов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Терапевтические композиции CAR Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), специфичный для CD19, вводят субъектам со В-клеточными злокачественными образованиями, и экспрессию генов в биопсиях опухолей перед лечением, которая коррелирует с ответом у субъектов, которым вводили композиции CAR Т-клеток, определяют для подгруппы субъектов.

В частности, аутологичные анти-CD19 направленные терапевтические Т-клеточные композиции создают и используют для лечения взрослых людей с рецидивирующей или рефракторной (R/R) агрессивной неходжкинской лимфомой (NHL), включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), de novo или трансформированную из вялотекущей лимфомы (NOS), В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности, с перестановками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (двойной/тройной), DLBCL, трансформированный из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) или лимфомы маргинальной зоны (MZL), первичной В-крупноклеточной лимфомы средостения (PMBCL) и фолликулярной лимфомой 3b степени (FL3B) после неэффективности 2 линий терапии. Пациенты, прошедшие лечение, включают пациентов с оценками Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) от 0 до 2 (средний период наблюдения 3,2 месяца). Ни один субъект не исключен на основании предшествующей

трансплантации аллогенных стволовых клеток (SCT), поражения вторичной центральной нервной системы (ЦНС) или оценки 2 по шкале ECOG, и минимальное абсолютное количество лимфоцитов (ALC), необходимое для афереза, отсутствует.

Вводимые терапевтические Т-клеточные композиции создают с помощью процесса, включающего обогащение на основе иммуноаффинности (например, иммуномагнитной селекции) CD4⁺ и CD8⁺ клеток из образцов лейкоафереза от отдельных субъектов, подлежащих лечению. Выделенные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки отдельно активируют и независимо трансдуцируют вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), кодирующим анти-CD19 CAR, с последующим отдельным размножением и криоконсервацией сконструированных популяций клеток. CAR содержит анти-CD19 scFv, полученный из антитела мыши (вариабельная область, полученная из FMC63, ориентация V_L-линкер-V_H), спейсер, полученный из иммуноглобулина, трансмембранный домен, полученный из CD28, костимулирующую область, полученную из 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Вирусный вектор дополнительно содержит последовательности, кодирующие усеченный рецептор, который служит в качестве суррогатного маркера для экспрессии CAR, и его отделяют от последовательности CAR последовательностью проскока рибосомы T2A.

Композиции криоконсервированных клеток размораживают перед внутривенным введением. Терапевтическую дозу Т-клеток вводят в виде определенной клеточной композиции путем введения составленной CD4⁺ CAR⁺ популяции клеток и составленной CD8⁺ CAR⁺ популяции, вводимых в целевом соотношении приблизительно 1:1. Субъектам вводят однократную или двойную дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток (каждую однократную дозу через отдельные инфузии CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток и CD8⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток, соответственно) следующим образом: одинарная доза с уровнем дозы 1 (DL-1), содержащая 5 x 10⁷ всего CAR экспрессирующих Т-клеток, двойная доза DL1, в которой каждую дозу вводят с интервалом приблизительно четырнадцать (14) дней (вводят в день 1 и день 14), или одинарная доза с уровнем дозы 2 (DL-2), содержащая 1 x 10⁸ всего CAR экспрессирующих Т-клеток. Уровень таргетной дозы и количество подмножеств Т-клеток для вводимых композиций приведены в **Таблице E1**.

Таблица E1. Таргетные уровни дозы и количество субпопуляций Т-клеток для клеточных композиций, содержащих анти-CD19 CAR Т-клетки			
Уровень дозы	Доза хелперных Т-клеток (Т_H) (CD4⁺CAR⁺)	Доза цитотоксических Т-клеток (Т_C) (CD8⁺CAR⁺)	Общая доза Т-клеток (CD3⁺CAR⁺)
1	25 x 10 ⁶	25 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶
2	50 x 10 ⁶	50 x 10 ⁶	100 x 10 ⁶

Начиная с момента времени до инфузии CAR⁺ Т-клеток, субъекты получают противолимфомную химиотерапию флударабином (flu, 30 мг/м²) и циклофосфамидом (Cy,

300 мг/м²) в течение трех (3) дней. Субъекты получают CAR-экспрессирующие Т-клетки через 2-7 дней после противопалищной терапии.

После введения композиции CAR Т-клеток, у субъектов наблюдают клинический ответ, в том числе через 3 месяца после введения, и ответ на композицию CAR Т-клеток определяют путем оценки наличия у субъекта прогрессирующего заболевания (PD), частичного ответа (PR), или полного ответа (CR).

Биопсии опухоли от подгруппы пациентов (n=36) собирают до введения CAR Т-клеток и анализируют путем секвенирования РНК (РНК-seq) на экспрессию генов в образцах комплементарной ДНК (кДНК), полученных из РНК, выделенной из биопсии опухоли. Анализ главных компонентов (РСА) проводят для наборов данных РНК-seq, полученных на основе DESeq2-нормализованных подсчетов. Экспрессию генов с помощью РНК-Seq из биоптатов опухоли до лечения коррелируют *постфактум* с ответом после введения композиции аутологичных терапевтических CAR-Т-клеток.

Результаты на **ФИГ. 7** показаны для 36 образцов биопсии опухоли, которые анализируют среди подгруппы субъектов в продолжающемся клиническом исследовании. Гипотетический порог устанавливают, исходя из предположения, что через 3 месяца после введения CD19-направленной композиции CAR-Т-клеток, 30% (11/36) субъектов не ответят на лечение CAR-Т-клетками, и 70% (25/36) субъектов смогут ответить; показаны фактические результаты ответа. Результаты показывают разделение экспрессии генов между субъектами, которые не ответили на лечение (субъекты демонстрируют прогрессирующее заболевание (PD); обозначенные как резистентные опухоли) и субъектами, которые были более восприимчивы к лечению (обозначенные как чувствительные опухоли). Среди образцов от субъектов с резистентными опухолями наблюдают повышенную экспрессию генов, ассоциированных с нарушением регуляции клеточного цикла и путей пролиферации клеток. Например, наблюдают более высокую экспрессию генов, родственных Мус мишеням, передаче сигналов p53 и генам с активацией EZH2. Эти результаты согласуются с выводом о том, что активация механизмов выживания, таких как анти-апоптотические факторы, в опухолевых клетках может привести к резистентности опухоли и плохому ответу на иммунотерапию, направленную на опухоль.

Пример 7: Действие постоянного ингибирования BCL2 на анти-CD19 CAR Т-клетки, культивируемые совместно с клетками-мишенями

Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих Т-клеток получают от трех здоровых доноров-людей, по существу, как описано в Примере 1. Экспрессию BCL2 CAR-Т-клетками подтверждают проточной цитометрией и сравнивают с контролем флуоресценции с комбинацией определяемых меток без одной (FMO), как показано на **ФИГ. 8А** (средняя интенсивность флуоресценции; MFI).

Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих Т-клеток от здоровых доноров инкубируют с гранулами, покрытыми анти-ID антителами, при 37°C в присутствии возрастающих концентраций венетоклакса (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1 мкМ или 10 мкМ) в

течение 48 часов. В качестве контроля, CAR T-клетки инкубируют в тех же условиях, но без венетоклакса. Затем оценивают экспрессию каспазы 3, жизнеспособность и кинетику размножения CAR T-клеток. Как показано на **ФИГ. 8В** (каждая точка представляет отдельного донора), через 48 часов после стимуляции возрастающие концентрации венетоклакса приводят к большим долям CAR⁺ T-клеток, экспрессирующих каспазу 3, что свидетельствует о гибели клеток.

После культивирования с анти-ID гранулами и, необязательно, венетоклаксом, наблюдают аналогичные профили размножения CAR⁺ T-клеток, независимо от обработки венетоклаксом или дозы (**ФИГ. 8С** и **8D**). Кроме того, на цитолитическую активность анти-CD19 CAR T-клеток не влияет совместное культивирование с клетками-мишенями JeKo-1 в течение 100 часов в присутствии 1,0 мкМ венетоклакса. Как показано на **ФИГ. 9**, количество клеток-мишеней JeKo-1 не уменьшается только обработкой венетоклаксом, но существенно снижается при совместном культивировании с CD19-таргетными CAR T-клетками в присутствии или в отсутствие венетоклакса. Не желая быть связанными теорией, данные указывают на то, что венетоклаксом может влиять на жизнеспособность анти-CD19 CAR T-клеток, но что он не влияет на жизнеспособность, кинетику размножения и цитолитическую активность жизнеспособных CAR T-клеток.

Венетоклаксом может связывать белки плазмы человека. Таким образом, чтобы определить, может ли концентрация в сыворотке модулировать действие венетоклакса на CAR T-клетки, анти-CD19 CAR T-клетки культивируют в присутствии 5%, 10% или 20% сыворотки и обрабатывают возрастающими концентрациями венетоклакса. Было определено, что IC₅₀ венетоклакса против анти-CD19 CAR T-клеток возрастает с увеличением концентрации в сыворотке (**ФИГ. 10**), что указывает на то, что действие венетоклакса на жизнеспособность CAR T-клеток может зависеть от концентрации в сыворотке.

Пример 8: Действие ингибитора BCL-2 на анти-CD19 CAR T-клетки в модели мантийноклеточной лимфомы на мышцах

Мышам NOD scid гамма (NSG) внутривенно вводят 2×10^6 клеток мантийноклеточной лимфомы JeKo-1 (День -7) и ежедневно лечат 12,5, 25, 50 или 100 мг/кг типовым ингибитором BCL2 венетоклаксом в течение 21 дня (с 0 по 21 день). Бремя опухоли (**ФИГ. 11А**) и массу тела (**ФИГ. 11В**) оценивают в ходе лечения.

В соответствии с результатами в Примере 7, линия клеток лимфомы JeKo-1 является резистентной к лечению одним венетоклаксом, независимо от уровня дозы (**ФИГ. 11А** показывает опухолевую массу, оцененную с помощью биолюминесцентной визуализации; BLI).

Для определения действия венетоклакса на анти-CD19 CAR T-клетки в модели резистентной к венетоклаксу MCL на мышцах, мышам NSG внутривенно вводят 2×10^6 клеток JeKo-1 на день -7, и затем вводят внутривенные инфузии 1×10^6 анти-CD19 CAR T-клеток, созданных в основном, как описано в предыдущем примере, в день -1 и день 0. Венетоклаксом вводят ежедневно в течение 21 дня (с 0 по 21 день) в дозе 6,25, 25 или 100

мг/кг. В качестве контроля, часть мышей лечат только венетоклаксом. Оценивали опухолевую массу (**ФИГ. 12А**), выживаемость (**ФИГ. 12В** и **12С**) и количество CAR Т-клеток (**ФИГ. 13**).

Опухолевая масса увеличивается одинаково у не леченных мышей и мышей, получавших только венетоклак. Однако, лечение CD19-таргетными CAR Т-клетками, отдельно или в комбинации с венетоклаксом, приводит к уменьшению объема опухоли во все измеренные моменты времени по сравнению с не леченными мышами и мышами, получавшими только венетоклак (**ФИГ. 12А**). Наблюдают аналогичное действие на выживаемость, как показано на **ФИГ. 12В** и **12С**.

Количество CD4+ и CD8+ CAR Т-клеток оценивают у мышей, получавших CD19-таргетные CAR Т-клетки, отдельно или в комбинации с венетоклаксом, на 7, 13 и 19 дни. Снижение дозировки в подгруппах как CD4+, так и CD8+ CAR Т-клеток наблюдают при увеличивающихся концентрациях венетоклакса (**ФИГ. 13**).

Вместе эти данные показывают, что цитолитическая способность CD19-таргетных CAR Т не может быть нарушена присутствием типового ингибитора BCL2 венетоклакса, несмотря на потерю жизнеспособности CAR Т-клеток, наблюдаемую при более высоких дозах ингибитора.

Пример 9: Отсроченное введение ингибитора BCL2 после лечения анти-CD19 CAR Т-клетками

RL клетки-мишени совместно культивируют с CD19-таргетными CAR Т-клетками, созданными, по существу, как описано в примере 1, в течение 6 дней в отсутствие или в присутствии типового ингибитора BCL2 венетоклакса (0,01 мкМ, 0,1 мкМ или 1,0 мкМ). Венетоклак добавляют одновременно с совместным культивированием или через 24, 48 или 72 часа после начала совместного культивирования. В качестве контроля, клетки-мишени RL культивируют в присутствии венетоклакса, но без CAR Т-клеток.

После 6 дней совместного культивирования оценивают количество CD3+ CAR Т-клеток и клеток-мишеней. Как показано на **ФИГ. 14А**, количество CAR Т-клеток снижается, когда 0,1 мкМ или 1,0 мкМ венетоклакса добавляют одновременно с совместным культивированием или через 24 часа. Напротив, снижение количества CD3+ CAR Т-клеток не наблюдают при добавлении венетоклакса через 48 или 72 часа после совместного культивирования, независимо от концентрации венетоклакса. Для всех оцененных временных точек, не наблюдают, что 0,01 мкМ венетоклакса снижают количество CD3+ CAR Т-клеток. Как показано на **ФИГ. 14В**, аналогичное уменьшение количества клеток-мишеней наблюдают для всех условий, за исключением клеток-мишеней, культивированных только в присутствии венетоклакса.

Эти результаты показывают, что отсрочка лечения ингибитором BCL2 может снизить влияние ингибитора на жизнеспособность CAR Т-клеток при сохранении цитолитической активности CAR-Т-клеток.

Пример 10: Лечение хронического лимфоцитарного лейкоза и малой лимфоцитарной лимфомы с помощью CD19-таргетных CAR Т-клеток и

венетоклакса

Терапевтические композиции CAR Т-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), специфичный для CD19, и венетоклакса, вводят субъектам с В-клеточными злокачественными образованиями в качестве комбинированной терапии.

В частности, аутологичные анти-CD19-направленные терапевтические Т-клеточные композиции создают и используют для лечения взрослых людей с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и малой лимфоцитарной лимфомой (SLL), которые не потерпели неудачу с двумя или несколькими предшествующими курсами терапии. Леченных субъектов ранее лечили ингибитором ВТК (например, ибрутинибом) и либо ранее не лечили венетоклаксом (венетоклаксом naïve), либо ранее лечили венетоклаксом. Для субъектов, ранее леченных венетоклаксом, субъекты не обладают непереносимостью венетоклакса и не проявляют прогрессирующее заболевание (PD) при лечении венетоклаксом в течение предыдущих 6 месяцев. Подходящие субъекты должны демонстрировать измеримое заболевание (лимфатические узлы >1,5 см в большем поперечном диаметре; GTD) или оцениваемое или измеряемое заболевание в периферической крови (PB), костном мозге (BM), печени или селезенке, и должны иметь минимальное остаточное заболевание (MRD) в PB больше или равное 10^{-4} . Субъектов подвергают скринингу на базовом уровне на экспрессию белков семейства BCL-2, и субъектов, которых ранее лечили венетоклаксом, дополнительно проверяют на мутации BCL2. Субъектов не исключают на основании статуса мутации BCL2.

Субъектам вводят композиции Т-клеток, обогащенные CD4⁺ и/или CD8⁺ клетками из образцов лейкофереза от отдельных субъектов, подлежащих лечению. Композиции, обогащенные CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетками, активируют и трансдуцируют вирусным вектором (например, лентивирусным вектором), кодирующим анти-CD19 CAR, с последующим размножением и криоконсервацией сконструированных популяций клеток. CAR содержит анти-CD19 scFv (например, содержащий вариабельную область, полученную из антитела мыши FMC63), спейсер, связывающий антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом, трансмембранный домен (например, производный из CD28), костимулирующую область (например, полученную из 4-1BB) и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета.

Композиции криоконсервированных клеток размораживают перед внутривенным введением. Субъектам вводят дозу 1×10^8 всего CAR-экспрессирующих Т-клеток (например, посредством отдельных инфузий CD4⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток и CD8⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток, необязательно представленных в соотношении 1:1 CD4⁺ к CD8⁺ клеток).

Перед инфузией CAR⁺ Т-клеток у субъектов берут образцы лейкофереза. Затем субъектам вводят переходную терапию венетоклаксом в течение трех недель перед противолимфомной терапией. В качестве переходной терапии субъектам вводят 20 миллиграммов (мг) венетоклакса ежедневно в течение первой недели, 50 мг венетоклакса

ежедневно в течение второй недели и 100 мг венетоклакса ежедневно в течение третьей недели. После вымывания венетоклакса (например, 1-7 дней), субъекты получают противолимфомную химиотерапию флударабином (Flu, 30 мг/м²) и циклофосфамидом (Cy, 300 мг/м²) в течение 3 дней. Субъекты получают дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток (например, 1 x 10⁸ всего CAR-экспрессирующих Т-клеток) через 2-7 дней после противолимфомной терапии, в день 0. В день 7 начинают введение венетоклакса. Венетоклакс вводят в дозе 200 мг в сутки примерно до 3 месяцев после начала введения CAR+ Т-клеток, например, венетоклакс вводят, начиная с 7 дня и один раз в сутки, в течение всего одиннадцати недель лечения ингибитором.

У субъектов отслеживают клинический ответ, и ответ на лечение определяют путем оценки того, демонстрирует ли субъект прогрессирующее заболевание (PD), частичный ответ (PR) или полный ответ (CR). Субъекты с минимальным остаточным заболеванием (MRD) ($\geq 10^{-4}$ в PB) или которые не демонстрируют полный ответ (CR) к концу лечения, например, к 84 дню, могут продолжить лечение венетоклаксом в соответствии со стандартом лечения, например что касается общей продолжительности лечения 12 или 24 месяцев.

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

Последовательности

#	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	АННОТАЦИЯ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (IgG4шарнир) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	спейсер (IgG4шарнир) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Шарнир-CH3 спейсер
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE	Шарнир-CH2- CH3 спейсер

	NNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGE EKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWL RDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERH SNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALRE PAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWL EDQREVNSTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPAT YTCVVSHEDSRTLNASRSLEVSIVTDH	IgD-шарнир-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNI KHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKT KIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNV RGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTG RGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGPTNGPKIPSIATGMV GALLLL LVVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 № доступа P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 № доступа P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL -

		GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRG DSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFEN LEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNK NLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHAL CSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVE NSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLE GCPTNGPKIPSIAATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	EGFR
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P- где P является пролином, G является глицином и S является серином	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatecca	GMCSFR сигнальная последовательн ость альфа

		цепи
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR сигнальная последовательность альфа цепи
26	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 альфа сигнальный пептид
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR CPEPKSCDTPPPCPRCP	Шарнир
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Шарнир
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL	scFv

	GVIWGSETTYYN SALKSRLTI IKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSS	
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSV VDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRP GQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQ LSGLTSEDSAVYFCARKTISSV VDFYFDYWGQGT TVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPG QSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLA DYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRP GQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQ LSGLTSEDSAVYFCARKTISSV VDFYFDYWGQGT TVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNV GTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDF TLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatc agctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggc accgteaaagtgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccggttagcg gcagcggctccggcaccgactacagcctgaccttccaacctggaacaggaagatcggccac ctacttttgccagcagggaacacactgccttacacctttggcggcggaacaaagctggaatca ccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgaggcagcaccagggcgaggt gaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgcac cgtgagcggcgtgagcctcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagg gcctggaatggctggcgtgatctggggcagcagaccactactacaacagcgcctgaaga gccggctgacctcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgca	Последователь ность, кодирующая scFv

	<p>gaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatg gactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc</p>	
58	<p>X₁PPX₂P X₁ является глицином, цистеином или аргинином X₂ является цистеином или треонином</p>	Шарнир
59	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий:

(1) введение цитотоксической терапии субъекту, страдающему раком, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, содержащая или обогащенная Т-клетками, и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака; и

(2) введение субъекту ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора во период времени от точно или примерно 1 дня до точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

2. Способ лечения рака, где способ включает введение субъекту, страдающему раком, ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, где ингибитор вводят по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 1 дня до точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии, где цитотоксическая терапией является Т-клеточная терапия, содержащая или обогащенную Т-клетками, и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака.

3. Способ лечения рака у субъекта, где способ включает введение цитотоксической терапии субъекту, имеющему рак, где цитотоксическая терапией является Т-клеточная терапия, включающая или обогащенная Т-клетками и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, в котором субъекту вводят или следует вводить ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию, в период времени по схеме дозирования, включающей начало введения ингибитора в период времени от точно или примерно 1 дня до точно или примерно 8 дней после начала введения цитотоксической терапии.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора после проведения цитотоксической терапии.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в течение 7 дней после начала введения цитотоксической терапии.

6. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в течение 3 дней после начала введения цитотоксической терапии.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что начало введения ингибитора происходит не более чем через 2 дня после начала введения цитотоксической терапии, необязательно, где начало введения ингибитора происходит в пределах 1 дня после начала введения цитотоксической терапии.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает начало введения ингибитора в момент после клеточной смерти,

индуцированной активацией (AICD) клеток клеточной терапии, достигшей пика после начала введения клеточной терапии.

9. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере, одну дозу ингибитора по схеме дозирования вводят одновременно с цитотоксической терапией и/или в тот же день, что и цитотоксическую терапию.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что субъекту не вводили или не давали ритуксимаб и/или ибрутиниб в течение 7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия способна вызывать или приводит к клеточно-опосредованной цитотоксичности одной или нескольких клеток рака.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия способна или опосредует опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз одной или нескольких раковых клеток.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что клеточная терапия включает клетки, которые являются аутологичными к субъекту.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающегося тем, что клеточная терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), трансгенной TCR терапии, и клеточной терапии, экспрессирующей химерный антиген рецептор (CAR).

15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что клеточная терапия включает дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что введение цитотоксической терапии включает введение от точно или примерно 1×10^5 и до точно или примерно 5×10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, от точно или примерно 1×10^5 и до точно или примерно 1×10^8 всего Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всего Т-клеток, от точно или примерно 5×10^5 и до точно или примерно 1×10^7 всего Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или общее количество Т-клеток, или от точно или примерно 1×10^6 и до точно или примерно 1×10^7 всего Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, или всех Т-клеток, все включительно.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит или обогащена CD3+, CD4+, CD8+ или CD4+ и CD8+ Т-клетками.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что клеточная терапия содержит или обогащена CD4+ и CD8+ Т-клетками.

19. Способ по п.19, отличающийся тем, что CD4+ и CD8+ Т-клетки клеточной терапии содержат определенное соотношение CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, и/или CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, которое составляет или составляет

приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, клеточная терапия включает введение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, где Т-клетки каждой дозы содержат рецептор, необязательно CAR, который специфически связывается с антигеном, где введение включает введение множества отдельных композиций, множество отдельных композиций включает первую композицию, содержащую или обогащенную CD8⁺ Т-клетками, и вторую композицию, содержащую или обогащенную CD4⁺ Т-клетками.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что:

CD4⁺ Т-клетки, содержащие рецептор, в одной из первой и второй композиций, и CD8⁺ Т-клетки, содержащие рецептор, в другой из первой и второй композиций, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1; и/или

CD4⁺ Т-клетки, содержащие рецептор, и CD8⁺ Т-клетки, содержащие рецептор, вводимые в первой и второй композициях, присутствуют в определенном соотношении, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

22. Способ по любому из пп. 15-21, отличающийся тем, что рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не-Т-клеточный рецептор.

23. Способ по любому из предшествующих пунктов 15-22, в котором рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что клеточная терапия включает введение от точно или примерно 1×10^5 до 5×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всего экспрессирующих CAR Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всего CAR экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^7 до 1×10^8 всего экспрессирующих CAR Т-клеток, все включительно.

25. Способ по п. 23 или п. 24, отличающийся тем, что клеточная терапия включает введение примерно 1×10^8 CAR экспрессирующих клеток.

26. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-25, где антигеном является опухолевый антиген.

27. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-26, отличающееся тем, что антиген выбран из выбран из $\alpha\upsilon\beta 6$ интегрина ($\alpha\upsilon\beta 6$ интегрина), антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразы 9 (CA9, также известной как CAIX или G250), раково-тестикулярного антигена, раково/тестикулярного антигена 1В (CTAG, также известного как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбрионального антигена (CEA), циклина, циклина A2, С-С мотива хемокинового лиганда 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфата протеогликана 4 (CSPG4), белка эпидермального фактора роста (EGFR), мутации III типа рецептора эпидермального фактора роста (EGFR vIII), эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40),

эфрина В2, рецептора эфрина А2 (EPHa2), рецептора эстрогена, рецептора Fc типа 5 (FCRL5; также известного как гомолог 5 рецептора Fc или FCRH5), фетального ацетилхолинового рецептора (фетального AchR), фолатсвязывающего белка (FBP), рецептора фолиевой кислоты альфа, ганглиозида GD2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), ганглиозида GD3, гликопротеина 100 (gp100), глипикана-3 (GPC3), сопряженного с G белком рецептора класса C группы 5 члена D (GPRC5D), Her2/neu (рецепторной тирозинкиназы erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеров erbB, высокомолекулярного меланома-ассоциированного антигена человека (HMW-MAA), поверхностного антигена гепатита В, лейкоцитарного антигена человека А1 (HLA-A1), лейкоцитарного антигена человека А2 (HLA-A2), рецептора альфа IL-22 (IL-22R α), рецептора альфа 2 IL-13 (IL-13R α 2), рецептора со встроенным киназным доменом (kdr), легкой цепи каппа, молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7 эпитопа L1-CAM, богатого лейцином повтора, содержащего 8 членов семейства A (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелина (MSLN), с-Met, цитомегаловируса мыши (CMV), муцина 1 (MUC1), MUC16, лигандов естественного киллера группы 2 члена D (NKG2D), мелана А (MART-1), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетального антигена, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), рецептора прогестерона, простат-специфического антигена, антигена стволовых клеток простаты (PSCA), простат-специфического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора типа рецепторной тирозинкиназы 1 (ROR1), сурвивина, гликопротеина трофобласта (TPBG, также известного как 5T4), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), родственного тирозиназе белка 1 (TRP1, также известного как TYRP1 или gp75), родственного тирозинкиназе белка 2 (TRP2, также известного как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), опухоли Вильмса 1 (WT-1).

28. Способ по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что антиген ассоциирован с В-клеточным злокачественным образованием, необязательно, где антиген экспрессируется на В-клетках человека, необязательно, где антигеном является CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Igкаппа, Igлямбда, CD79a, CD79b или CD30.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-29, отличающийся тем, что антигеном является CD19.

30. Способ по любому из пп. 23-29, отличающийся тем, что CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи и костимулирующий сигнальный домен.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область содержит сигнальную область 4-1BB.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область

содержит сигнальный домен CD28.

33. Способ по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что перед введением цитотоксической терапии способ включает введение субъекту противолимфомного агента или терапии.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что противолимфомную терапию завершают за 2-7 дней до начала введения цитотоксической терапии.

35. Способ по п. 33 или п. 34, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение флударабина и/или циклофосфамида.

36. Способ по любому из пп. 33-35, отличающийся тем, что противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации примерно $200-400 \text{ мг/м}^2$, необязательно, в концентрации точно или примерно 300 мг/м^2 , включительно, и/или флударабина в концентрации примерно $20-40 \text{ мг/м}^2$, необязательно, 30 мг/м^2 , ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно, в течение 3 дней, или где противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе примерно 500 мг/м^2 .

37. Способ по любому из пп. 32-36, отличающийся тем, что:
противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в концентрации примерно 300 мг/м^2 и флударабина в дозе примерно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней;
и/или

противолимфомная терапия включает введение циклофосфамида в дозе приблизительно 500 мг/м^2 и флударабина в дозе приблизительно 30 мг/м^2 ежедневно в течение 3 дней.

38. Способ по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что:
схема дозирования ингибитора включает субтерапевтическое количество ингибитора;

схема дозирования ингибитора является недостаточной для уменьшения опухолевой массы у субъекта или снижает опухолевую массу менее чем на 10% при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией; и/или

схема дозирования ингибитора не приводит к полному или частичному ответу в группе субъектов, леченных аналогичным образом, или приводит к такому ответу не более чем у 10% таких субъектов при введении в виде монотерапии в отсутствие комбинированного введения с цитотоксической терапией.

39. Способ по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает дозирование один раз в сутки.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что однократная суточная доза составляет от точно или примерно 20 мг до 400 мг, включительно.

41. Способ по п.39 или п.40, отличающийся тем, что однократная суточная доза составляет от точно или примерно 20 мг до точно или примерно 200 мг, включительно.

42. Способ по любому из пп. 39-41, отличающийся тем, что однократной суточной дозой является количество ингибитора от точно или примерно 50 мг до точно или

примерно 100 мг, включительно.

43. Способ по любому из пп. 39-42, отличающийся тем, что однократная суточная доза составляет точно или примерно 50 мг.

44. Способ по любому из пп. 39-43, отличающийся тем, что однократная суточная доза составляет точно или примерно 100 мг.

45. Способ по любому из пп. 39-41, отличающийся тем, что однократная суточная доза составляет точно или примерно 200 мг.

46. Способ по п.39 или п.45, отличающийся тем, что однократная суточная доза составляет точно или примерно 400 мг.

47. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-46, в котором, перед введением по схеме дозирования ингибитора, субъекта предварительно лечат ингибитором белка семейства Bcl-2, способствующего выживанию, необязательно, где субъекта предварительно лечат венетоклаксом.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором что предыдущее лечение ингибитором вводят во период времени между сбором аутологичных клеток и до противолимфомной терапии в качестве переходной терапии перед введением цитотоксической терапии, необязательно, где сбор осуществляют аферезом или лейкоферезом.

49. Способ по п.48, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором вводят по графику увеличения дозы, где график увеличения дозы содержит введение возрастающих доз ингибитора.

50. Способ по п. 48 или п. 49, отличающийся тем, что ингибитор вводят субъекту в увеличивающихся дозах до тех пор, пока не будет достигнута максимальная суточная доза 100 мг.

51. Способ по любому из пп. 48-50, отличающийся тем, что увеличивающиеся дозы включают первую дозу, которая составляет точно или примерно 20 мг в сутки, вторую дозу, которая составляет точно или примерно 50 мг в сутки, и третью дозу, которая составляет точно или примерно 100 мг в сутки.

52. Способ по любому из предшествующих пунктов 48-51, отличающийся тем, что каждую повышающуюся дозу вводят один раз в сутки в течение недели и/или последнюю повышающую дозу вводят один раз в сутки в течение недели и до точно или примерно конца переходной терапии.

53. Способ по любому из пп. 48-52, отличающийся тем, что предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, за 1 день до проведения противолимфомной терапии.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов 48-53, отличающееся тем, что предыдущее лечение ингибитором прекращают, по меньшей мере, за точно или примерно 3 дней, или, по меньшей мере, за точно или примерно 4 дней до введения противолимфомной терапии и/или, по меньшей мере, за некоторое время до того, как концентрация ингибитора в кровотоке субъекта снизится примерно на три периода

полужизни или примерно на четыре периода полужизни и/или, по меньшей мере, на время, пока ингибитор не будет удален из кровотока субъекта.

55. Способ по любому из пп. 1-54, отличающийся тем, что ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию, выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинаций.

56. Способ по любому из пп. 1-55, отличающийся тем, что одним или несколькими белками семейства BCL2, способствующими выживанию, являются BCL2, BCLXL и/или BCLW.

57. Способ по любому из пп. 1-56, отличающийся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина.

58. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-56, отличающийся тем, что ингибитором является венетоклакс.

59. Способ по любому из пп. 1-58, отличающийся тем, что раком является гематологическое злокачественное образование.

60. Способ по любому из пп. 1-59, отличающийся тем, что раком является В-клеточное злокачественное образование.

61. Способ по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что рак является миелома, лейкоз или лимфома.

62. Способ по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская лимфома (NHL), В-крупноклеточная лимфома.

63. Способ по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

64. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-62, где раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL).

65. Способ по любому из предшествующих пунктов 1-62, где раком является неходжкинская лимфома (NHL), необязательно, где NHL является диффузная В-крупноклеточная лимфома.

66. Способ по любому из пп. 1-65, отличающийся тем, что у субъекта произошел рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, потерпел неудачу и/или не перенес лечение одним или несколькими предшествующими видами терапии для лечения рака.

67. Способ по любому из пп. 1-66, отличающийся тем, что при раке наблюдается сверхэкспрессия белка семейства BCL2, способствующего выживанию, который таргетирует ингибитор.

68. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что схема дозирования ингибитора включает введение ингибитора, необязательно, один раз в сутки, в течение периода времени, по меньшей мере, 3 месяца после начала введения цитотоксической

терапии.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что способ дополнительно включает продолжение введения схемы дозирования ингибитора, если в конце периода времени, необязательно, через точно или примерно через 3 месяца, субъект не демонстрирует клиническую ремиссию, необязательно, где субъект демонстрирует частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD), или имеет минимальное остаточное заболевание (MRD), большее или равное 10^{-4} .

70. Метод по п. 68, отличающийся тем, что введение ингибитора по схеме дозирования прекращают в конце периода времени, необязательно, по меньшей мере, точно или примерно через 3 месяца, если субъект демонстрирует клиническую ремиссию.

71. Способ по любому из пп. 1-70, отличающийся тем, что:

способ увеличивает цитотоксическую активность цитотоксической терапии по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора; и/или

способ увеличивает цитолитическое уничтожение одной или нескольких раковых клеток, необязательно через опосредованный перфорином и/или гранзимом апоптоз, по сравнению со способом, который не включает введение ингибитора.

72. Способ по любому из пп. 1-71, отличающийся тем, что:

по меньшей мере, 35%, по меньшей мере, 40% или, по меньшей мере, 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают полного ответа (CR), который является длительным, или является длительным у, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR, в течение точно или более 6 месяцев или точно или более 9 месяцев; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR через шесть месяцев, остаются в ответе, остаются в CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение более точно или более чем 3 месяцев и/или в течение более точно или более чем 6 месяцев и/или более девяти месяцев; и/или

по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом, достигают объективного ответа (OR), необязательно, где OR является длительным или является длительным у, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR в течение точно или более 6 месяцев, или точно или более 9 месяцев; и/или

где, по меньшей мере, 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, остаются в ответе или выживают в течение точно или более 3 месяцев и/или точно или более 6 месяцев.

73. Способ по любому из пп. 1-72, отличающийся тем, что субъектом является человек.

74. Способ лечения цитотоксической терапией, включающий:

(а) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является

уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию,

(b) выбор субъекта для лечения цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или более генов, способствующих выживанию, ниже эталонного значения гена, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, содержащая или обогащенная Т-клетками, и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессированным или присутствующим на клетках рака; и

(c) введение выбранному пациенту цитотоксической терапии.

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что ингибитор гена, способствующего выживанию, не вводят субъекту в начале или после начала введения цитотоксической терапии, необязательно, не вводят в течение 7 дней, 14 дней или 28 дней после введения цитотоксической терапии.

76. Способ выбора субъекта, страдающего раком, для введения ингибитора белка семейства BCL2, способствующего выживанию, включающий:

(a) оценку уровня или количества одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии рака,

где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект нуждается в введении цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, содержащая или обогащенная Т-клетками и специфически связывается с антигеном, ассоциированным, экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и

(b) выбор субъекта для лечения ингибитором белка семейства BCL2, способствующего выживанию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

77. Способ по п. 76, дополнительно включающий введение выбранному субъекту ингибитора в сочетании с цитотоксической терапией.

78. Способ идентификации субъекта, страдающего раком, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, включающий:

(a) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта,

где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодированного одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где субъект является кандидатом на введение дозы цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, содержащая или обогащенная Т-клетками и специфически связывается с антигеном, ассоциированным,

экспрессируемым или присутствующим на раковых клетках, и где биологический образец получают от субъекта до введения цитотоксической терапии; и

(b) идентификацию субъекта как имеющего рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, выше контрольного значения гена.

79. Способ по п. 78, отличающийся тем, что, если у субъекта выявлен рак, который, по прогнозам, является резистентным к лечению цитотоксической терапией, способ дополнительно включает введение альтернативного лечения идентифицированному субъекту, где альтернативное лечение выбрано из следующих: комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность цитотоксической терапии; повышенная доза цитотоксической терапии; и/или химиотерапевтический агент.

80. Способ по п. 79, отличающийся тем, что альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и дополнительный агент, который модулирует или увеличивает активность Т-клеточной терапии, необязательно где дополнительным агентом является ингибитор иммунных контрольных точек, модулятор метаболического пути, антагонист аденозинового рецептора, ингибитор киназы, анти-TGF β антитело или анти-TGF β R антитело, цитокин и/или ингибитор белка семейства BCL2, способствующего выживанию.

81. Способ по п. 79 или п. 80, отличающийся тем, что альтернативным лечением является комбинированное лечение, включающее цитотоксическую терапию и ингибитор белка семейства BCL2, способствующий выживанию.

82. Способ по п. 81, дополнительно включающий введение выбранному субъекту ингибитора в сочетании с цитотоксической терапией.

83. Способ по любому из пп. 74-82, отличающийся тем, что эталонное значение гена находится в пределах 25%, в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10% или в пределах 5% от среднего уровня или количества одного или нескольких генов в (a) популяции субъектов, не страдающих раком, или (b) популяции субъектов, страдающих раком и которым вводили терапию, которые продолжают демонстрировать частичный ответ (PR) или полный ответ (CR) после введения терапии.

84. Способ по п.83, отличающийся тем, что популяция субъектов, страдающих раком, продолжала демонстрировать PR или CR по меньшей мере, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более после введения терапии.

85. Способ по любому из пп. 74-84, отличающийся тем, что уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, оценивают в биологическом образце перед введением субъекту противопролиферативной терапии, необязательно в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до, 3 дней до, 2 дней до, 1 дня до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часов до или 1 часа до введения субъекту противопролиферативной терапии.

86. Способ определения чувствительности субъекта, страдающего раком, к цитотоксической терапии, где цитотоксической терапией является Т-клеточная терапия, содержащая или обогащенная Т-клетками и которая специфически связывается с антигеном, ассоциированным с, экспрессируемым или присутствующим на клетках рака, где способ включает:

(а) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта,

где уровнем или количеством одного или нескольких генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка или полинуклеотида, кодируемого одним или несколькими генами, способствующими выживанию, где биологический образец получают от субъекта в первый раз до того, как субъекту вводят цитотоксическую терапию, и где субъект должен получать лечение цитотоксической терапией;

(b) оценку уровня или количества экспрессии одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в биологическом образце от субъекта во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии,

где уровнем или количеством одного или более генов, способствующих выживанию, является уровень или количество белка и/или полинуклеотида, кодируемых одним или несколькими генами, способствующих выживанию, где биологический образец получают во второй раз после введения субъекту цитотоксической терапии, и где субъекту вводили цитотоксическую терапию до оценки на стадии (b); и

(c) определение того, что субъект реагирует на терапию, если уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, во второй раз ниже, чем уровень или количество одного или нескольких генов, способствующих выживанию, в первый раз.

87. Способ по п. 86, дополнительно включающий, до оценки на стадии (b), введение субъекту цитотоксической терапии.

88. Способ по п. 86 или п. 87, отличающийся тем, что биологический образец получают от субъекта в момент времени перед введением субъекту противолимфомной терапии, необязательно в пределах 7 дней до, 6 дней до, 5 дней до, 4 дней до 3 дней до, 2 дней до, 1 дня до, 16 часов до, 12 часов до, 6 часов до, 2 часов до или 1 часа до введения субъекту противолимфомной терапии.

89. Способ по любому из пп. 74-88, отличающийся тем, что один или несколько генов, способствующих выживанию выбраны из следующих: ген семейства тус, p53 и энхансер гомолога 2 zeste (EZH2).

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что одним или несколькими генами, способствующими выживанию, являются или содержат ген семейства тус.

91. Способ по п. 90, отличающийся тем, что ген семейства тус включает один или несколько из с-тус, l-тус и n-тус.

92. Способ по п. 89, отличающийся тем, что одним или несколькими генами, способствующими выживанию, являются или содержат p53.

93. Способ по п. 89, отличающийся тем, что одним или несколькими генами, способствующими выживанию, являются или содержат EZH2.

94. Способ по любому из пп. 74-93, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит клетки, которые являются аутологичными к субъекту.

95. Способ по любому из пп. 74-94, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия выбрана из группы, состоящей из терапии инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), трансгенной TCR терапии, и клеточной терапии, экспрессирующей химерный антиген рецептор (CAR).

96. Способ по любому из пп. 74-95, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически связывается с антигеном.

97. Способ по любому из пп. 74-96, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена CD3+, CD4+, CD8+ или CD4+ и CD8+ Т-клетками.

98. Способ по любому из пп. 74-97, отличающийся тем, что цитотоксическая терапия содержит или обогащена CD4+ и CD8+ Т-клетками.

99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что CD4+ и CD8+ Т-клетки цитотоксической терапии содержат определенное соотношение CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, и/или CD4+ CAR экспрессирующих Т-клеток к CD8+ CAR экспрессирующим Т-клеткам, которое составляет или составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1.

100. Способ по любому из пп. 96-99, отличающийся тем, что рекомбинантным рецептором является Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не-Т-клеточный рецептор.

101. Способ по любому из пп. 96-100, отличающийся тем, что рекомбинантным рецептором является химерный антигенный рецептор (CAR).

102. Способ по п. 101, отличающийся тем, что CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, трансмембранный домен и внутриклеточную сигнальную область, содержащую внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета (CD3 ζ) цепи и костимулирующий сигнальный домен.

103. Способ по п. 102, отличающийся тем, что костимулирующая сигнальная область содержит сигнальную область 4-1BB.

104. Способ по п. 103, отличающийся тем, что костимулирующая область содержит сигнальный домен CD28.

105. Способ по любому из пп. 77, 82-85 и 89-104, отличающийся тем, что ингибитор вводят в сочетании с цитотоксической терапией в соответствии с любым из способов по пп. 1-73.

106. Способ по любому из пп. 75-105, отличающийся тем, что ингибитором гена, способствующего выживанию, является ингибитор белка семейства BCL2, где ингибитор ингибирует один или несколько белков семейства BCL2, способствующих выживанию,

выбранных из группы, состоящей из BCL2, BCLXL, BCLW, BCLB, MCL1 и их комбинаций.

107. Способ по п. 106, отличающийся тем, что одним или несколькими белками семейства BCL2, способствующими выживанию, являются BCL2, BCLXL и/или BCLW.

108. Способ по п. 106 или п. 107, отличающийся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из венетоклакса, навитоклакса, АВТ737, маритоклакса, обатоклакса и клитоцина.

109. Способ по любому из пп. 75-108, отличающийся тем, что ингибитором является венетоклакс.

110. Способ по любому из пп. 74-109, отличающийся тем, что раком является гематологическая злокачественная опухоль.

111. Способ по любому из пп. 74-110, отличающийся тем, что раком является В-клеточное злокачественное образование.

112. Способ по любому из пп. 74-111, отличающийся тем, что раком является миелома, лейкоз или лимфома.

113. Способ по любому из пп. 74-112, отличающийся тем, что раком является острый лимфобластный лейкоз (ALL), ALL у взрослых, хронический лимфобластный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), неходжкинская лимфома (NHL), В-крупноклеточная лимфома.

114. Способ по любому из пп. 74-113, отличающийся тем, что раком является хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

115. Способ по любому из пп. 74-113, отличающийся тем, что раком является малая лимфоцитарная лимфома (SLL).

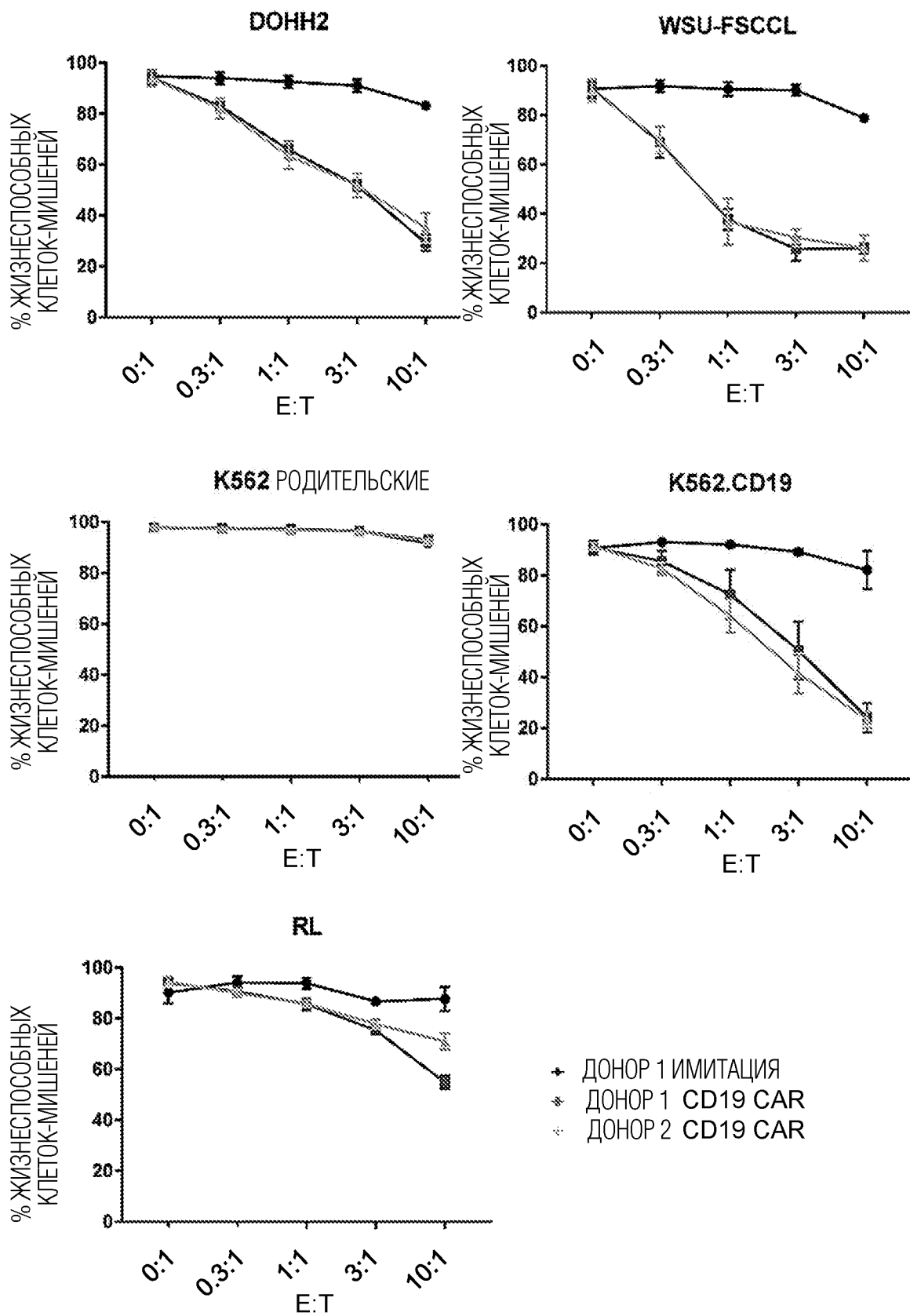
116. Способ по любому из пп. 74-113, отличающийся тем, что раком является неходжкинская лимфома (NHL), где NHL обязательно является диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL).

117. Способ по любому из пп. 74-116, отличающийся тем, что у субъекта произошел рецидив после ремиссии после лечения, или он стал рефракторным, потерпел неудачу и/или не перенес лечение одним или несколькими предшествующими видами терапии для лечения рака.

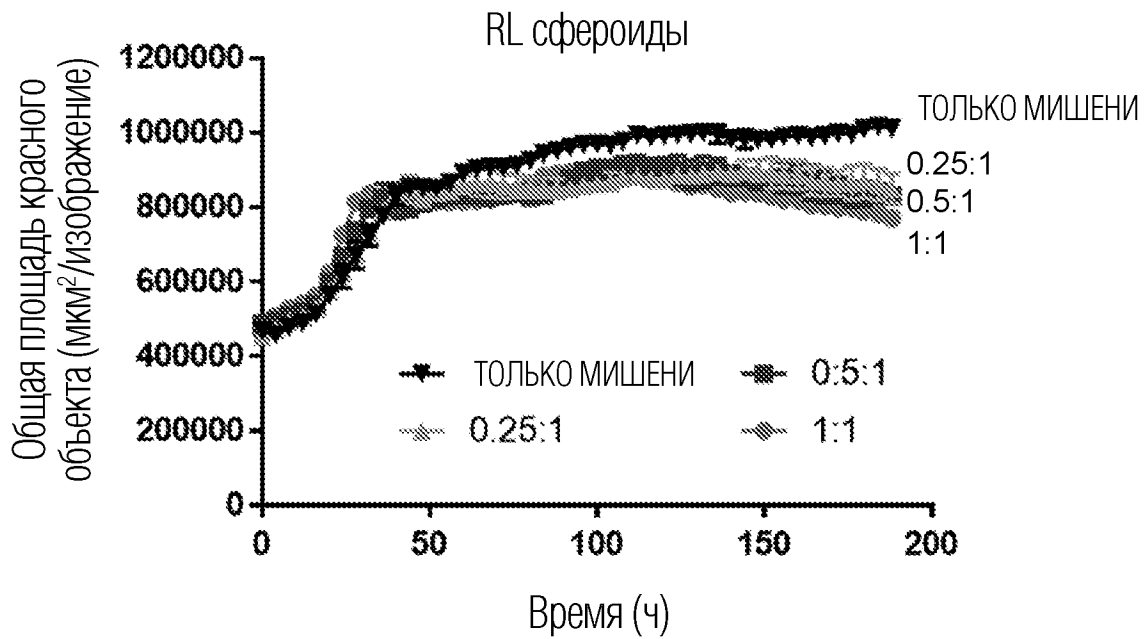
118. Способ по любому из пп. 74-117, отличающийся тем, что биологическим образцом является биопсия опухоли, обязательно биопсия лимфатического узла.

119. Способ по любому из пп. 74-118, отличающийся тем, что субъектом является человек.

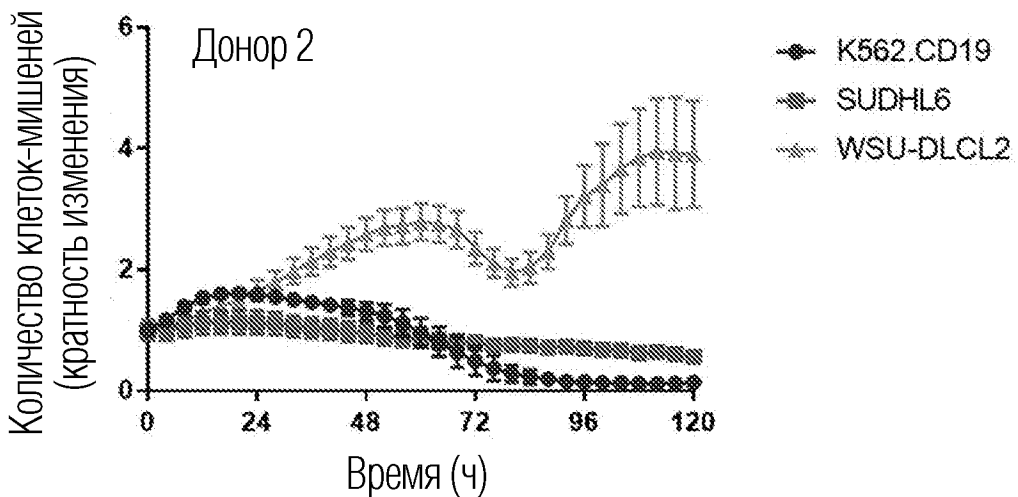
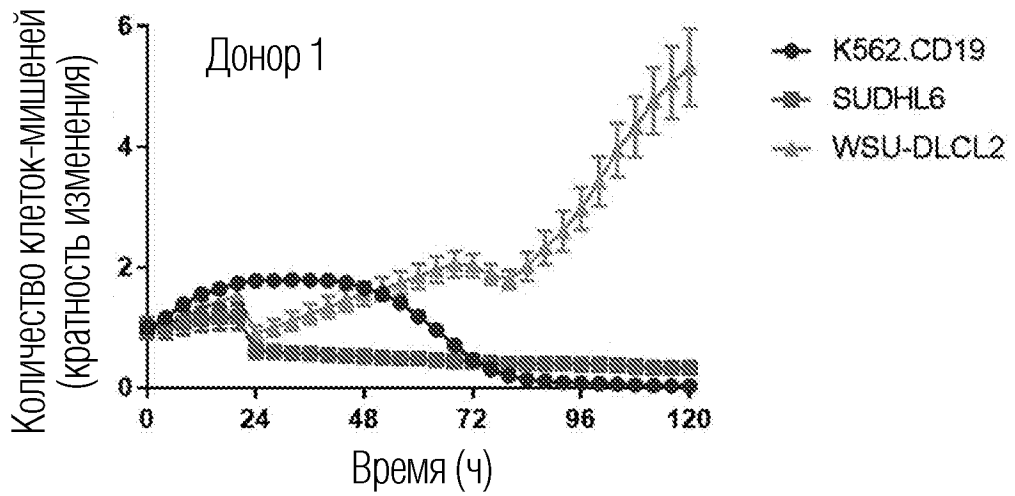
ФИГ. 1А



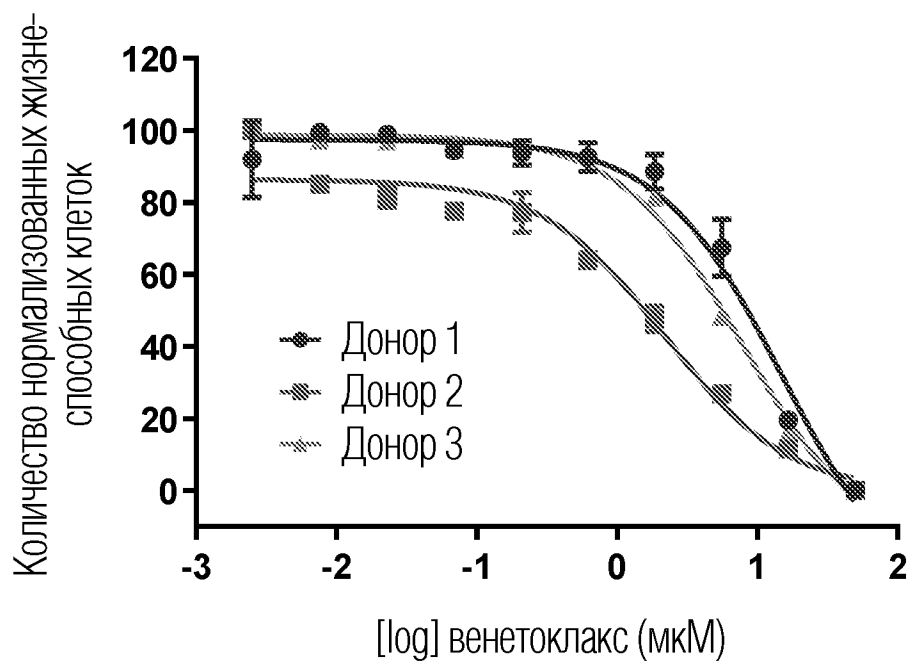
ФИГ. 1В



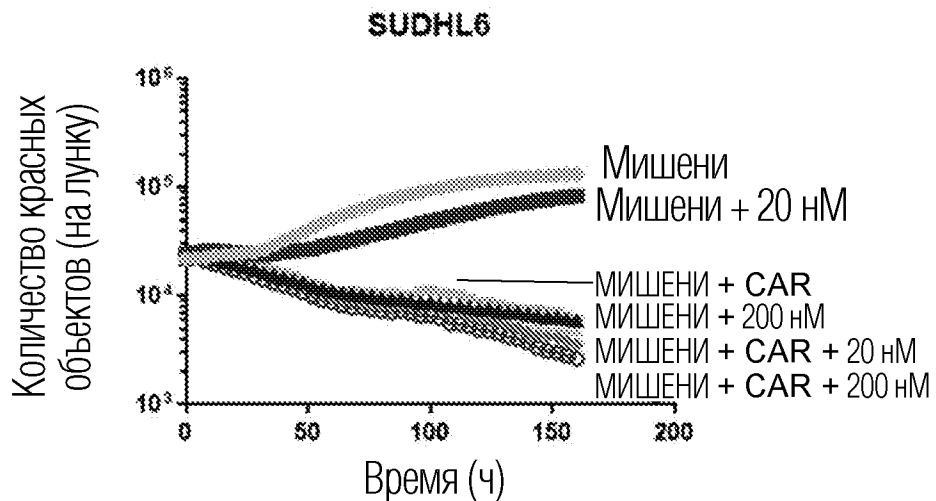
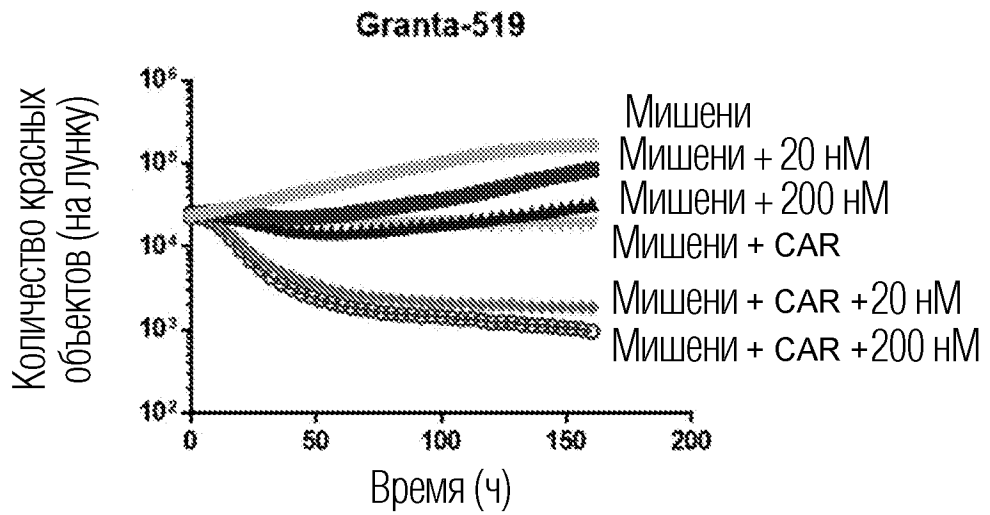
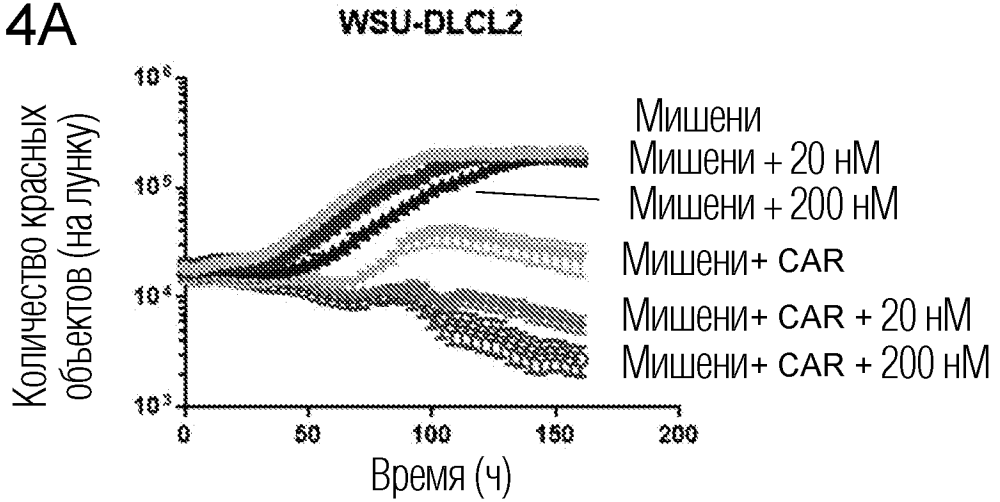
ФИГ. 2



ФИГ. 3

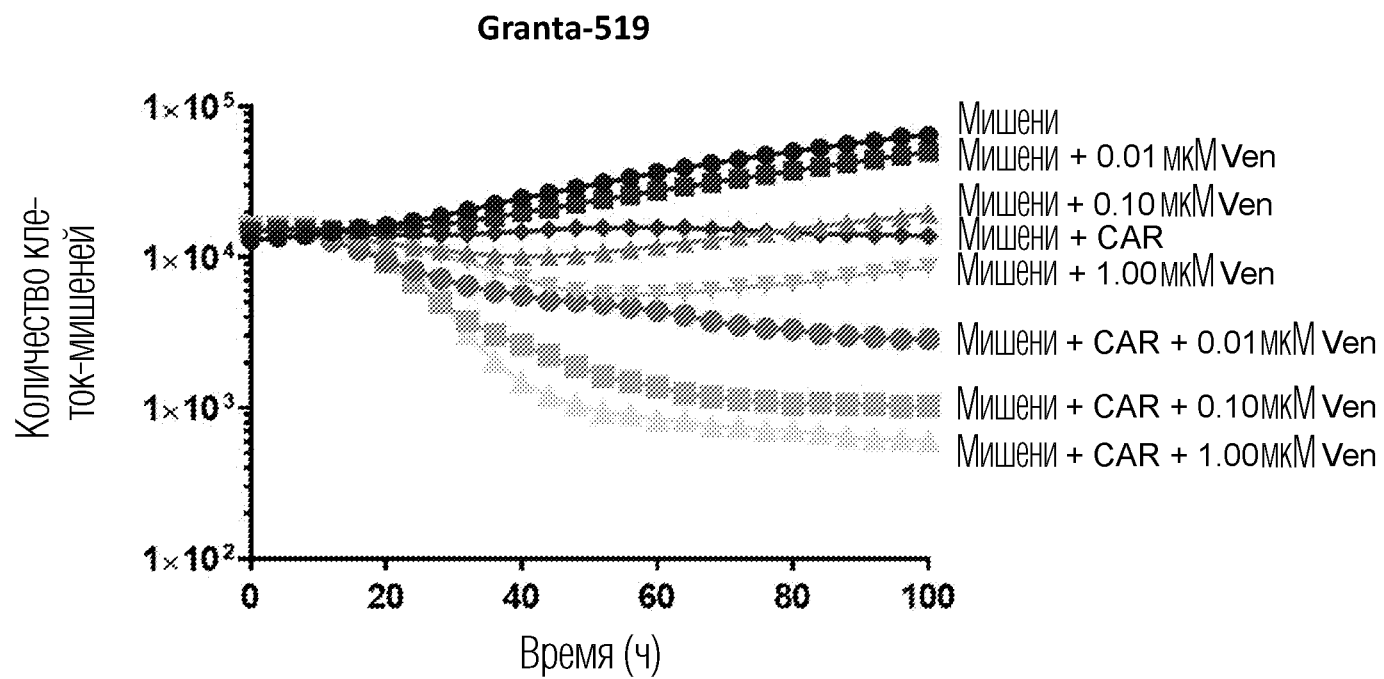


ФИГ. 4А

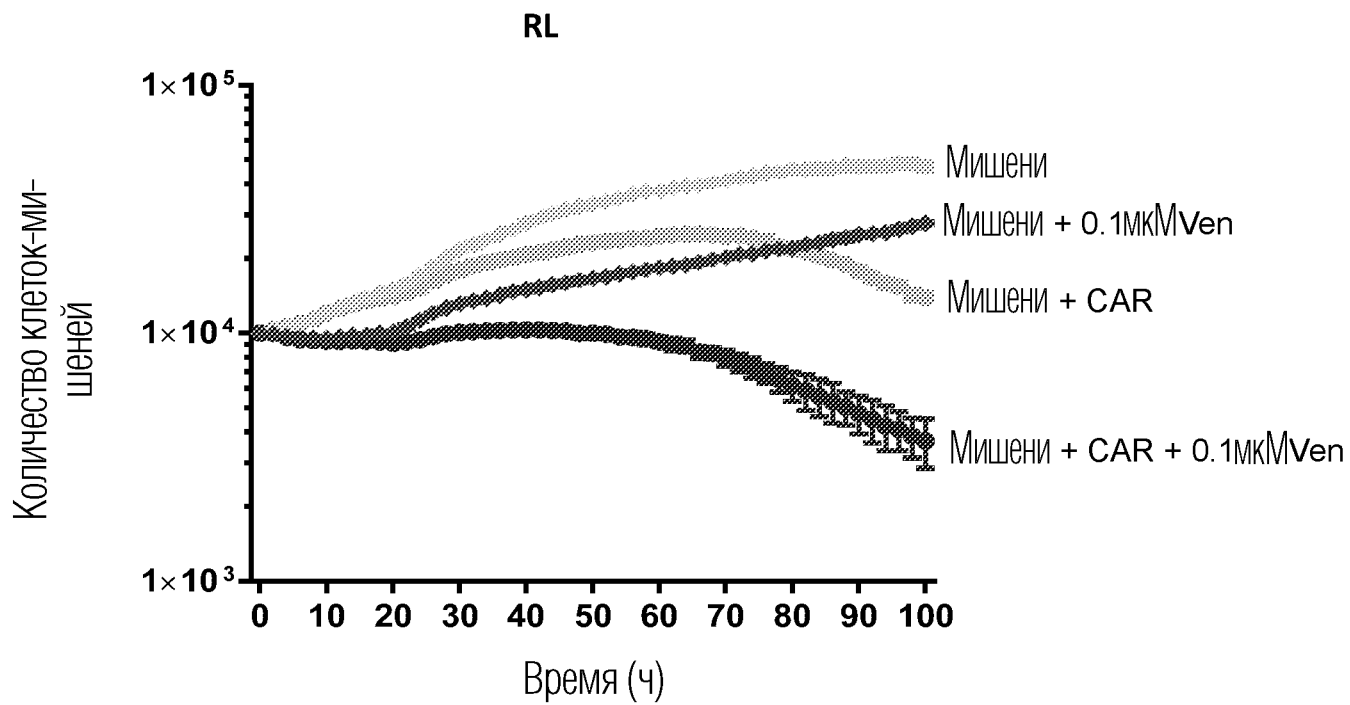


- | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| ◆ Мишени | ◆ Мишени + CAR |
| ■ Мишени + 20 нМ Венетоклакс | ■ Мишени + CAR + 20 нМ Венетоклакс |
| ▲ Мишени + 200 нМ Венетоклакс | ● Мишени + CAR + 200 нМ Венетоклакс |

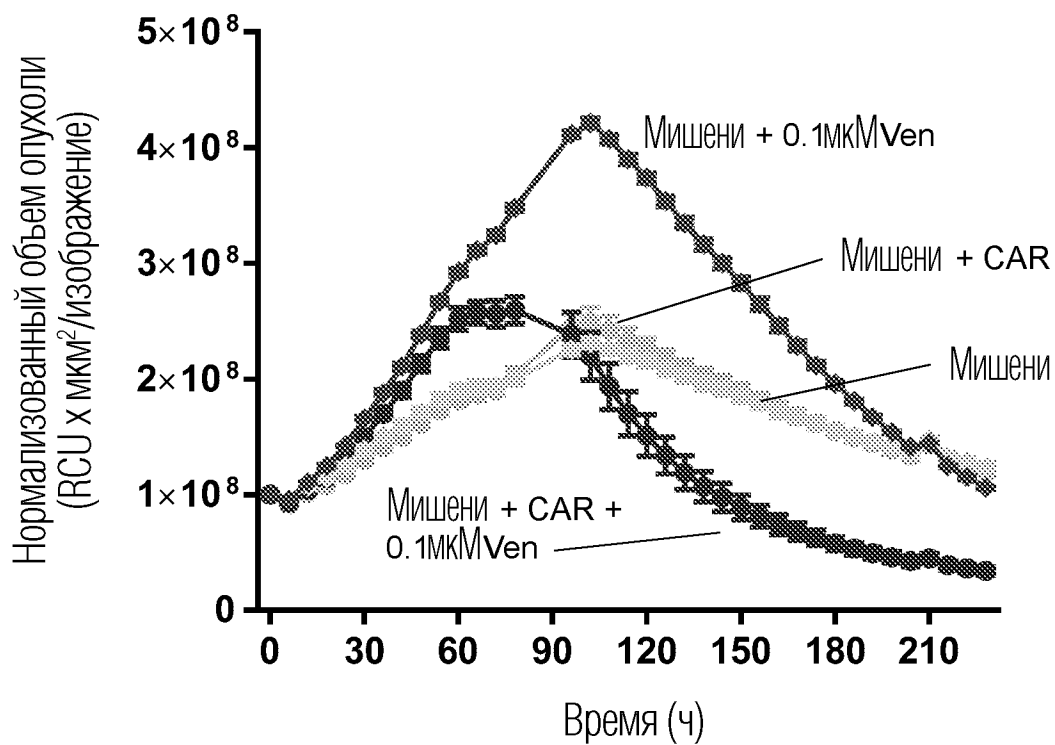
ФИГ. 4В



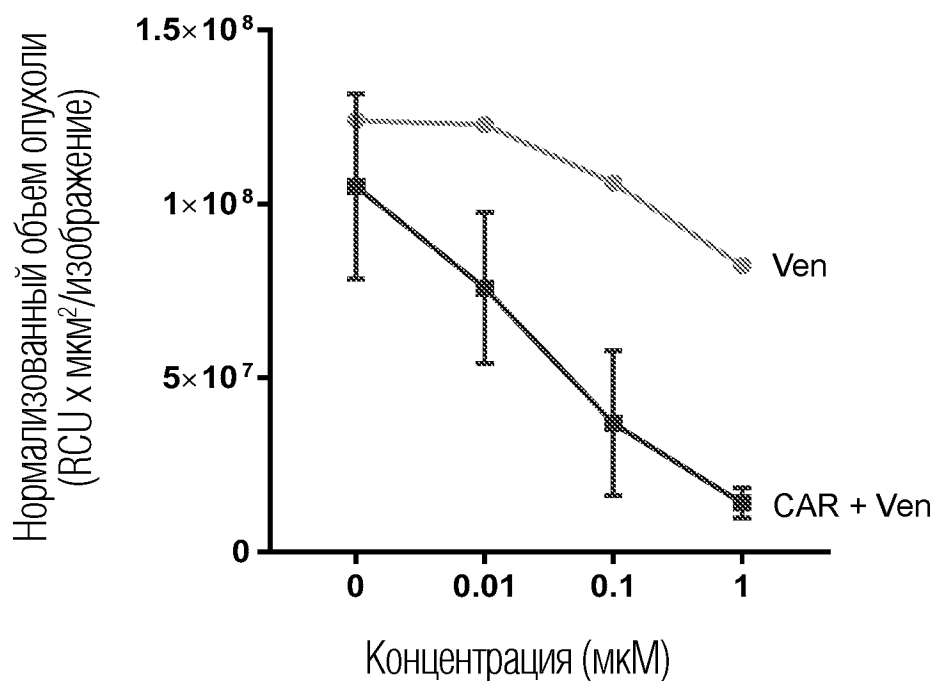
ФИГ. 5А



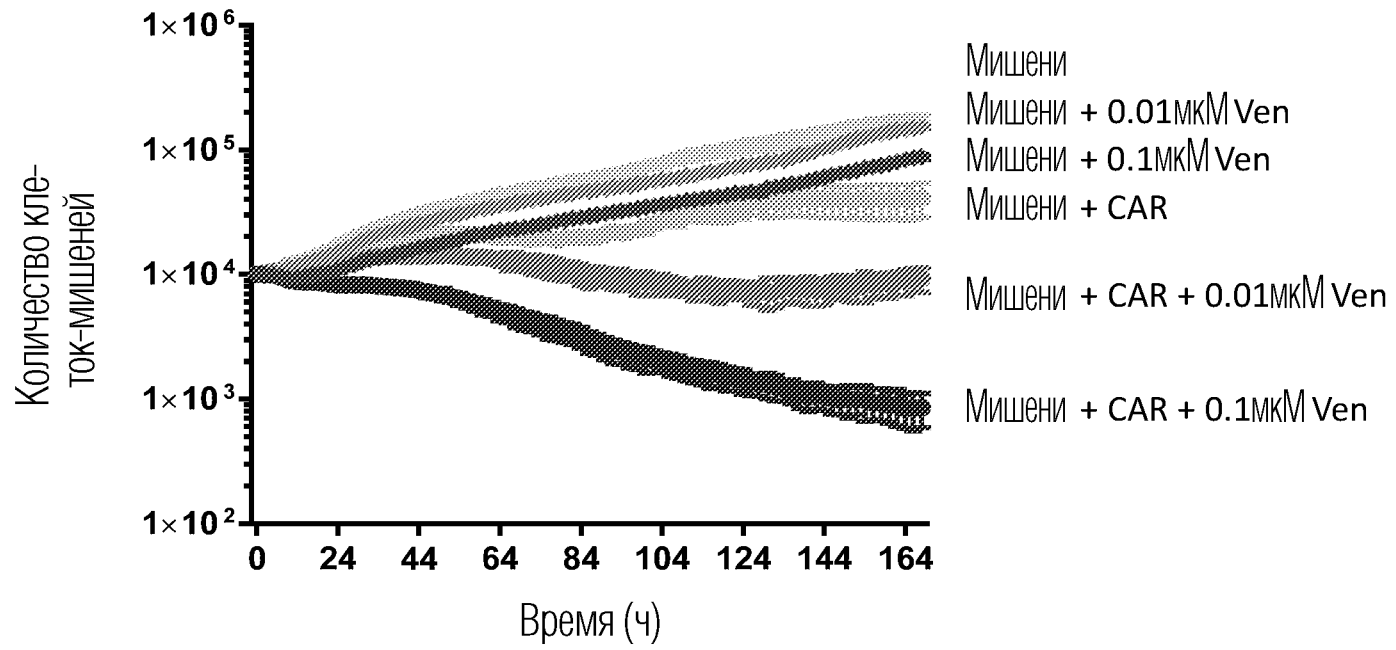
ФИГ. 5В



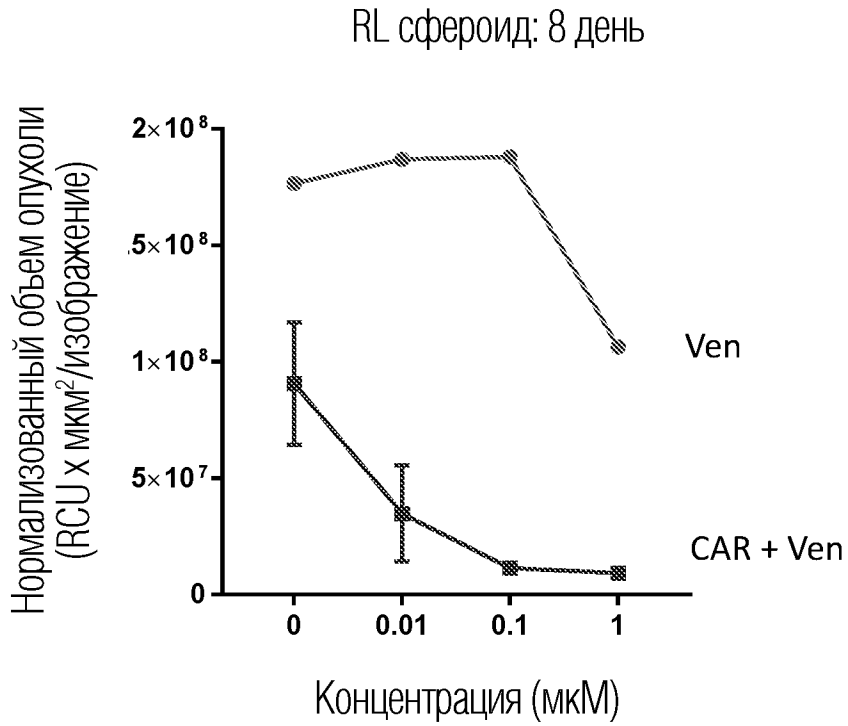
ФИГ. 5С



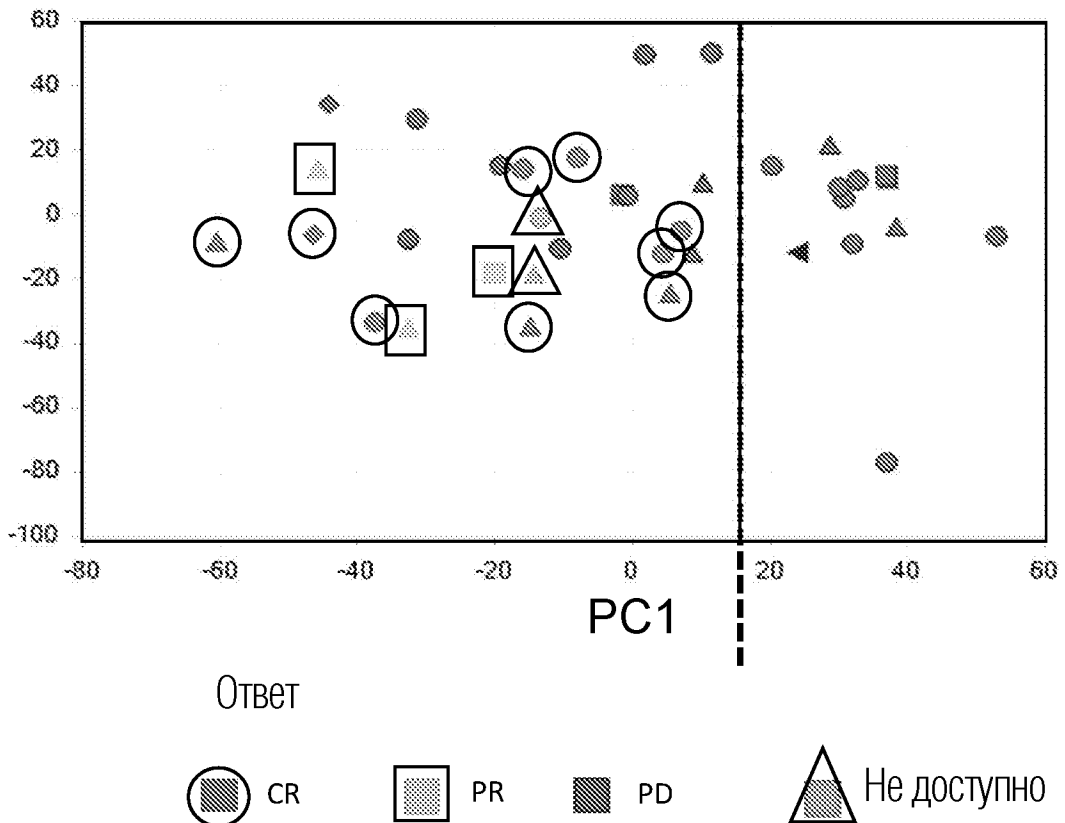
ФИГ. 6А



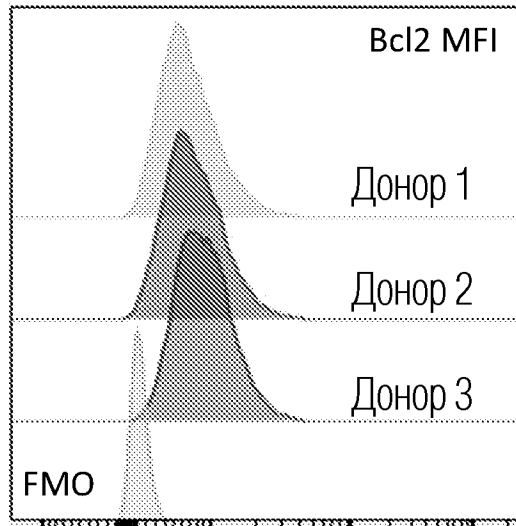
ФИГ. 6В



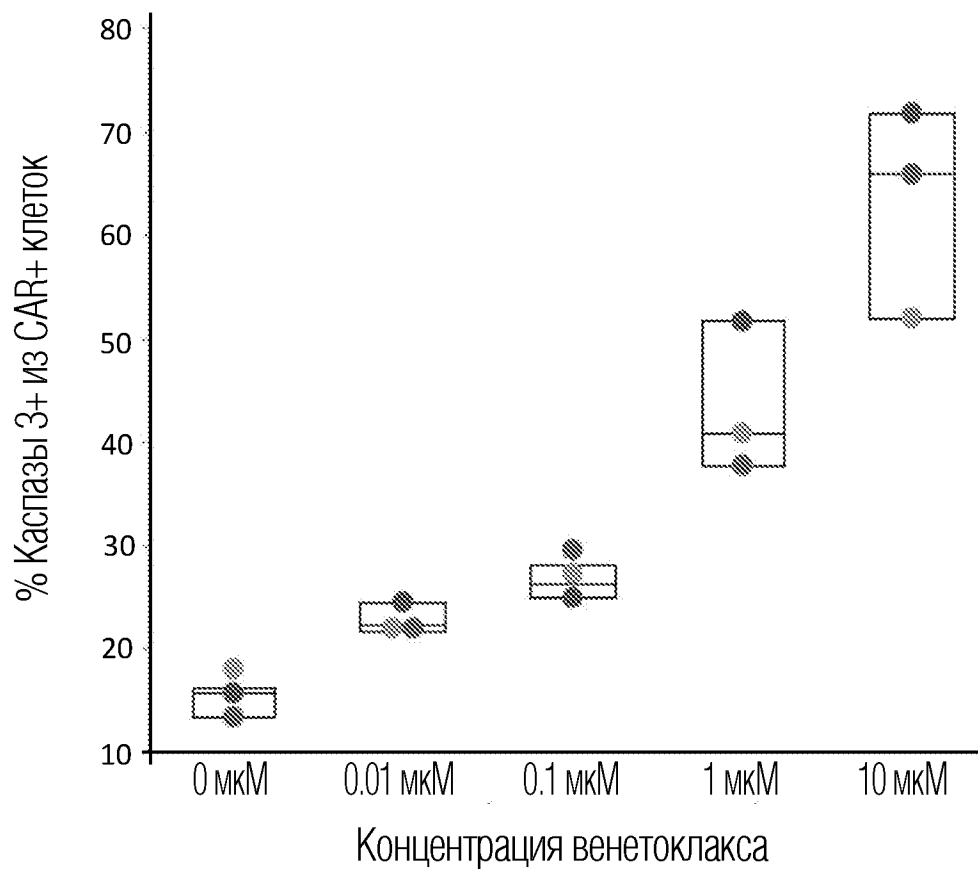
ФИГ. 7



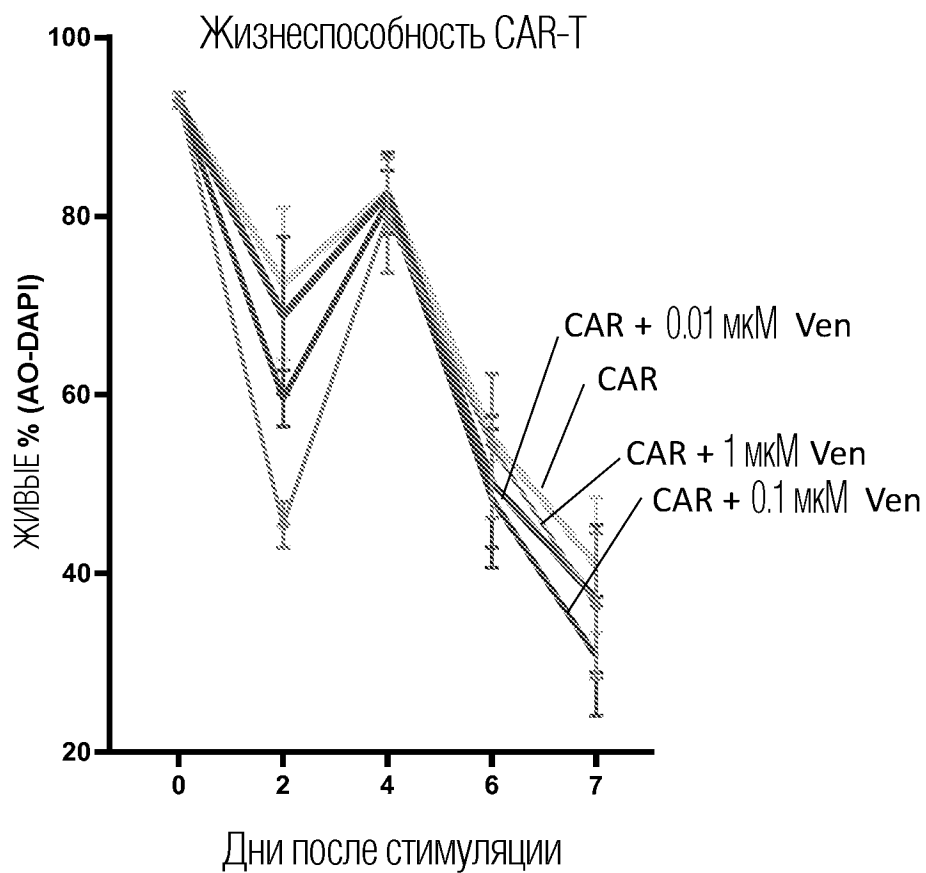
ФИГ. 8А



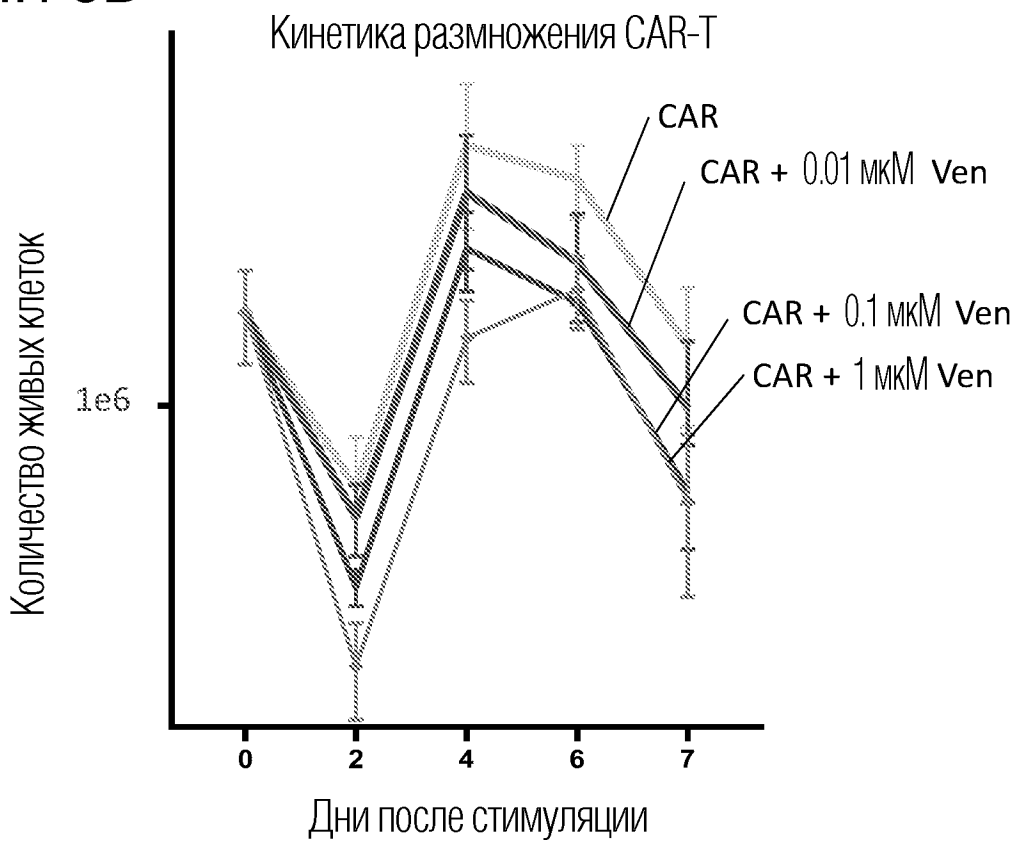
ФИГ. 8В



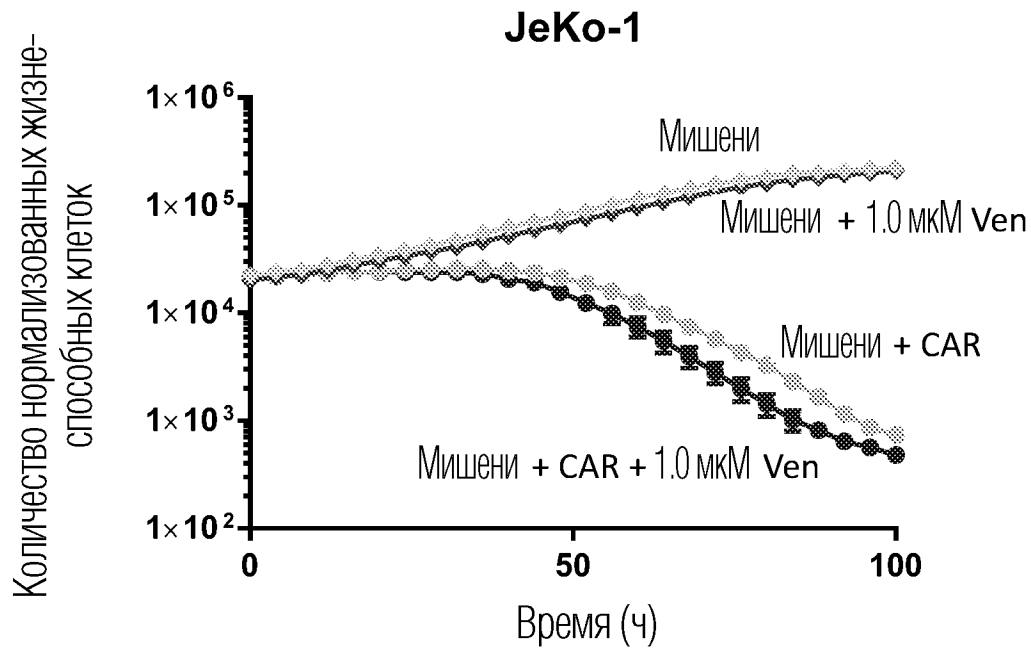
ФИГ. 8С



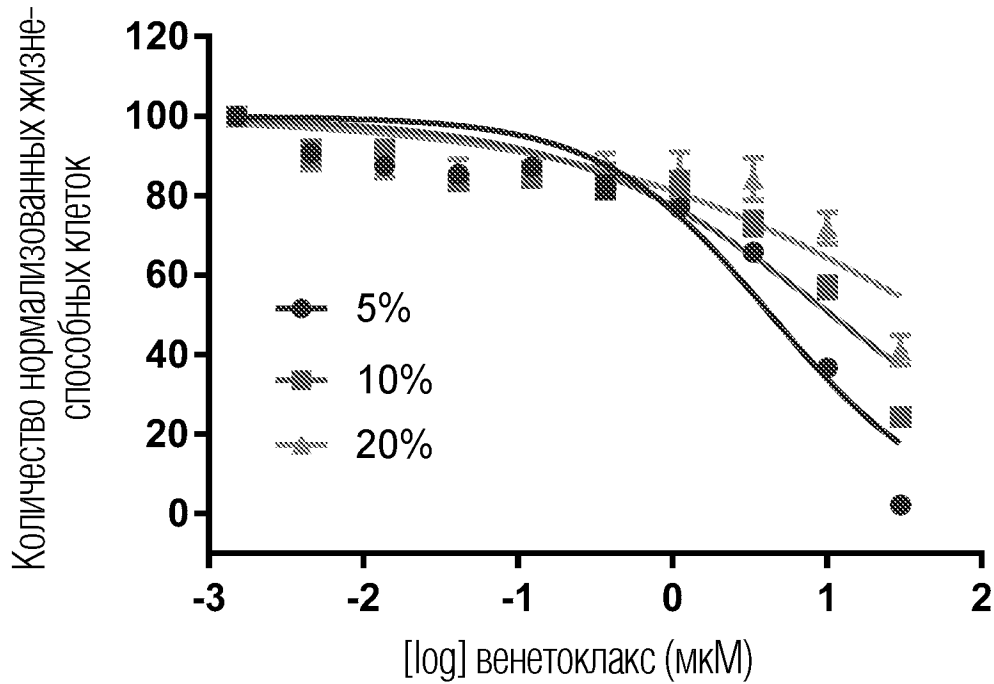
ФИГ. 8D



ФИГ. 9



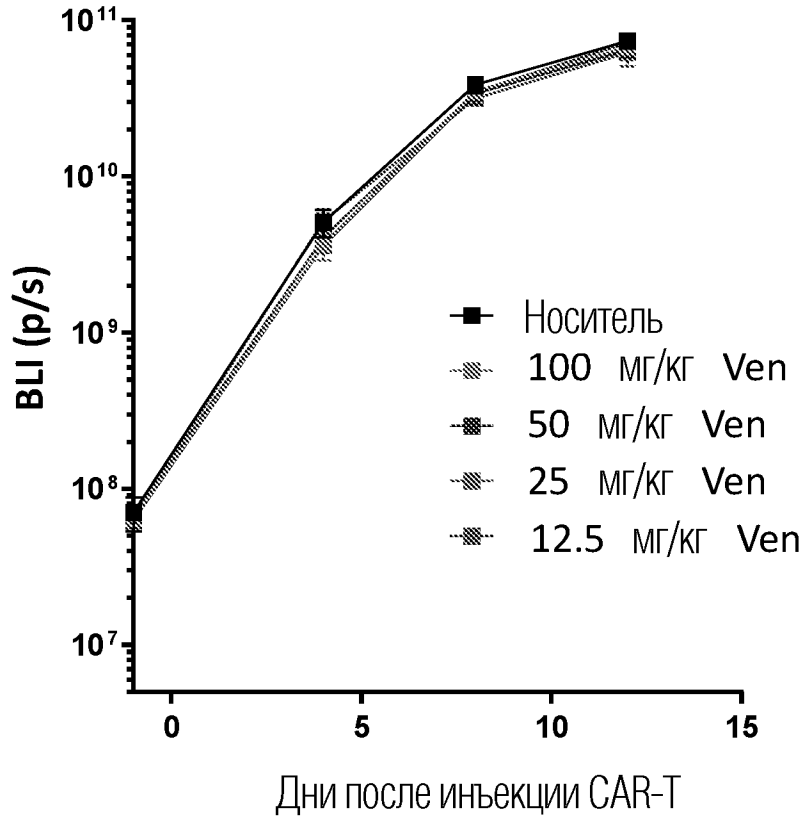
ФИГ. 10



	IC50	Значение R ²
5%	4.332 мкМ	0.8806
10%	10.72 мкМ	0.8088
20%	48.32 мкМ	0.5684

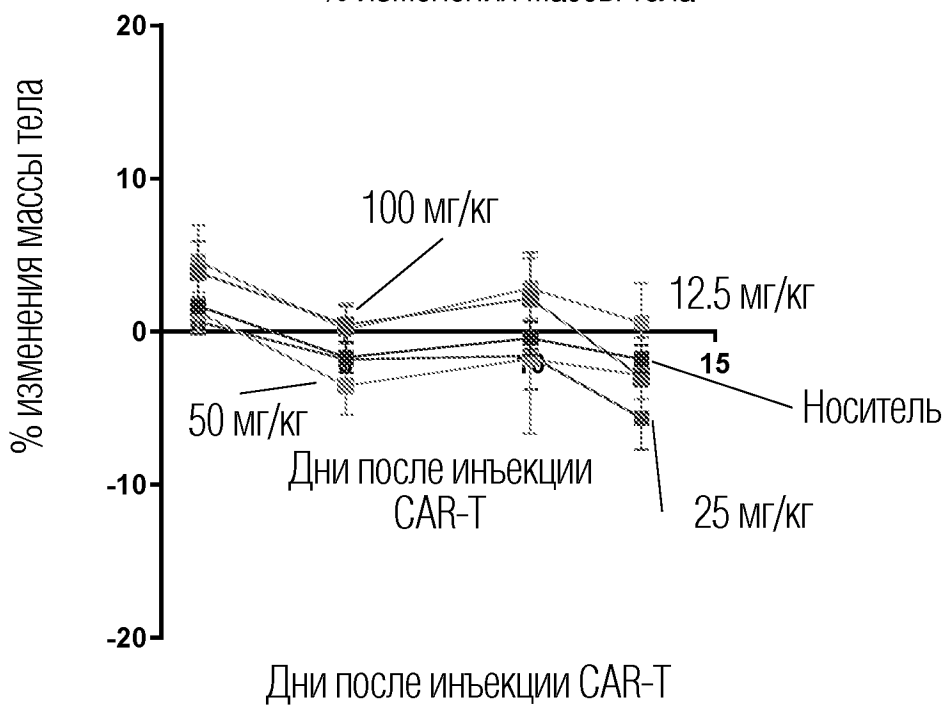
ФИГ. 11А

Масса опухоли, средняя для группы

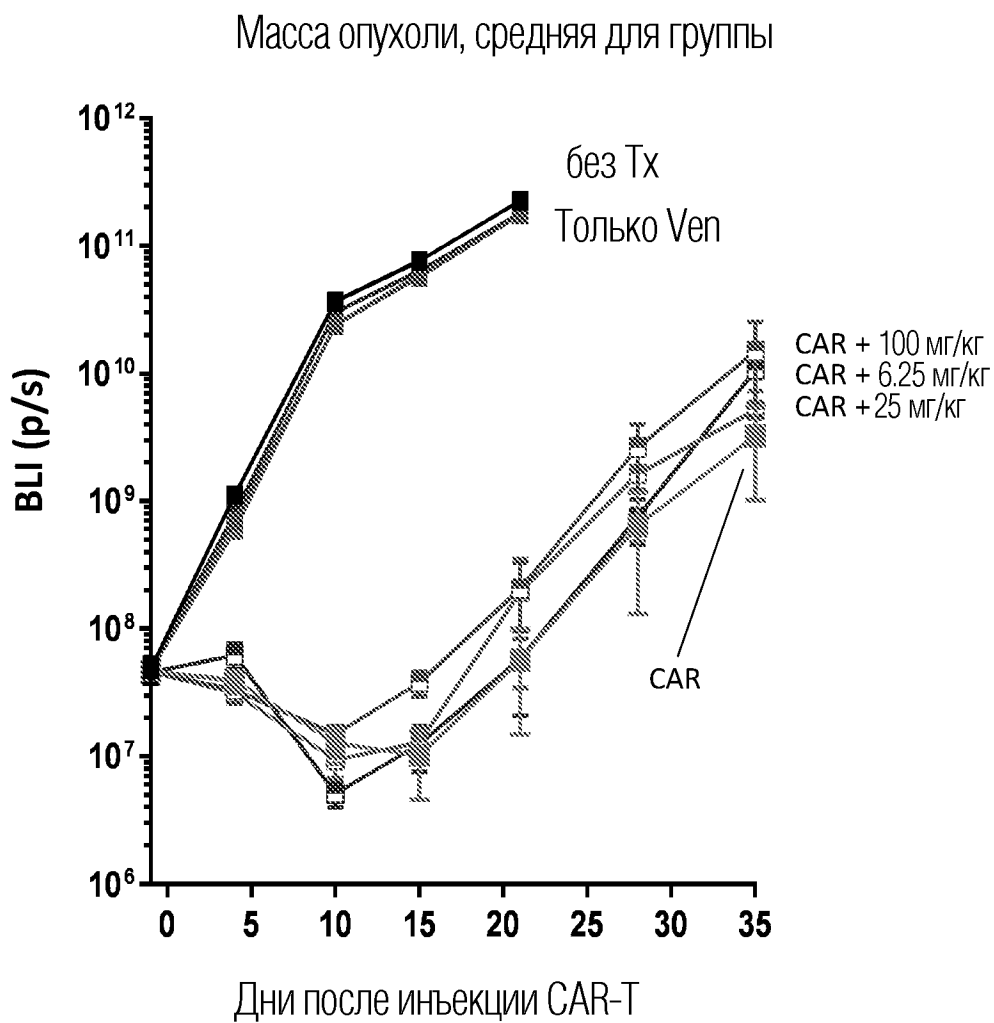


ФИГ. 11В

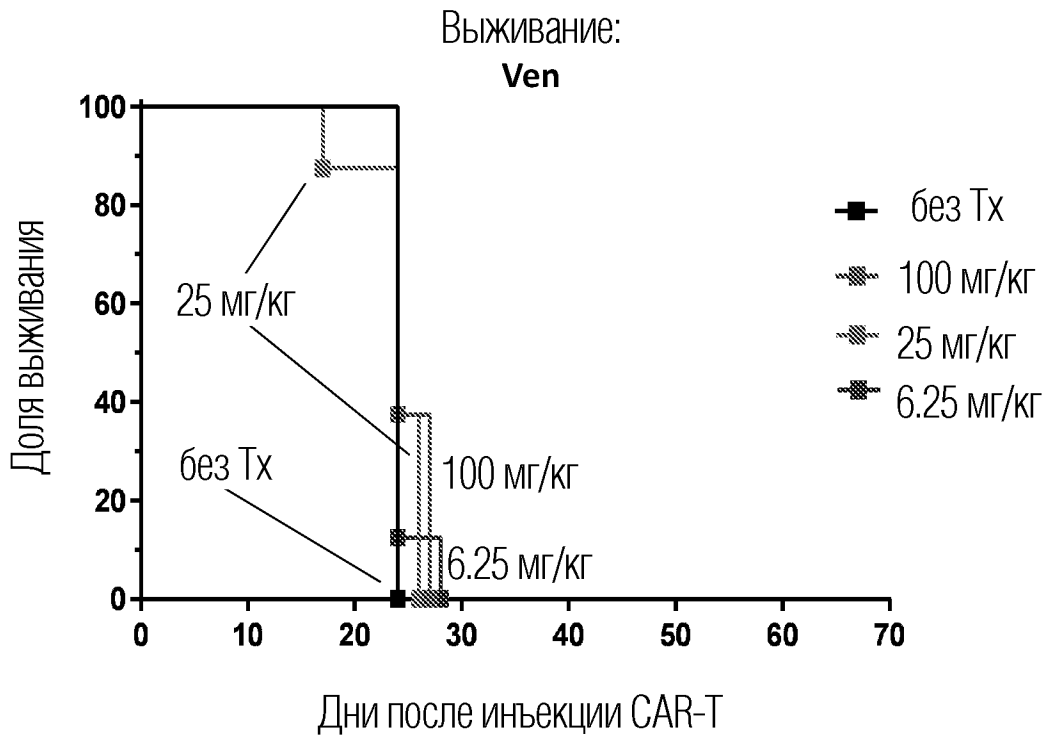
% изменения массы тела



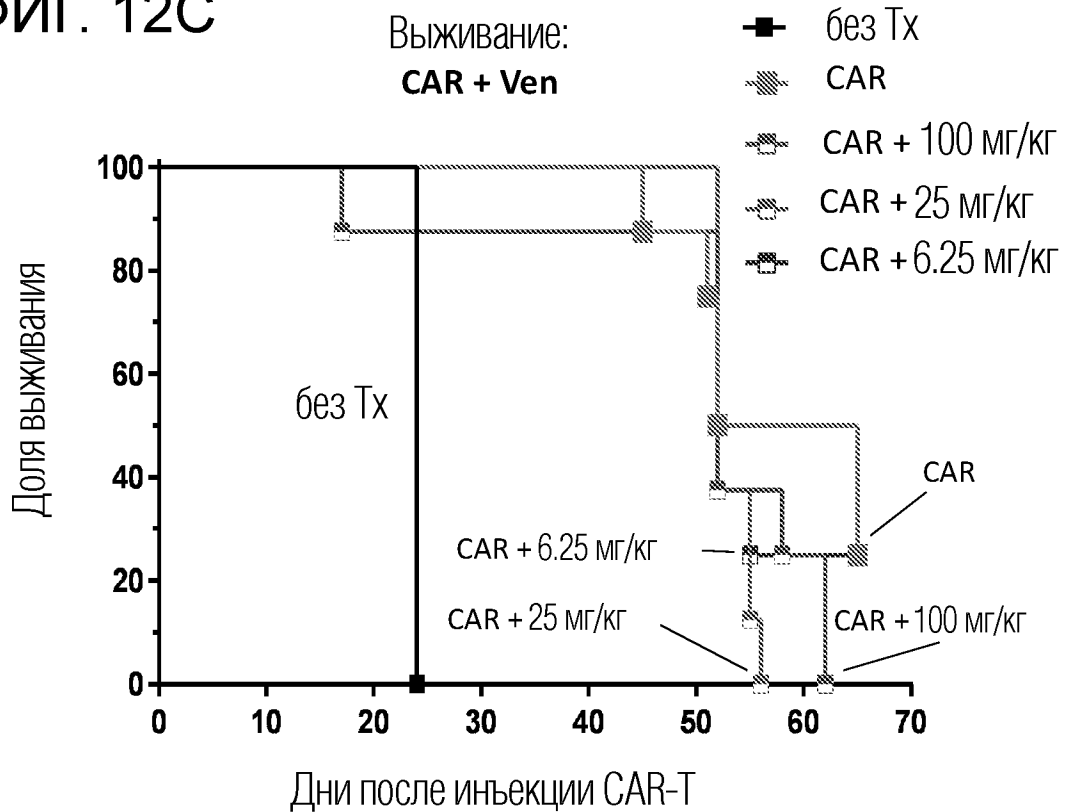
ФИГ. 12А



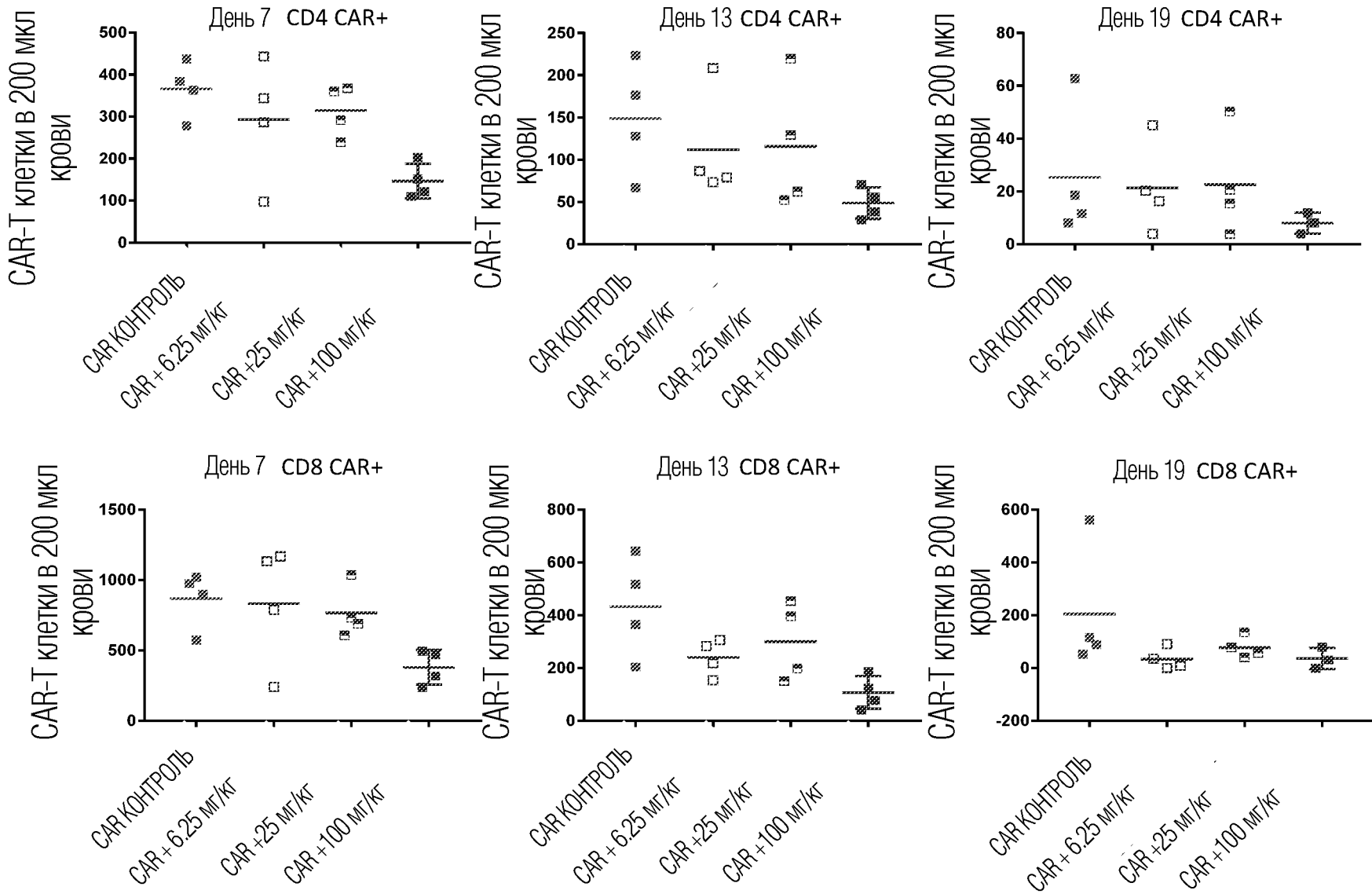
ФИГ. 12В



ФИГ. 12С

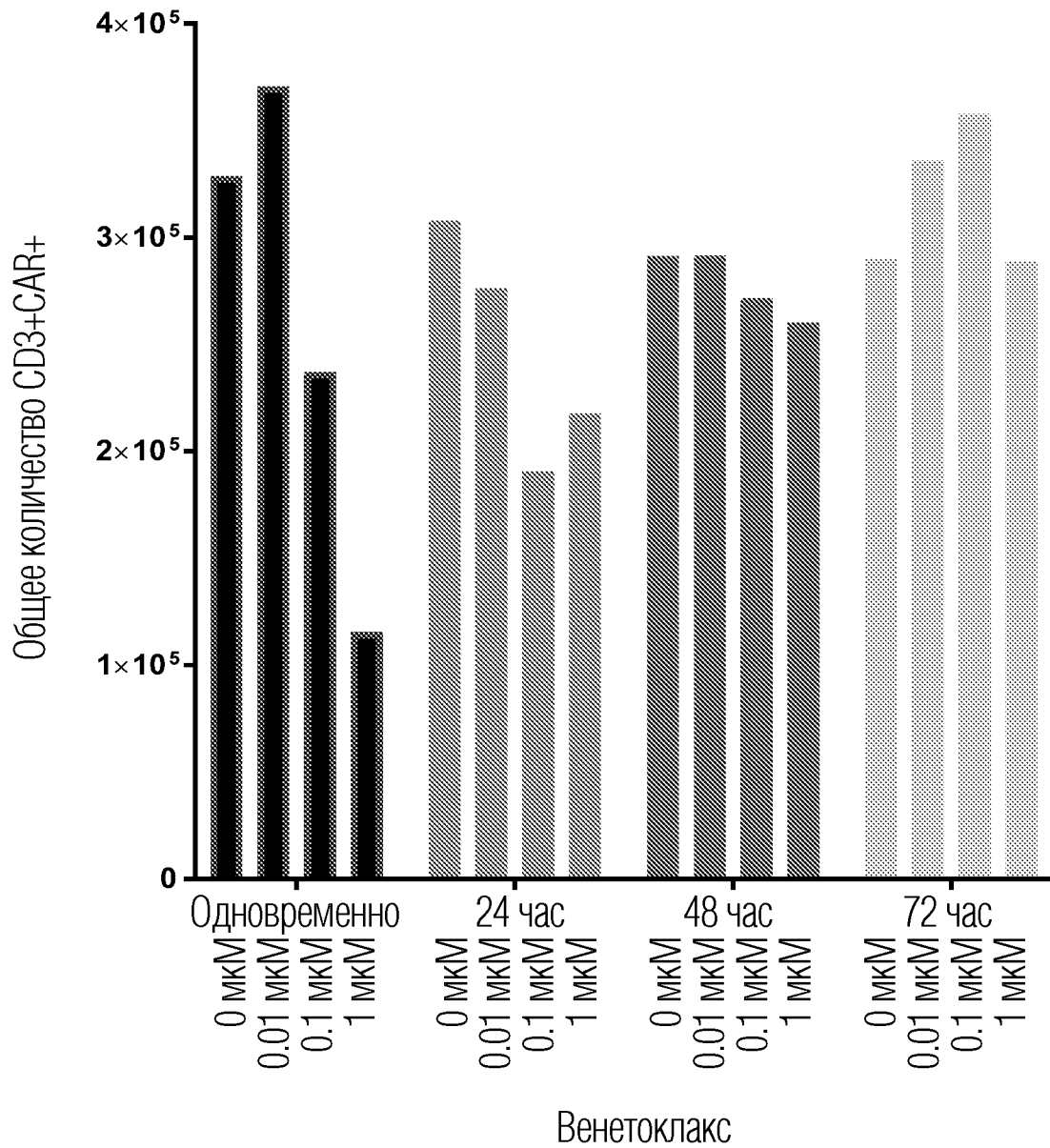


ФИГ. 13



ФИГ. 14А

Количества CD3CAR+ Т клеток: день+6



ФИГ. 14В

Уничтожение опухоли: день+6

