

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047040**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.28

(51) Int. Cl. *A61K 31/55* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202091145

(22) Дата подачи заявки
2018.11.06

(54) КОМБИНАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И ИНГИБИТОРА ГАММА-СЕКРЕТАЗЫ

(31) 62/582,308; 62/582,937; 62/665,450

(32) 2017.11.06; 2017.11.07; 2018.05.01

(33) US

(43) 2020.10.06

(86) PCT/US2018/059510

(87) WO 2019/090364 2019.05.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.;
ФРЕД ХАТЧИНСОН КЭНСЕР
СЕНТЕР (US)

(72) Изобретатель:
Грин Дэмиан Дж., Ридделл Стэнли Р.,
Воркс Мелисса (US)

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

(56) TYLER HILL ET AL. "Gamma secretase inhibition increases recognition of multiple myeloma by BCMA-specific chimeric antigen receptor modified T cells", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 5, no. S2, 1 November 2017 (2017-11-01), pages 5-6, XP055469477, DOI: 10.1186/s40425-017-0289-3, Abstract no. 010; page 5, right-hand column - page 6, left-hand column

US-A1-2013029972

WO-A1-2016164580

WO-A1-2018201056

WORCESTER S. "GSI inhibition may boost BCMA CAR T-cell therapy efficacy in myeloma", INTERNET CITATION, 27 November 2017 (2017-11-27), XP002782175, Retrieved from the Internet: URL:<https://www.mdedge.com/hematologynews/article/152733/multiple-myeloma/gsi-inhibition-may-boost-bcma-car-t-cell-therapy>, [retrieved on 2018-06-19], the whole document

(57) В рамках изобретения предусматриваются способы комбинированной терапии, вовлекающие проведение иммунотерапии, вовлекающей клеточную терапию, такую как терапия Т-клетками, и терапию ингибитором гамма-секретазы. Также предусматриваются способы модификации, получения или продуцирования клеток, композиций, содержащих клетки и/или ингибитор гамма-секретазы, и наборы и устройства, содержащие и предназначенные для использования, продуцирования и введения клеток и/или ингибитора гамма-секретазы, например, в соответствии с предусматриваемыми способами комбинированной терапии.

B1

047040

047040

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США 62/582308, под названием "COMBINATION OF A CELL THERAPY AND A GAMMA SECRETASE INHIBITOR", поданной 6 ноября 2017 года; предварительной патентной заявке США 62/582937 под названием "COMBINATION OF A CELL THERAPY AND A GAMMA SECRETASE INHIBITOR", поданной 7 ноября 2017 года; и предварительной патентной заявке США 62/665450 под названием "COMBINATION OF A CELL THERAPY AND A GAMMA SECRETASE INHIBITOR", поданной 1 мая 2018 года, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Включение списка последовательностей в качестве ссылки

Настоящая заявка подается вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в качестве файла под названием 735042014240SeqList.TXT, созданного 6 ноября 2018 года, который имеет размер 320126 байт. Информация списка последовательностей в электронном формате включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область изобретения

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам, композициям и применениям, вовлекающим иммунотерапию, такую как адоптивная клеточная терапия, например, терапия Т-клетками, и ингибитор гамма-секретазы. Предусматриваемые способы, композиции и применения включают способы, композиции и применения для комбинированной терапии, вовлекающей введение или применение ингибитора гамма-секретазы совместно с терапией Т-клетками, такой как терапия генетически модифицированными Т-клетками, вовлекающей клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором, такие как Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), такие как Т-клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), направленный против ВСМА. Также предусматриваются композиции, способы введения индивидуумам, изделия и наборы для применения в способах. В некоторых аспектах признаки способов и клеток обеспечивают увеличенную или улучшенную активность, эффективность, персистенцию, экспансию и/или пролиферацию Т-клеток для адоптивной клеточной терапии или эндогенных Т-клеток, привлекаемых с помощью иммунотерапевтических средств.

Уровень техники

Доступны различные стратегии иммунотерапии, например, введение модифицированных Т-клеток для адоптивной терапии. Например, доступны стратегии конструирования Т-клеток, экспрессирующих генетически сконструированные рецепторы антигенов, такие как CAR, и введения композиций, содержащих такие клетки, индивидуумам. Необходимы усовершенствованные стратегии для повышения эффективности клеток, например, повышения персистенции, активности и/или пролиферации клеток при введении индивидуумам. Предусматриваются способы, композиции, наборы и системы, которые удовлетворяют такие потребности.

Сущность изобретения

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы комбинированной терапии, вовлекающие проведение иммунотерапии, вовлекающую клеточную терапию, такую как терапия Т-клетками, и ингибитор гамма-секретазы. В некоторых аспектах предусматриваемые способы лечения индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, вовлекают проведение иммунотерапии или введение иммунотерапевтического средства, такого как композиция, включающая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), и введение ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия, такая как CAR-экспрессирующие Т-клетки, включает антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном созревания В-клеток (ВСМА), таким как поверхностный ВСМА. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выбор индивидуума для лечения, где индивидуум имеет низкую экспрессию поверхностного ВСМА на клетке (такой как опухолевая/злокачественная клетка). В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает рекомбинантный рецептор, такой как рецептор, который не связывается с ВСМА. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы препятствует внутримембранному расщеплению рецептора на клетке (такой как опухолевая/злокачественная клетка), где клеточная терапия специфически нацелена на рецептор. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия, главным образом, вовлекает введение ингибитора гамма-секретазы и проведение клеточной терапии, такой как терапия композицией, включающей клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), где введение ингибитора гамма-секретазы проводят после проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления эта терапия модулирует активность клеточной терапии.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА); и (b) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы, где связывание CAR с поверхностным ВСМА, или показатель, указывающий на

функцию или активность после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА. В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с поверхностным ВСМА, или показатель, указывающий на функцию или активность после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется, в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА), где связывание CAR с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе, где на момент начала проведения клеточной терапии индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение ингибитором гамма-секретазы.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, где на момент начала введения ингибитора индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА), где связывание CAR с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (a) выбор индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, где клетки злокачественной опухоли индивидуума (i) экспрессируют поверхностный CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматиков, или происходят из плазматиков, и (ii) имеют низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня; (b) проведение клеточной терапии у индивидуума, выбранного на (a), причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном созревания В-клеток (ВСМА); и (c) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (a) введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему злокачественную опухоль, причем указанного индивидуума отбирают по наличию плазматиков, имеющих низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня; и (b) проведение у индивидуума клеточной терапии для лечения злокачественной опухоли, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с антигеном созревания В-клеток (ВСМА).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, пороговый уровень экспрессии поверхностного ВСМА является более низким, чем средняя или срединная экспрессия или уровень поверхностного ВСМА на плазматитах у множества контрольных индивидуу-

мов, необязательно где контрольные индивидуумы представляют собой группу здоровых или нормальных индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, низкая экспрессия поверхностного ВСМА существует, когда менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазмацитов, или клеток с маркером или фенотипом плазмацитов, или злокачественных клеток, у индивидуума экспрессируют поверхностный ВСМА; или пороговый уровень поверхностного ВСМА представляет собой величину, соответствующую менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазмацитов, или клеток с маркером или фенотипом плазмацитов, или злокачественных клеток, у индивидуума, которые экспрессируют поверхностный ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, экспрессию поверхностного ВСМА определяют проточной цитометрией и/или способом иммуноанализа.

В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, связывание CAR с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, антигенсвязывающий домен не связывает растворимый ВСМА или связывает растворимый ВСМА с меньшей аффинностью, чем аффинность связывания указанного антигенсвязывающего домена с поверхностным ВСМА. В некоторых вариантах осуществления аффинность антигенсвязывающего домена с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА) по меньшей мере в 1 раз, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 раз превышает аффинность в отношении растворимого ВСМА.

В некоторых из приведенных вариантов осуществления CAR против ВСМА представляет собой CAR против ВСМА, как описано в настоящем описании. К предусматриваемому CAR против ВСМА для применения в способах и применениях, описанных в настоящем описании, относится CAR, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит область V_H , содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 24; и содержит область V_L , содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176, 177 и 175, соответственно, и область V_L , которая содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, 179 и 175, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную по-

следовательность SEQ ID NO: 180, 181 и 182, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления область V_H содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, и область V_L содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент одноцепочечного антитела, такой как scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 188, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления CAR против ВСМА имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ NO: 124, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления CAR против ВСМА имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ NO: 125 или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление ВСМА с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,35 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,35 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ, от до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,35 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,25 нМ до 0,35 нМ, от 0,35 нМ до 10 нМ, от 0,35 нМ до 5 нМ, от 0,35 нМ до 1 нМ, от 0,35 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ или от 5 нМ до 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление ВСМА с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) менее чем или приблизительно менее чем 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА); и (b) введение ингибитора гамма-секретазы.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия содержит дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА), где на момент начала проведения клеточной терапии индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение ингибитором гамма-секретазы.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, где на момент начала введения ингибитора индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, антиген-мишень выбран из карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, СЕА и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиально-

го гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и (b) после проведения (а) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, где на момент начала введения ингибитора индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой. В некоторых вариантах осуществления антигеном-мишенью является Muc1. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, антигеном-мишенью является BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA представляет собой поверхностный BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает, или способен ингибировать или снижать, расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из BCMA, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFNaR2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой снижается или ингибируется, включает Muc1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которых снижается или ингибируется, включает BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из BCMA, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFNaR2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP), ингибируется или снижается, или может ингибироваться или снижаться ингибитором гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которых снижается или ингибируется, включает Muc1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней,

расщепление которых снижается или ингибируется, включает ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) от 0,01 нМ до 1 мкМ, от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 1 мкМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 1 мкМ, от 0,25 нМ до 100 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 1 мкМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 мкМ, от 10 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 1 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) менее чем или приблизительно менее чем 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор, и пептидный ингибитор выбран из альдегидных производных пептидов, дифторкетонных производных, изостерных производных гидроксипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, и непептидный ингибитор представляет собой производное бензодиазепинов или производное сульфонамидов.

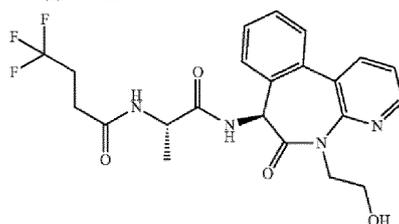
В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния или ингибитор не переходного состояния.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналя, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбикакло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]diazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Пе-лейциналя; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; MK-0752; MRK-003 (Merck); семагастата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (добензазепин), соединения E ([2S)-2-[(3,5-дифторфенил)ацетил]амино]-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамида], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:

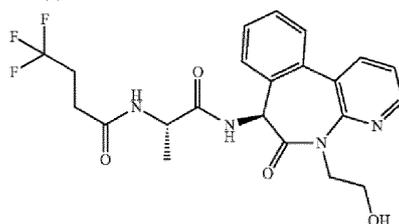
Соединение I



или его фармацевтически приемлемую соль гидрата.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и (b) введение индивидууму соединения структуры:

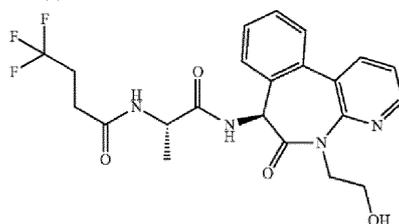
Соединение I



или его фармацевтически приемлемой соли гидрата.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где на момент начала проведения клеточной линии индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение соединением структуры:

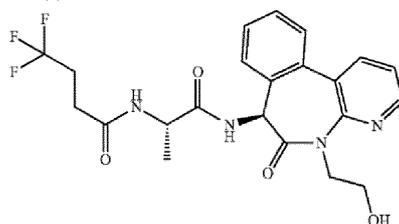
Соединение I



или его фармацевтически приемлемой солью гидрата.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: введение индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, соединения структуры:

Соединение I



или его фармацевтически приемлемой соли гидрата, где на момент начала введения индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, СЕА и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72,

B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой. В некоторых вариантах осуществления антигеном-мишенью является Muc1. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, антигеном-мишенью является ВСМА. В некоторых вариантах осуществления ВСМА представляет собой поверхностный ВСМА. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор не связывает растворимый ВСМА или связывает растворимый ВСМА с меньшей'affинностью, чем'affинность указанного рекомбинантного рецептора в отношении связывания поверхностного ВСМА. В некоторых вариантах осуществления'affинность антигенсвязывающего домена в отношении поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) по меньшей мере в 1 раз, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз или в 10 раз превышает'affинность в отношении растворимого ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, индивидуум имеет плазматиты, или злокачественные клетки, или клетки миеломы, или клетки, экспрессирующие маркеры плазматитов, которые экспрессируют поверхностный ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, индивидуума выбирают по наличию клеток, имеющих низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА); и/или индивидуума для проведения клеточной терапии и/или терапии ингибитором выбирают на основе наличия плазматитов, имеющих низкую экспрессию поверхностного ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, мишенью ингибитора гамма-секретазы является антиген-мишень и ингибитор гамма-секретазы ингибирует расщепление антигена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, введение ингибитора: снижает отщепление или освобождение ВСМА от клеток, необязательно плазматитов, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем отщепления или освобождения ВСМА из клеток индивидуума перед введением ингибитора; снижает уровень или количество ВСМА, выявляемого в сыворотке индивидуума более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем или количеством ВСМА в сыворотке индивидуума перед введением ингибитора; и/или повышает экспрессию поверхностного ВСМА на клетках, необязательно плазматитах, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем поверхностного ВСМА на клетках у индивидуума перед введением ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, введение ингибитора: снижает отщепление или освобождение мишени или антигена-мишени, необязательно ВСМА или Muc1, от клеток, необязательно плазматитов, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем отщепления или освобождения мишени или антигена-мишени из клеток индивидуума перед введением ингибитора; снижает уровень или количество мишени или антигена-мишени, необязательно ВСМА или Muc1, выявляемого в сыворотке индивидуума более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем или количеством мишени или антигена-мишени в сыворотке индивидуума перед введением ингибитора; и/или повышает экспрессию поверхностной мишени или антигена-мишени, необязательно ВСМА или Muc1, на клетках, необязательно плазматитах, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем поверхностной мишени или антигена-мишени на клетках у индивидуума перед введением ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, плазматитому, злокачественную опухоль, происходящую из плазматитов, и/или злокачественную опухоль, происходящую из В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор вводят перорально, подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор вводят по меньшей мере или вводят ровно шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, три раза в неделю, по меньшей

мере один раз в неделю или только один раз. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят три раза в неделю.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, введение ингибитора проводят в ходе курса лечения, который составляет по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или ровно 14 суток, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или ровно 21 суток, или по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или ровно 28 суток.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор вводят, или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве от 0,5 мг до 500 мг, от 0,5 мг до 250 мг, от 0,5 мг до 100 мг, от 0,5 мг до 50 мг, от 0,5 мг до 25 мг, от 0,5 мг до 10 мг, от 0,5 мг до 5,0 мг, от 0,5 мг до 2,5 мг, от 0,5 мг до 1,0 мг, от 1,0 мг до 500 мг, от 1,0 мг до 250 мг, от 1,0 мг до 100 мг, от 1,0 мг до 50 мг, от 1,0 мг до 25 мг, от 1,0 мг до 10 мг, от 1,0 мг до 5,0 мг, от 1,0 мг до 2,5 мг, от 2,5 мг до 500 мг, от 2,5 мг до 250 мг, от 2,5 мг до 100 мг, от 2,5 мг до 50 мг, от 2,5 мг до 25 мг, от 2,5 мг до 10 мг, от 2,5 мг до 5,0 мг, от 5,0 мг до 500 мг, от 5,0 мг до 250 мг, от 5,0 мг до 100 мг, от 5,0 мг до 50 мг, от 5,0 мг до 25 мг, от 5,0 мг до 10 мг, от 10 мг до 500 мг, от 10 мг до 250 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 50 мг, от 10 мг до 25 мг, от 25 мг до 500 мг, от 25 мг до 250 мг, от 25 мг до 100 мг, от 25 мг до 50 мг, от 50 мг до 500 мг, от 50 мг до 250 мг, от 50 мг до 100 мг, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 250 мг или от 250 мг до 500 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят, или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве которое составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно, или составляет или составляет приблизительно 0,5 мг, 1,0 мг, 2,5 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, 25 мг, 50 мг, 100 мг, 250 мг или 500 мг.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор представляет собой трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор, который необязательно представляет собой химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен цепи CD3-зета (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен, происходящий из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой домен, происходящий из 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ВСМА представляет собой ВСМА человека или антиген-мишень представляет собой антиген человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, генетически модифицированные клетки включают Т-клетки или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия представляет собой терапию Т-клетками и доза генетически модифицированных клеток включает Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются CD4+ и/или CD8+. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, клеточная терапия включает клетки, которые являются аутологичными для индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, клеточная терапия включает клетки, которые являются аллогенными для индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, клеточная терапия включает введение от или приблизительно от 1×10^5 до 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС); клеточная терапия включает введение от или приблизительно от 1×10^5 до 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; от или от приблизительно 5×10^5 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; или от или от приблизительно 1×10^6 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС, в каждом случае включительно.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, клеточная терапия включает введение не более 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС); не более $2,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих

РВМС; не более 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более $0,5 \times 10^7$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более 1×10^6 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более $0,5 \times 10^6$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, начало введения ингибитора происходит до, одновременно или после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят до начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора происходит в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч или 1 недели перед началом проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора происходит в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 недели, 14 суток, 21 суток, 28 суток или более после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят через вплоть до 7 суток, 14 суток, 21 суток, 28 суток или более после начала введения клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор вводят в момент времени, когда: число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума, снижается по сравнению с числом этих клеток у данного индивидуума в предыдущий момент времени после начала введения клеток; число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови, менее чем или приблизительно менее чем в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз или в 100 раз или менее меньше пикового или максимального числа клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума после начала введения клеток; и/или в момент времени после обнаружения пикового или максимального уровня клеток клеточной терапии в крови индивидуума число клеток или клеток, происходящих из этих клеток, обнаруживаемых в крови индивидуума, составляет менее 10%, менее 5%, менее 1% или менее 0,1% от общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) в крови индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, способ дополнительно включает проведение химиотерапии с лимфодеплецией перед проведением клеточной терапии и/или проведение индивидууму химиотерапии с лимфодеплецией перед введением клеток. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия с лимфодеплецией включает введение индивидууму флударабина и/или циклофосфида.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, способ дополнительно включает введение стероида, необязательно где стероид вводят до, одновременно и/или после начала введения ингибитора, необязательно где стероид вводят в ходе курса лечения ингибитором. В некоторых вариантах осуществления стероид представляет собой или включает дексаметазон.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, клеточная терапия демонстрирует увеличенную или пролонгированную экспансию и/или персистенцию у индивидуума по сравнению со способом, в котором клеточную терапию проводят у индивидуума в отсутствие ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, способ, таким образом, предупреждает, снижает или смягчает один или несколько симптомов или исходов заболевания или нарушения.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения, которые вовлекают: (а) проведение у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, введения терапевтического средства или терапии, которые нацелены на и являются специфическими в отношении антигена созревания В-клеток (BCMA); и (b) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы.

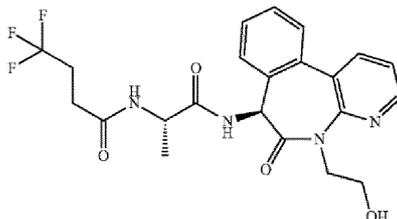
В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, терапевтическое средство или терапия представляет собой или включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство или терапия представляет собой биспецифическое антитело, которое дополнительно нацелено на или специфически связывается с Т-клеточным антигеном, необязательно CD2 или CD3. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство или терапия представляет собой биспецифическое антитело, которое дополнительно нацелено на второй антиген, необязательно где второй антиген выбран из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, с-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналя, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -

секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбикакло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Пе-лейцинала; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; МК-0752; MRK-003 (Merck); семагестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (добензазепин), соединения E ([[(2S)-2-[(3,5-дифторфенил)ацетил]амино]-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамид], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:

Соединение I



или его фармацевтически приемлемую соль гидрата.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются комбинации, которые включают: (а) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие химерный рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA); (б) ингибитор гамма-секретазы, где связывание CAR с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося BCMA, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против BCMA, в том же анализе.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление BCMA с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,35 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,35 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ, от до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,35 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,25 нМ до 0,35 нМ, от 0,35 нМ до 10 нМ, от 0,35 нМ до 5 нМ, от 0,35 нМ до 1 нМ, от 0,35 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ или от 5 нМ до 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление BCMA с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) менее чем или приблизительно менее чем 10 нМ,

5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются комбинации, которые включают: (а) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA); и (b) ингибитор гамма-секретазы.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются комбинации, которые включают: (а) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA); и (b) ингибитор гамма-секретазы, где связывание CAR с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося BCMA, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против BCMA, в том же анализе.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень выбран из карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ERHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов a, CD44v6, CD44v7/8, интегрин avb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишенью является Muc1.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает, или способен ингибировать или снижать, расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из BCMA, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFNaR2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которых снижается или ингибируется, включает Muc1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которых снижается или ингибируется, включает BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из BCMA, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFNaR2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP), ингибируется или снижается, или может ингибироваться или снижаться, посредством ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой ингибируется или снижается, включает Muc1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой снижается или ингибируется, включает BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) от 0,01 нМ до 1 мкМ, от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 1 мкМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 1 мкМ, от 0,25 нМ до 100 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до

1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 1 мкМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 мкМ, от 10 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) менее чем или приблизительно менее чем 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор, и пептидный ингибитор выбран из альдегидных производных пептидов, дифторкетонных производных, изостерных производных гидроксизетилдипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, и непептидный ингибитор представляет собой производное бензодиазепинов или производное сульфонамидов.

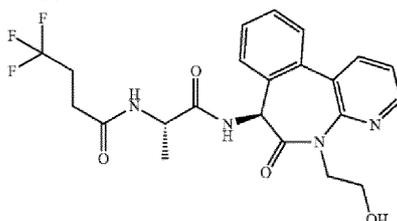
В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния или ингибитор не переходного состояния.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналя, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбисцикло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), ментилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил} карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-дибензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Ile-лейциналя; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; МК-0752; MRK-003 (Merck); семагацестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (дизбензазепин), соединения E ([[(2S)-2-[(3,5-дифторфенил)ацетил]амино]-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамид], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-[4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил]этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино)этил]-5-фторфенил]бутановая кислота).

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:

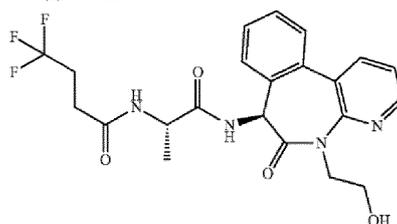
Соединение I



или его фармацевтически приемлемую соль гидрата.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются комбинации, которые включают: (а) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; и (b) соединение структуры:

Соединение I



или фармацевтически приемлемую соль гидрата.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью ассоциированным с заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, СЕА и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов a, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой. В некоторых вариантах осуществления антигеном-мишенью является Muc1.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, антигеном-мишенью является BCMA. В некоторых вариантах осуществления BCMA представляет собой поверхностный BCMA. В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося BCMA, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против BCMA, в том же анализе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор не связывает растворимый BCMA или связывается с растворимым BCMA с аффинностью, которая является более низкой, чем аффинность связывания указанного рекомбинантного рецептора с поверхностным BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор представляет собой трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор, который необязательно представляет собой химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает внутриклеточный домен цепи CD3-зета (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен, происходящий из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой домен, происходящий из 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, BCMA представляет собой BCMA человека или антиген-мишень представляет собой антиген человека.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, генетически модифицированные клетки включают Т-клетки или НК-клетки. В некоторых вариантах

осуществления генетически модифицированные клетки включают Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются CD4+ и/или CD8+. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, генетически модифицированные клетки составляют в качестве фармацевтической композиции для введения индивидууму, необязательно где клетки составляют для введения в одной или нескольких единичных дозах для лечения заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления любой из комбинаций, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы составляют в качестве фармацевтической композиции для введения индивидууму, необязательно где ингибитор гамма-секретазы составляют для введения в одной или нескольких единичных дозах.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются наборы, которые содержат: комбинацию согласно любому из пп.99-139 формулы изобретения и инструкции по введению компонентов комбинации индивидууму, имеющему заболевание или нарушение.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются наборы, которые содержат: (а) реагент для детекции экспрессии антигена созревания В-клеток (BCMA) на поверхности клетки; (b) ингибитор гамма-секретазы, необязательно составленный для введения в одной или нескольких единичных дозах; и (с) инструкции по введению ингибитора индивидууму, исходя из результатов применения реагента для детекции BCMA на поверхности плазматиков у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано введение ингибитора индивидууму, если плазматик имеет низкую экспрессию поверхностного BCMA и/или уровень экспрессии поверхностного BCMA ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень экспрессии поверхностного BCMA является более низким, чем средняя или срединная экспрессия или уровень поверхностного BCMA на плазматиках у множества контрольных индивидуумов, необязательно где контрольные индивидуумы представляют собой группы здоровых или нормальных индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия поверхностного BCMA существует, когда менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазматиков, или клеток с маркером плазматиков или фенотипом, или злокачественных клеток, у индивидуума экспрессируют поверхностный BCMA; или пороговый уровень поверхностного BCMA представляет собой величину, соответствующую менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазматиков, или клеток с маркером плазматиков или фенотипом, или злокачественных клеток, у индивидуума, которые экспрессируют поверхностный BCMA.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, наборы дополнительно содержат: генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, необязательно где генетически модифицированные клетки составляют для введения одной или нескольких единичных доз индивидууму, имеющему заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано введение ингибитора гамма-секретазы, или его одной или нескольких единичных доз, индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, до, одновременно или после начала введения дозы генетически модифицированных клеток индивидууму, необязательно где генетически модифицированные клетки составляют для введения одной или нескольких единичных доз индивидууму, имеющему заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях описано введение ингибитора гамма-секретазы, или его одной или нескольких единичных доз, индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, до начала введения дозы генетически модифицированных клеток индивидууму. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях описано введение ингибитора в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч или 1 недели перед началом проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях описано введение ингибитора гамма-секретазы, или его одной или нескольких единичных доз, индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, после начала введения дозы генетически модифицированных клеток индивидууму.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются наборы, которые содержат: (а) ингибитор гамма-секретазы, необязательно где ингибитор гамма-секретазы составляют в виде одной или нескольких единичных доз; и (b) инструкции по введению ингибитора гамма-секретазы индивидууму после начала проведения клеточной терапии индивидууму, причем клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются наборы, которые содержат: (а) ингибитор гамма-секретазы, необязательно где ингибитор гамма-секретазы составлен в виде одной или нескольких единичных доз; и (b) инструкции по введению ингибитора гамма-секретазы индивидууму после начала проведения клеточной терапии у индивидуума, где клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, содержащий химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA), где связывание CAR с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося BCMA, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против BCMA, в том же анализе.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, начало введения ингибитора находится в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 недели, 14 недель, 21 суток, 28 суток или более после начала введения дозы генетически модифицированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано, что ингибитор предназначен для введения в момент времени, когда: число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума, снижается по сравнению с числом этих клеток у этого индивидуума в предыдущий момент времени после начала введения клеток; число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови, менее чем или приблизительно менее чем в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз или в 100 раз или менее меньше пикового или максимального числа клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума после начала введения клеток; и/или в момент времени после обнаружения пикового или максимального уровня клеток клеточной терапии в крови индивидуума число клеток или клеток, происходящих из этих клеток, обнаруживаемых в крови индивидуума составляет менее 10%, менее 5%, менее 1% или менее 0,1% от общих мононуклеарных клеток периферической крови (ПВМС) в крови индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано, что ингибитор предназначен для введения через вплоть до 7 суток, 14 суток, 21 суток, 28 суток или более после начала введения клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолатный белок (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин avb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой. В некоторых вариантах осуществления антигеном-мишенью является Muc1, необязательно Muc1 человека. В некоторых вариантах осуществления любого варианта осуществления антиген-мишень представляет собой антиген человека.

В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой BCMA, необязательно BCMA человека. В некоторых вариантах осуществления связывание CAR с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или

количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор не связывает растворимый ВСМА или связывает растворимый ВСМА с более низкой аффинностью, чем связывание указанного рекомбинантного рецептора с поверхностным ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, рекомбинантный рецептор представляет собой трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор, который необязательно представляет собой химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен, происходящий из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область представляет собой домен, происходящий из 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, генетически модифицированные клетки включают Т-клетки или NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки включают Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются CD4⁺ и/или CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает, или способен ингибировать или снижать расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из ВСМА, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α 2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP). В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой ингибируется или снижается, включает Muc1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой снижается или ингибируется, включает ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из ВСМА, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α 2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP), ингибируется или снижается, или может ингибироваться или снижаться, посредством ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой ингибируется или снижается, включает Muc1. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мишеней, расщепление которой снижается или ингибируется, включает ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) от 0,01 нМ до 1 мкМ, от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 1 мкМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 1 мкМ, от 0,25 нМ до 100 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 1 мкМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 мкМ, от 10 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 1 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) менее чем или приблизительно менее чем 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор, и пептидный ингибитор выбран из альдегидных производных пептидов, дифторкетонных производ-

ных, изостерных производных гидроксипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, и непептидный ингибитор представляет собой производное бензодиазепинов или производное сульфонамидов.

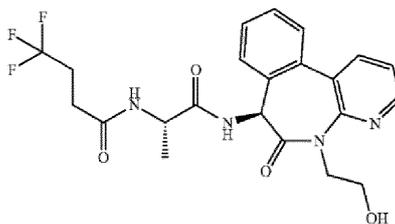
В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния или ингибитор не переходного состояния.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейцина, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланина; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланина; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбисцикло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминозой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]диазепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S, S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]диазепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Ile-лейцина; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; MK-0752; MRK-003 (Merck); семагестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (добензазепин), соединения E ([2S)-2-[(3,5-дифторфенил)ацетил]амино]-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамид], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-[4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил]этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино]этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:

Соединение I



или фармацевтически приемлемую соль гидрата.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано введение дозы генетически модифицированных клеток индивидууму, имеющему заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой B-клеточную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, плазмацитому, злокачественную опухоль, происходящую из плазмацитов, и/или злокачественную опухоль, происходящую из B-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, доза включает от или от приблизительно 1×10^5 до 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих T-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС); клеточная терапия включает введение от или приблизительно от 1×10^5 до 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих T-клеток или общих РВМС; от или от приблизительно 5×10^5 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих T-клеток или общих РВМС; или от

или от приблизительно 1×10^6 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС, в каждом случае включительно; необязательно где в инструкциях описано введение одной или множества единичных доз, включающих данную дозу клеток и/или объем, соответствующий такой одной или множеству единичных доз, включающих данную дозу клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, доза включает не более 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС); не более $2,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более $0,5 \times 10^7$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более 1×10^6 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; не более $0,5 \times 10^6$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих РВМС; необязательно где инструкциях описано введение одной или множества единичных доз, включающих данную дозу клеток, и/или объема, соответствующего такой одной или множеству единичных доз, включающих данную дозу клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано введение ингибитора перорально, подкожно или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях описано введение ингибитора перорально.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано, что ингибитор следует вводить по меньшей мере шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, три раза в неделю, по меньшей мере один раз в неделю или только один раз. В некоторых вариантах осуществления в инструкциях описано, что ингибитор вводят три раза в неделю.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано, что введение ингибитора следует проводить в ходе курса лечения, который составляет по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 14 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 21 сутки или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 28 суток.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано, что ингибитор вводят или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве от 0,5 мг до 500 мг, от 0,5 мг до 250 мг, от 0,5 мг до 100 мг, от 0,5 мг до 50 мг, от 0,5 мг до 25 мг, от 0,5 мг до 10 мг, от 0,5 мг до 5,0 мг, от 0,5 мг до 2,5 мг, от 0,5 мг до 1,0 мг, от 1,0 мг до 500 мг, от 1,0 мг до 250 мг, от 1,0 мг до 100 мг, от 1,0 мг до 50 мг, от 1,0 мг до 25 мг, от 1,0 мг до 10 мг, от 1,0 мг до 5,0 мг, от 1,0 мг до 2,5 мг, от 2,5 мг до 500 мг, от 2,5 мг до 250 мг, от 2,5 мг до 100 мг, от 2,5 мг до 50 мг, от 2,5 мг до 25 мг, от 2,5 мг до 10 мг, от 2,5 мг до 5,0 мг, от 5,0 мг до 500 мг, от 5,0 мг до 250 мг, от 5,0 мг до 100 мг, от 5,0 мг до 50 мг, от 5,0 мг до 25 мг, от 5,0 мг до 10 мг, от 10 мг до 500 мг, от 10 мг до 250 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 50 мг, от 10 мг до 25 мг, от 25 мг до 500 мг, от 25 мг до 250 мг, от 25 мг до 100 мг, от 25 мг до 50 мг, от 50 мг до 500 мг, от 50 мг до 250 мг, от 50 мг до 100 мг, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 250 мг или от 250 мг до 500 мг.

В некоторых вариантах осуществления любого из наборов, описанных в настоящем описании, в инструкциях описано, что ингибитор вводят или каждое введение ингибитора независимо проводят в количестве, которое составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно, или составляет или составляет приблизительно 0,5 мг, 1,0 мг, 2,5 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, 25 мг, 50 мг, 100 мг, 250 мг или 500 мг.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен уровень экспрессии поверхностного антигена созревания В-клеток (BCMA) на клетках ОРМ2, ММ1 или РРМ1-8826, сокультивированных с различными концентрациями репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478), после сокультивирования в течение 24 ч. Планка около оси Х указывает на оцененную C_{max} и C_{min} для ингибитора.

На фиг. 2А и фиг. 2В представлен процентный лизис (% уничтожение) клеток ОРМ2 (фиг. 2А) или клеток РРМ1-8226 (фиг. 2В), сокультивированных с Т-клетками, экспрессирующими CAR против BCMA, в присутствии или в отсутствие репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478) после сокультивирования в течение приблизительно 150 ч. На фиг. 2С представлен процентный лизис (% уничтожение) клеток ОРМ2, сокультивированных с Т-клетками, экспрессирующими CAR против BCMA, в присутствии или в отсутствие репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478). Планка вблизи оси Х указывает на оцененную C_{max} и C_{min} для ингибитора.

На фиг. 3А-3Д представлено продуцирование IFN-гамма и IL-2 в супернатанте Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA, сокультивированных с клетками ОРМ2 (фиг. 3А и 3С) или РРМ1-8226 (фиг. 3В и 3Д) в присутствии или в отсутствие репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478) после сокультивирования в течение 24 ч. На фиг. 3Е представлено продуцирование IFN-гамма в супернатанте Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA, сокультивированных с клетками

OPM2 и различными концентрациями репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478). Планка вблизи оси X указывает на оцененную C_{max} и C_{min} для ингибитора.

На фиг. 4А и 4В представлено количество Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA, первоначально полученных от здорового донора (фиг. 4А) и донора с множественной миеломой (фиг. 4В) после множества раундов стимуляции клетками MM1S на протяжении периода 10-17 суток в отсутствии репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478) (контроль в виде носителя, квадрат) или в присутствии ингибитора в концентрации 1 мкМ (направленный вверх треугольник) или 0,001 мкМ (направленный вниз треугольник).

На фиг. 5А и 5В представлено продуцирование IFN-гамма, IL2 и TNF-альфа в супернатанте Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA, первоначально полученных от здорового донора (фиг. 5А) и донора с множественной миеломой (фиг. 5В) после второго раунда стимуляции клетками MM1S на 4 сутки в отсутствии репрезентативного ингибитора гамма-секретазы (LY3039478) (левый столбик) или в присутствии ингибитора в концентрации 0,001 мкМ (средний столбик) или 0,001 мкМ (правый столбик).

На фиг. 6 представлены уровни в плазме ингибитора гамма-секретазы LY3039478 в различные моменты времени после перорального введения однократной дозы LY3039478 (3 мг/кг).

На фиг. 7 представлены уровни в плазме BCMA с течением времени после перорального введения однократной дозы LY3039478 (3 мг/кг) в модели с ксенотрансплантатом множественной миеломы человека (RPMI-8226) на мышах.

На фиг. 8 представлена экспрессия поверхностного BCMA при оценке посредством проточной цитометрии в подкожных опухолевых клетках, сформировавшихся в модели с ксенотрансплантатом множественной миеломы человека (RPMI-8226) на мышах, с течением времени после перорального введения однократной дозы LY3039478.

На фиг. 9А-9В представлены результаты испытания, описанного в примере 5, оценивающего влияние различных способов лечения в модели с ксенотрансплантатом множественной миеломы человека на мышах. На фиг. 9А представлен объем опухоли (мм³) на протяжении дней в ходе испытания. Пунктирной стрелкой под графиком указан период времени, в ходе которого вводили LY3039478, как описано в примере 5. На фиг. 9В представлена процентная выживаемость среди животных, которым проводили лечение, в течение 65 суток после инъекции CAR Т.

На фиг. 10А-10В представлено количество CD4+ CAR Т+ и CD8+ CAR Т+ в периферической крови с течением времени (сутки) после инъекции CAR Т (сутки после инъекции CAR Т) животным в модели с ксенотрансплантатом множественной миеломы человека на мышах в различных условиях, как описано в примере 5. На фиг. 10А представлено количество CD4+ CAR Т+ клеток на мкл крови с течением времени. На фиг. 10В представлено количество CD8+ CAR Т+ клеток на мкл крови с течением времени. Столбик GSI со стрелками указывает на время доставки LY3039478 (GSI), если его вводили.

На фиг. 11 представлено количество CD4+ (сверху) и CD8+ (снизу) CAR+ Т-клеток на 1×10^6 клеток в лизатах сателлитных опухолей, полученных на 7 и 15 сутки после инъекции низкой дозы ($1 \text{e}6$) CAR Т в испытании, описанном в примере 5.

На фиг. 12А представлены сывороточные уровни BCMA на 7 и 15 сутки после начала различных режимов лечения, как описано в примере 5.

На фиг. 12В представлена экспрессия поверхностного BCMA при оценке посредством проточной цитометрии в лизатах опухолей, полученных на 7 и 15 сутки после инъекции Т-клеток с CAR против BCMA у мышей из различных групп введения, как описано в примере 5.

На фиг. 13А представлена жизнеспособность клеток RPMI-8226, OPM2, и MM1.S с течением времени при обработке длительно стимулированными Т-клетками с CAR против BCMA и DMSO (DMSO-контроль) или соединением ингибитора гамма-секретазы LY3039478 (1 мкМ GSI), при соотношении эф-фектора и мишени 0,3:1, или без обработки (RPMI, OPM2 или MM1.S отдельно).

На фиг. 13В представлен процент уничтожения клеток RPMI-8226, OPM2, и MM1.S при обработке длительно стимулированными Т-клетками с CAR против BCMA и DMSO (DMSO-контроль) или LY3039478 (1 мкМ GSI) или без обработки (RPMI, OPM2 или MM1.S отдельно).

На фиг. 13С представлены концентрации IL-2 в супернатанте после инкубации в течение 24 ч клеток RPMI-8226, OPM2, и MM1.S с длительно стимулированными Т-клетками с CAR против BCMA и LY3039478 (1 мкМ GSI) или DMSO (DMSO-контроль) в соотношениях эф-фектора и мишени 0,3:1 или 1:1.

На фиг. 14 представлены концентрации IFN γ , IL-2, и TNF α в супернатанте после инкубации в течение 24 ч Т-клеток с CAR против BCMA с BCMA-содержащими гранулами при различных концентрациях ингибитора гамма-секретазы LY3039478 или DMSO (носитель).

На фиг. 15А представлена связывающая способность антитела против BCMA (BCMA ABC) на поверхности клеток в образцах, происходящих из клеток пациентов с множественной миеломой, до (до GSI) и после (после GSI) введения трех доз низкомолекулярного ингибитора гамма-секретазы (GSI) LY3039478 перорально, как описано в примере 8.

На фиг. 15В представлен процент плазмацитов в образцах пациентов, для которых определено, что они имеют поддающуюся измерению поверхностную экспрессию BCMA, до (до GSI) и после (после

GSI) введения трех доз низкомолекулярного ингибитора гамма-секретазы (GSI) LY3039478 перорально, как описано в примере 8.

Подробное описание

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы комбинированной терапии, вовлекающие проведение иммунотерапии, такой как клеточная терапия, например, терапия Т-клетками, и введение ингибитора гамма-секретазы. В некоторых аспектах предусматриваемые способы вовлекают проведение иммунотерапии или введение иммунотерапевтического средства, таких как композиция, включающая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), и введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления гамма-секретазу вводят до, одновременно или после начала проведения иммунотерапии, например, клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает внутримембранное расщепление мишени гамма-секретазы, например ВСМА, на клетке (такой как опухолевая/злокачественная клетка). В некоторых аспектах мишень является такой же, как и антиген-мишень клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия, такая как CAR-экспрессирующие Т-клетки, включает антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном созревания В-клеток (ВСМА), таким как поверхностный ВСМА. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выбор индивидуума для лечения, где индивидуум имеет низкую экспрессию поверхностного ВСМА на клетке, такой как опухолевая/злокачественная клетка, например, клетки злокачественной опухоли у индивидуума, которые экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматиков, и происходят из плазматиков. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия содержит рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор антигена (CAR), который связывается с антигеном, отличным от ВСМА. В некоторых вариантах осуществления способы проводят совместно с адоптивной клеточной терапией.

Способы клеточной терапии, такие как способы терапии на основе Т-клеток, например, адоптивная терапия Т-клетками (включая терапию, вовлекающую введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, специфичные к представляющему интерес заболеванию или нарушению, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR) и/или другие рекомбинантные рецепторы антигенов, а также другие адоптивные способы терапия иммунными клетками и адоптивные способы терапии Т-клетками) могут быть эффективными при лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и нарушений. Внесенная способами инженерии экспрессия рекомбинантных рецепторов, таких как химерные рецепторы антигенов (CAR), на поверхности Т-клеток, позволяет перенацеливание специфичности Т-клеток. В клинических испытаниях CAR-Т-клетки, например, CAR-Т-клетки против CD19, обеспечивали длительный полный ответ у пациентов как с лейкозом, так и 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 введенных клеток распознавать и связываться с мишенью, например, антигеном-мишенью, транспортироваться, локализоваться и успешно входить в соответствующие области у индивидуума, опухоли и их окружение. В некоторых контекстах оптимальная эффективность может зависеть от способности введенных клеток к активации, экспансии, для проявления различных эффекторных функций, включая цитотоксическое уничтожение и секрецию различных факторов, таких как цитокины, персистенцию, в том числе длительно, дифференцировку, переходу или вовлечению в перепрограммирование в определенные фенотипические состояния (такие как длительная память, менее дифференцированное состояние и эффекторное состояние), чтобы избежать или снизить иммунодепрессивные состояния в локальном микроокружении заболевания, для обеспечения эффективных и стойких вторичных ответов после устранения и повторного воздействия лиганда-мишени или антигена-мишени, и избегания или уменьшения истощения, анергии, периферической толерантности, терминальной дифференцировки и/или дифференцировки в супрессивное состояние.

В некоторых вариантах осуществления экспозиция и персистенция модифицированных способами инженерии клеток снижается или уменьшается после введения индивидууму. Тем не менее, наблюдения указывают на то, что в некоторых случаях увеличенная экспозиция у индивидуума введенных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы (например, увеличенное количество клеток или длительность с течением времени) может увеличить эффективность и улучшить терапевтические исходы адоптивной клеточной терапии. Предварительный анализ, проведенный после введения различных нацеленных на CD19 экспрессирующих CAR Т-клеток индивидуумам с различными экспрессирующими CD19 злокачественными опухолями, во множестве клинических испытаний, продемонстрировал корреляцию между большей и/или более длительной экспозицией CAR-экспрессирующих клеток и исходами лечения. Такие исходы включали выживаемость и ремиссию пациента, даже у индивидуумов с тяжелой или значительной опухолевой нагрузкой.

В некоторых аспектах предусматриваемые способы и применения обеспечивают или достигают

улучшенных или более длительных ответов или эффективности по сравнению с определенными альтернативными способами, например, в конкретных подвергаемых лечению группах индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления способы являются преимущественными посредством проведения терапии Т-клетками, такой как композиция, включающая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и введения ингибитора гамма-секретазы.

Предусматриваемые способы основаны на наблюдении, что ингибитор гамма-секретазы улучшает один или несколько функциональных видов активности клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, специфичных к ВСМА, после воздействия экспрессирующих ВСМА клеток в присутствии ингибитора гамма-секретазы. Такая функциональная активность включает, например, антигензависимую цитолитическую активность и/или способность продуцировать один или несколько цитокинов. В некоторых аспектах увеличенная активность может быть следствием повышенной экспрессии или стабилизированной экспрессии поверхностного ВСМА на клетках (например, опухолевые/злокачественные клетки, например, клетки множественной миеломы). В некоторых аспектах повышение или стабилизация экспрессии антигена-мишени, например ВСМА, на клетках-мишенях улучшает исход для пациентов, у которых может быть или является низкой экспрессия антигена-мишени, например ВСМА, так что достаточное количество антигена становится доступным для нацеливания посредством клеточной терапии, например терапии Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые варианты осуществления снижают вариабельность исходов лечения в группе индивидуумов с вариабельной поверхностной экспрессией антигена-мишени, например ВСМА. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемых способов пациента выбирают для проведения предусматриваемой комбинированной терапии ингибитором гамма-секретазы и иммунотерапии, такой как клеточная терапия (например, CAR-Т-клетки), если клетки злокачественной опухоли у индивидуума, такие как клетки, которые экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматитов или происходят из плазматитов, имеют низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень поверхностного ВСМА, приблизительно равный пороговому уровню. Таким образом, в некоторых аспектах ингибитор гамма-секретазы вводят в количестве, которое стабилизирует поверхностную экспрессию ВСМА, например, путем снижения или ингибирования внутримембранного расщепления ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы обеспечивают преимущества у индивидуумов, которые не имеют или которые не выбраны, исходя из высоких уровней в сыворотке, плазме или опухоли растворимого или высвободившегося ВСМА. В некоторых вариантах осуществления пациента не выбирают по наличию высоких уровней в сыворотке, или плазме, или опухоли растворимого или высвободившегося ВСМА. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемая комбинированная терапия вовлекает проведение клеточной терапии, например, CAR-экспрессирующими Т-клетками, имеющими антигенсвязывающий домен, который связывается с поверхностным ВСМА, где антигенсвязывающий домен связывается с растворимым ВСМА с аффинностью, которая ниже аффинности указанного антигенсвязывающего домена, связывающегося с поверхностным ВСМА. В некоторых контекстах предусматриваемая комбинированная терапия вовлекает проведение клеточной терапии, такой как терапия экспрессирующими рекомбинантный рецептор клетками, например CAR-экспрессирующими Т-клетками, в которой связывание с поверхностным ВСМА посредством рекомбинантного рецептора или CAR, или показатель, указывающий на функцию или активность экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток (например, CAR-экспрессирующих клеток), после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА.

В некоторых аспектах таких результатов достигают при помощи усиления или улучшения активности, в некоторых случаях, собственной активности, клеток, например, Т-клеток, клеточной терапии. В некоторых аспектах этого можно достигать в присутствии ингибитора гамма-секретазы, который демонстрирует активность в отношении мишеней, отличных от ВСМА, такую как активность расщепления Notch. Примером такого ингибитора является LY3039478 или соединение 1, описанное в настоящем описании, или его стереоизомеры, фармацевтически приемлемые соли или гидраты. В некоторых аспектах, несмотря на то, что передача сигнала notch может регулировать дифференцировку и/или пролиферацию Т-клеток, наблюдения, описанные в настоящем описании, демонстрируют усиленную активность Т-клеток в присутствии иллюстративного ингибитора, о котором известно, что он нацелен на передачу сигнала notch, например LY3039478. Например, как показано в настоящем описании, в иллюстративном анализе последовательной стимуляции, оценивающей активность Т-клеток с CAR против ВСМА после повторяющейся стимуляции экспрессирующими ВСМА клетками, наблюдали усиленную экспансию и/или выживаемость CAR+ Т-клеток в присутствии иллюстративного ингибитора гамма-секретазы. Такие результаты указывают на то, что предусматриваемая комбинированная терапия усиливает функцию Т-клеток, включая функции, связанные с экспансией, пролиферацией и персистенцией Т-клеток.

Описанные данные указывают на то, что комбинированная терапия ингибитором гамма-секретазы в способах, вовлекающих клеточную терапию, например, вовлекающих проведение адоптивной терапии Т-клетками, обеспечивает усиленную функцию терапии Т-клетками. В некоторых вариантах осуществле-

ния комбинирование клеточной терапии (например, введение модифицированных Т-клеток) с ингибитором гамма-секретазы улучшает или усиливает одну или несколько функций и/или эффектов терапии Т-клетками, в том числе после контакта с антигеном, таких как персистенция, экспансия, цитотоксичность и/или терапевтические исходы, например, способность уничтожать или снижать опухолевую нагрузку или нагрузку другими заболеваниями или клетками-мишенями. В некоторых аспектах предусматриваемые способы повышают общий ответ и/или выживаемость в или более чем в 1,5 раза, в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4,0 раза, в 5,0 раз, в 10 раз или более по сравнению с альтернативным лечением, например, по сравнению с монотерапией, вовлекающей проведение терапии Т-клетками (например, CAR-Т-клетками) или ингибитором гамма-секретазы, или его фармацевтически приемлемой солью гидрата.

В некоторых аспектах предусматриваемые способы могут усиливать, повышать или стимулировать терапию Т-клетками, преодолевая недостаточность персистенции и/или истощение Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума, которому проводят терапию Т-клетками, например CAR-Т-клетками, проводят мониторинг наличия, отсутствия или уровня Т-клеток в ходе терапии у индивидуума, например, в биологическом образце индивидуума, например, в крови индивидуума. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль гидрата вводят индивидууму, которому проводят терапию Т-клетками (например, CAR-Т-клетками), но у которого такие клетки имеют слабую экспансию и/или находятся на или ниже порогового уровня в образце индивидуума, например, в образце крови, в момент, когда обычно наблюдают сильную или устойчивую экспансию CAR-Т-клеток у множества индивидуумов, которым проводят терапию Т-клетками (например, CAR-Т), в некоторых случаях ту же самую терапию Т-клетками (например, теми же CAR-Т-клетками). В некоторых из любых таких вариантов осуществления уровень модифицированных, например CAR+, клеток в образце определяют как количество клеток, например, CAR+ клеток, на микролитр образца; в некоторых вариантах осуществления пиковый уровень представляет собой наиболее высокий такой показатель после, необязательно на протяжении определенного периода времени после, введения клеток или проведения клеточной терапии у индивидуума. В некоторых аспектах ингибитор гамма-секретазы вводят индивидууму, которому ранее проводили клеточную терапию, если ровно или приблизительно через 1-15 суток после начала проведения терапии Т-клетками у индивидуума в крови обнаруживается менее 10 клеток на мкл, например, менее 5 клеток на мкл или менее 1 клетки на мкл клеток терапии Т-клетками, например, CAR-Т-клеток, или их подгруппы CD8+ или CD3+. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят индивидууму, которому ранее проводили клеточную терапию, если ровно или приблизительно через 12-15 суток после начала проведения терапии Т-клетками, например CAR-Т-клетками, у индивидуума в крови обнаруживается менее 10 клеток на мкл, например, менее 5 клеток на мкл или менее 1 клетки на мкл таких клеток, или их подгруппы CD8+ или CD3+.

В некоторых аспектах предусматриваемые способы могут усиливать, увеличивать или стимулировать терапию Т-клетками у индивидуумов, у которых наблюдали максимальный ответ (например, присутствие Т-клеток и/или снижение опухолевой нагрузки) на терапию Т-клетками, но у которых ответ, например, присутствие Т-клеток и/или снижение опухолевой нагрузки стали сниженными или более не поддаются обнаружению. В некоторых аспектах ингибитор гамма-секретазы вводят индивидууму в пределах недели, например, в пределах 1, 2 или 3 суток, после: (i) обнаружения пикового или максимального уровня клеток терапии Т-клетками в крови индивидуума; (ii) того, как количество клеток терапии Т-клетками, обнаруживаемое в крови, после того, как обнаруживалось в крови, не обнаруживается или снижается, необязательно снижается, по сравнению с предшествующим моментом времени после проведения терапии Т-клетками; (iii) снижения количества клеток терапии Т-клетками, обнаруживаемых в крови, в или более чем в 1,5 раза, в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4,0 раза, в 5,0 раз, в 10 раз или более по сравнению с пиковым или максимальным количеством клеток терапии Т-клетками, обнаруживаемым в крови индивидуума после начала проведения терапии Т-клетками; (iv) того, как на момент времени после обнаружения пикового или максимального уровня клеток терапии Т-клетками в крови индивидуума, количество Т-клеток или клеток, происходящих из Т-клеток, обнаруживаемое в крови индивидуума, составляет менее 10%, менее 5%, менее 1% или менее 0,1% от общего количества мононуклеарных клеток периферической крови (PVMC) в крови индивидуума; (v) наличия у индивидуума прогрессирования заболевания и/или рецидива после ремиссии после терапии Т-клетками; и/или (iv) наличия у индивидуума увеличенной опухолевой нагрузки по сравнению с опухолевой нагрузкой в момент времени до или после введения Т-клеток и до начала введения ингибитора гамма-секретазы, или его фармацевтически приемлемой соли гидрата.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят индивидууму, которому проводят клеточную терапию, например терапию CAR-Т-клетками, но у которого возник рецидив после лечения терапией Т-клетками, например, в момент времени, когда ответ, например, наличие Т-клеток и/или снижение опухолевой нагрузки, снизился или более не поддается обнаружению. В некоторых аспектах рецидив может произойти вследствие потери антигена BCMA, которая в некоторых случаях может быть следствием подавления антигена/ускользания антигена BCMA. В некоторых случаях это может быть следствием отщепления или освобождения антигена BCMA с клеточной поверхности. В некоторых

аспектах потеря антигена может приводить к уменьшению количества клеток, презентующих антиген-мишень (например, ВСМА), тем самым уменьшая или снижая активность и/или функцию CAR Т-клеток и/или уменьшая количество CAR Т-клеток, например, в крови. В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы можно проводить в момент времени, когда у индивидуума возник рецидив, или предположительно или вероятно возникнет рецидив на клеточную терапию, для снижения или предупреждения отщепления или освобождения антигена-мишени (например, ВСМА) с клеточной поверхности. В таких вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы может усилить или активизировать CAR Т-клетки после рецидива путем предупреждения или снижения отщепления и/или освобождения антигена-мишени (например, ВСМА).

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы, вовлекающие комбинированную терапию из клеточной терапии и ингибитора гамма-секретазы, приводят к генетически модифицированным клеткам с увеличенным персистенцированием и/или лучшей эффективностью у индивидуума, которому проводят введение, по сравнению с проведением клеточной терапии в отсутствие ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления персистенцирование возрастает по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз, в 100 раз или более. В некоторых вариантах осуществления степень или масштаб персистенцирования введенных клеток можно выявлять или количественно определять после введения индивидууму. Например, в некоторых аспектах количественную ПЦР (кПЦР) используют для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток) в крови или сыворотке, или органе или ткани (например, пораженной заболеванием области) индивидуума. В некоторых аспектах персистенцирование количественно определяют как количество копий ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, например CAR, на микрограмм ДНК, или как количество экспрессирующих рецептор, например, экспрессирующих CAR, клеток на микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), или лейкоцитов, или Т-клеток на микролитр образца. В некоторых вариантах осуществления можно проводить проточно-цитометрический анализ, выявляющий клетки, экспрессирующие рецептор, обычно с использованием антител, специфичных к рецепторам. Также для детекции количества или процента функциональных клеток, таких как клетки, способные связывать, и/или нейтрализовывать, и/или индуцировать ответы, например, цитотоксические ответы, против клеток, связанных с заболеванием или состоянием, или экспрессирующих антиген, распознаваемый рецептором, можно использовать клеточные способы анализа. В любом из таких вариантов осуществления степень или уровень экспрессии другого маркера, ассоциированного с рекомбинантным рецептором (например, CAR-экспрессирующие клетки), можно использовать, чтобы отличить введенные клетки от эндогенных клеток у индивидуума.

В аспектах способов, описанных в настоящем описании, комбинирование клеточной терапии с ингибитором гамма-секретазы, которая повышает эффективность и/или стимулирует длительную активность CAR Т-клеток, позволяет введение более низкой дозы CAR Т-клеток для достижения того же терапевтического эффекта, который наблюдается в случае более высокой дозы CAR Т-клеток без ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза CAR Т-клеток при комбинировании с ингибитором гамма-секретазы может быть снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более относительно дозы CAR Т-клеток, вводимой без ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для лечения заболевания или состояния, такого как злокачественная опухоль, включая В-клеточную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых аспектах злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, плазмацитому, злокачественную опухоль, происходящую из плазмацитов, и/или злокачественную опухоль, происходящую из В-клеток. В некоторых аспектах такие заболевания, состояния или злокачественные опухоли включают заболевания, состояния или злокачественные опухоли, при которых ответы, например, полный ответ (CR), на лечение только посредством клеточной терапии, такой как композиция, включающая клетки для адоптивной клеточной терапии, например, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), является относительно низким по сравнению с лечением посредством других способов Т-клеточной терапии или лечением других заболеваний или злокачественных опухолей (например, CR у менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем приблизительно 50% или менее чем приблизительно 45% индивидуумов, подвергаемых такому лечению).

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы снижают или облегчают симптом, или исход, или нагрузку заболевания или состояния до степени, которая является более высокой, чем комбинация из (i) степени снижения или облегчения, достигаемой путем введения ингибитора гамма-секретазы отдельно, необязательно в среднем в популяции индивидуумов, имеющих заболевание или состояние, и (ii) степени снижения или облегчения путем проведения терапии Т-клетками отдельно, необязательно в среднем в популяции индивидуумов, имеющих заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления способ снижает или облегчает такие симптомы, исходы или нагрузку заболевания, например, по сравнению с популяцией индивидуумов, имеющих заболевание или состояние, в

среднем, более чем в или приблизительно более чем в 1,5 раза, в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4,0 раза, в 5,0 раз, в 6,0 раз, в 7,0 раз, в 8,0 раз, в 9,0 раз, в 10,0 раз, в 20,0 раз, в 30,0 раз, в 40,0 раз, в 50,0 раз или более.

Также предусматриваются способы модификации, получения и продуцирования клеток (например, CAR-экспрессирующих Т-клеток), композиции, содержащие клетки и/или ингибитор гамма-секретазы, и наборы и устройства, содержащие и предназначенные для применения, продуцирования и введения клеток и/или ингибитора гамма-секретазы, такие как те, которые соответствуют предусматриваемым способам комбинированной терапии.

Все публикации, в том числе патентные документы, научные статьи и базы данных, упоминаемые в настоящей заявке, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме для любых целей в той степени, как если бы каждая индивидуальная публикация была индивидуально включена в качестве ссылки. Если определение, указанное в настоящем описании, противоречит или иным образом не соответствует определению, указанному в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки, определение, приведенное в настоящем описании, имеет преимущество над определением, которое включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, приведены только для организационных целей и их не следует истолковывать как ограничивающие предмет описания.

I. Комбинированная терапия

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы комбинированной терапии для лечения заболевания или нарушения, например, злокачественной опухоли или пролиферативного заболевания, которые включают проведение у индивидуума комбинированной терапии из 1) ингибитора гамма-секретазы и 2) иммунотерапии, например, клеточной терапии, например, терапии Т-клетками, например, CAR-экспрессирующими клетками (например, Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия представляет собой адаптивную иммунную клеточную терапию, включающую Т-клетки, которые специфически распознают и/или нацелены на антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, например, злокачественной опухолью или пролиферативным заболеванием. Также предусматриваются комбинации и изделия, такие как наборы, которые содержат композицию, включающую средство иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и/или композицию, содержащую ингибитор гамма-секретазы, и применение таких композиций и комбинаций для лечения или предупреждения заболеваний, состояний и нарушений, включая злокачественные опухоли.

В некоторых вариантах осуществления такие способы могут включать введение ингибитора гамма-секретазы до, одновременно, в ходе, во время курса (включая один раз и/или периодически во время курса) и/или после проведения (например, начала проведения) иммунотерапии, например, клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления введение может вовлекать последовательное или поочередное введение ингибитора гамма-секретазы и проведение клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия представляет собой адаптивную клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия представляет собой или включает терапию инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапию трансгенным TCR или терапию клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор (необязательно терапию Т-клетками), которая необязательно представляет собой терапию клетками, экспрессирующими химерный рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления терапия представляет собой направленную терапию В-клетками. В некоторых вариантах осуществления терапия нацелена на антиген созревания В-клеток (BCMA). В некоторых вариантах осуществления терапия нацелена на CD19. В некоторых вариантах осуществления терапия нацелена на связанный с клеточной поверхностью муцин 1 (MUC1). В некоторых вариантах осуществления клетки и режимы дозирования для введения клеток могут включать любые, как описано в приведенном ниже подразделе А "Введение клеток". В некоторых вариантах осуществления режимы дозирования для введения ингибиторов гамма-секретазы могут включать любые, как описано в приведенном ниже подразделе В "Введение ингибитора гамма-секретазы".

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапию, например, клеточную терапию (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и ингибитор гамма-секретазы предоставляют в качестве фармацевтических композиций для введения индивидууму. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат терапевтически эффективные количества одного или обоих средств для комбинированной терапии, например, Т-клеток для адаптивной клеточной терапии и ингибитора гамма-секретазы, как описано. В некоторых вариантах осуществления средства составляют для введения в отдельных фармацевтических композициях. В некоторых вариантах осуществления любые из фармацевтических композиций, описанных в настоящем описании, можно составлять в виде дозированных форм, пригодных для каждого пути введения.

В некоторых вариантах осуществления комбинированную терапию, которая включает проведение иммунотерапии, например, клеточной терапии, включая модифицированные клетки, такой как терапия CAR-Т-клетками, и ингибитор гамма-секретазы, проводят у индивидуума или пациента, имеющего заболевание или состояние, подлежащие лечению (например, злокачественную опухоль), или имеющего риск

наличия заболевания или состояния (например, злокачественной опухоли). В некоторых аспектах способы осуществляют лечение, например смягчают, одного или несколько симптомов заболевания или состояния, например, путем уменьшения опухолевой нагрузки злокачественной опухоли, экспрессирующей антиген, распознаваемый иммунотерапией или иммунотерапевтическим средством, например, распознаваемый модифицированной Т-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, которое подвергают лечению, может представлять собой любое заболевание или состояние, при котором экспрессия антигена ассоциирована с и/или вовлечена в этиологию заболевания, состояния или нарушения, например, вызывает, усугубляет или иным образом вовлечена в такое заболевание, состояние или нарушение. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, ассоциированные с озлокачествлением или трансформацией клеток (например, злокачественная опухоль), аутоиммунное или воспалительное заболевание, или инфекционное заболевание, например, вызываемое бактериальными, вирусными или другими патогенами. Иллюстративные антигены, которые включают антигены, ассоциированные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, включают любые из антигенов, описанных в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, экспрессированный на модифицированных клетках комбинированной терапии, включая химерный рецептор антигена или трансгенный TCR, специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой злокачественную опухоль или пролиферативное заболевание, при которых экспрессируется ВСМА. В некоторых вариантах осуществления в предусматриваемых способах используется клетка, экспрессирующая рекомбинантный рецептор (например, CAR-T-клетка), который нацелен на ВСМА. В конкретных вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой множественную миелому. В некоторых случаях множественная миелома представляет собой рецидивирующую или рефрактерную множественную миелому.

К заболеваниям, подлежащим лечению, относится любое заболевание или нарушение, ассоциированное с ВСМА, или любое заболевание или нарушение, при котором ВСМА специфически экспрессируется и/или при котором ВСМА является мишенью лечения (также называемые в настоящем описании взаимозаменяемо "ВСМА-ассоциированным заболеванием или нарушением"). Злокачественные опухоли, ассоциированные с экспрессией ВСМА, включают гематологические злокачественные опухоли, такие как множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, а также как лимфома Ходжкина, так и неходжкинская лимфома. См. Coquery et al., *Crit Rev Immunol.*, 2012, 32(4):287-305 для обзора ВСМА. Поскольку ВСМА вовлечен в опосредование выживания опухолевых клеток, он является потенциальной мишенью для терапии злокачественной опухоли. Химерные рецепторы антигена, содержащие антитела против ВСМА, включая антитела мыши против ВСМА человека и антитела человека против антител человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, описаны ранее. См. Carpenter et al., *Clin Cancer Res.*, 2013, 19(8):2048-2060, WO 2016/090320, WO 2016090327, WO 2010104949 A2 и WO 2017173256. Иллюстративные CAR, содержащие антитела против ВСМА, описаны в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления перед началом введения модифицированных клеток, таких как клетки с CAR против ВСМА, индивидууму проводили один или несколько предшествующих способов терапии. В некоторых вариантах осуществления индивидууму проводили по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более предшествующих способов терапии. В некоторых вариантах осуществления индивидууму проводили по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более предшествующих способов терапии. В некоторых аспектах у индивидуума возник рецидив после или он является рефрактерным к одному или нескольким, например, к каждому, индивидуально, из предшествующих способов терапии. В некоторых аспектах предшествующие способы терапии включают лечение посредством трансплантации аутологичных стволовых клеток (ASCT); иммуномодулирующего средства, например IMiD; ингибитора протеасом; и антитела против CD38; если только индивидуум не был кандидатом для или у него не был противопоказанным один или несколько из этих способов терапии. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее средство, например IMiD, выбрано из талидомида, леналидомида или помалидомида. В некоторых вариантах осуществления ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба или иксазомиба. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD38 представляет собой или включает даратумумаб. В некоторых вариантах осуществления индивидуум должен пройти по меньшей мере 2 последовательных курса лечения для каждого предшествующего режима, если только прогрессирование заболевания не было наилучшим ответом на режим. В некоторых аспектах индивидуум, подвергаемый лечению с помощью способа, описанного в настоящем описании, имеет миелому, которая рецидивировала или является рефрактерной к лечению, с более чем 10% CD138+ злокачественных плазматочных при иммуногистохимии (ИГ) биоптата костного мозга, полученного посредством толстоигльной биопсии, либо после ASCT, либо, если индивидуум не подвергался ASCT, индивидуум является неподходящим для трансплантации, например, вследствие возраста, сопутствующего заболевания, выбора пациента, состояния заболевания и/или мнения лечащего

врача, и имеет заболевание, которое персистирует после более чем четырех курсов индукционной терапии, и/или он является рефрактерным к или не переносит терапию ингибитором протеасом и иммуномодулирующим лекарственным средством, например IMiD.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль, такую как солидная опухоль, лимфома, лейкоз, опухоль крови, метастазирующая опухоль или другой тип злокачественного новообразования или опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, выбран из группы, состоящей из антигена созревания В-клеток (BCMA), ROR1, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EPG-2, EPG-40, EPHa2, ErbB2, 3 или 4, димеров erbB, EGFR vIII, FBP, FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, EGP2, EGP40, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE AI, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов a, CD44v6, CD44v7/8, интегрин avb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), простатспецифического антигена, PSMA, Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138 и патоген-специфического антигена. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с или представляет собой универсальную метку. В некоторых вариантах осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, выбран из группы, состоящей из Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, ассоциированного с клеточной поверхностью муцина 1 (MUC1), эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CX3CR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFNaR2, IL1R1, IL1R2, IL6R и белка-предшественника амилоида (APP).

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой связанное с В-клетками нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой одно или несколько заболеваний или состояний из глиобластомы, лимфоматоидного гранулематоза, посттрансплантационного лимфопролиферативного нарушения, иммунорегуляторного нарушения, болезни тяжелых цепей, первичного или ассоциированного с иммуноцитами амилоидоза или моноклональной гаммапатии неопределенного значения.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание или нарушение. Такие аутоиммунные заболевания или нарушения включают, но не ограничиваются ими, системную красную волчанку (SLE), волчаночный нефрит, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит (например, ювенильный ревматоидный артрит), ANCA-ассоциированный васкулит, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), аутоиммунную тромбоцитопению, болезнь Чагаса, болезнь Грэйвса, гранулематоз Вегенера, узелковый полиартериит, синдром Шегрена, пемфигус обыкновенный, склеродермию, рассеянный склероз, псориаз, IgA-нефропатию, IgM-полиневропатию, васкулит, сахарный диабет, синдром Рейно, антифосфолипидный синдром, болезнь Гудпасчера, болезнь Кавасаки, аутоиммунную гемолитическую анемию, миастению или прогрессирующий гломерулонефрит.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль (например, BCMA-экспрессирующая злокачественная опухоль) представляет собой лимфому, лейкоз или плазмацитарную злокачественную опухоль. Лимфомы, предусматриваемые в рамках настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими, лимфому Беркитта (например, эндемическую лимфому Беркитта или спорадическую лимфому Беркитта), неходжскинскую лимфому (NHL), лимфому Ходжкина, макроглобулинемию Вальденстрема, фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфому с нерассеченными ядрами, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), лимфому маргинальной зоны, лимфому селезенки, узелковую моноцитотидную В-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, крупноклеточную лимфому, диффузную лимфому из смешанных клеток, легочную В-клеточную ангиоцентрическую лимфому, мелколлимфоцитарную лимфому, первичную средостенную В-клеточную лимфому, лимфоплазматическую лимфому (LPL) или лимфому из клеток мантийной зоны (MCL). Лейкозы, предусматриваемые в рамках настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), плазмацитарный лейкоз или острый лимфоцитарный лейкоз (ALL). Также в рамках настоящего изобретения предусматриваются плазмацитарные злокачественные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, множественную миелому (например, несекреторную множественную миелому, вялотекущую множественную миелому) или плазмацитому. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой множественную миелому, такую как

рецидивирующая и/или рефрактерная множественная миелома. Заболевания, нарушения или состояния, которые можно лечить, включают, но не ограничиваются ими, нейробластома, почечноклеточный рак, рак толстого кишечника, рак ободочной и прямой кишки, рак молочной железы, эпителиальный плоскоклеточный рак, меланому, миелому (например, множественную миелому), рак желудка, злокачественную опухоль головного мозга, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак тела матки, злокачественную опухоль надпочечников и рак головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль или пролиферативное заболевание представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль или пролиферативное заболевание представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), неходжкинскую лимфому (NHL) или хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой CLL. В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для лечения миеломы, лимфомы или лейкоза. В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для лечения неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), острого миелоидного лейкоза (AML) или миеломы, например, множественной миеломы (MM). В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для лечения MM или DBCBL.

В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для лечения не гематологической злокачественной опухоли, такой как солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для лечения рака мочевого пузыря, легкого, головного мозга, меланомы (например, мелкоклеточного рака легкого, меланомы), молочной железы, шейки матки, яичника, ободочной и прямой кишки, поджелудочной железы, эндометрия, пищевода, почки, печени, предстательной железы, кожи, щитовидной железы или тела матки. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль или пролиферативное заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак ободочной и прямой кишки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак почки, печеночноклеточный рак, рак легкого, рак яичника, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, рак щитовидной железы, рак тела матки, рак желудка, рак пищевода, рак головы и шеи, меланому, нейроэндокринные злокачественные опухоли, злокачественные опухоли ЦНС, опухоли головного мозга, рак кости или саркому мягких тканей.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой инфекционное заболевание или состояние, такое как, но не ограничиваясь ими, вирусные, ретровирусные, бактериальные и протозойные инфекции, иммунодефицит, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), аденовирус, вирус полиомы ВК. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное или воспалительное заболевание или состояние, такое как артрит, например, ревматоидный артрит (RA), диабет типа I, системная красная волчанка (SLE), воспалительное заболевание кишечника, псориаз, склеродермия, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, болезнь Грейвса, болезнь Крона, рассеянный склероз, астма и/или заболевание или состояние, ассоциированное с трансплантацией.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка ингибитора гамма-секретазы и/или иммунотерапии, такой как клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), может зависеть от типа заболевания, подвергаемого лечению, клеток и/или рекомбинантных рецепторов, экспрессируемых на клетках, тяжести и течения заболевания, пути введения, введения ингибитора гамма-секретазы и/или проведения терапии Т-клетками для профилактических или терапевтических целей, предшествующей терапии, частоты введения, клинического анамнеза индивидуума и ответа на клетки, и мнения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции и клетки подходящим образом вводят индивидууму за один раз или на протяжении серии введений. Описаны иллюстративные режимы и схемы дозирования для предусматриваемой комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапию, такую как клеточная терапия (например, терапия CAR-Т-клетками), и введение ингибитора гамма-секретазы проводят в качестве части дальнейшего комбинированного лечения, которое можно проводить одновременно или последовательно в любом порядке с другим терапевтическим вмешательством. В некоторых контекстах иммунотерапию, такую как клеточная терапия, например, модифицированные Т-клетки, такие как CAR-экспрессирующие Т-клетки, проводят совместно с другой терапией достаточно близко по времени, чтобы клеточная терапия усиливала эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят перед одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, модифицированные Т-клетки, такую как CAR-экспрессирующие Т-клетки, проводят после одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления способы комбинированной терапии дополнительно включают терапию с лимфодеплецией, такую как введение химиотерапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия дополнительно включает введение другого терапевтического средства, такого как средство против злокачественной опу-

холи, ингибитор точки контроля или другое иммуномодулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия дополнительно включает введение стероида, такого как дексаметазон. Применения включают применения комбинированных способов терапии в таких способах и лечении, и применения таких композиций для получения лекарственного средства для проведения таких способов комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления способы и применения, таким образом, осуществляют лечение заболевания, или состояния, или нарушения, такого как злокачественная опухоль или пролиферативное заболевание, у индивидуума.

До, в ходе или после проведения иммунотерапии (например, терапия Т-клетками, такая как терапия CAR-Т-клетками) и/или введения ингибитора гамма-секретазы, в некоторых вариантах осуществления определяют биологическую активность терапии Т-клетками, например, биологическую активность популяций модифицированных клеток, например, любым из ряда известных способов. Параметры оценки включают способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени, персистенция и другие показатели активности Т-клеток, например, измеряемые с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, такого как способы анализа, дополнительно описанные ниже в разделе III. В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток, например, Т-клеток, вводимых для терапии на основе Т-клеток, определяют путем анализа уничтожения цитотоксических клеток, экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, пролиферации или экспансии, например, при рестимуляции антигеном. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки нагрузки заболеванием и/или клинического исхода, например, снижения опухолевой массы или нагрузки. В некоторых вариантах осуществления решение о введении одного или обоих средств комбинированной терапии и/или каком-либо повторном проведении терапии может быть принято на основе результатов анализа до, в ходе, во время курса или после введения одного или нескольких средств комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления комбинированный эффект ингибитора гамма-секретазы в комбинации с клеточной терапией может быть синергическим по сравнению со способами лечения, вовлекающими только ингибитор гамма-секретазы, или монотерапией посредством клеточной терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, приводят к повышению или улучшению желаемого терапевтического эффекта, такому как повышение или улучшение снижения или ингибирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных со злокачественной опухолью.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы повышает экспансию или пролиферацию модифицированных Т-клеток, таких как CAR Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления повышение экспансии или пролиферации наблюдают *in vivo* при введении индивидууму. В некоторых вариантах осуществления увеличение количества модифицированных Т-клеток, например CAR-Т-клеток, возрастает более чем в или приблизительно более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4,0 раза, в 5,0 раз, в 6,0 раз, в 7,0 раз, в 8,0 раз, в 9,0 раз, в 10,0 раз или более. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы продлевает и/или поддерживает активность и/или функцию модифицированных Т-клеток, таких как CAR-Т-клетки.

А. Проведение иммунотерапии

В некоторых вариантах осуществления средство иммунотерапии, которое связывает или нацелено на антиген на иммунной клетке и/или которое вовлечено в заболевание или нарушение, вводят в соответствии с предусматриваемыми способами комбинированной терапии. В конкретных вариантах осуществления средство иммунотерапии связывает и/или распознает антиген, который экспрессируется на или в клетке или ткани. В определенных вариантах осуществления антиген экспрессируется на или в клетке или ткани. В конкретных вариантах осуществления антиген экспрессируется на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой В-клетку, Т-клетку и/или опухолевую или злокачественную клетку. В конкретных вариантах осуществления антиген экспрессируется в или на циркулирующей клетке. В некоторых вариантах осуществления антиген экспрессируется на поверхности циркулирующей клетки.

В конкретных вариантах осуществления средство иммунотерапии связывает и/или распознает по меньшей мере одной антиген, ассоциированный с заболеванием. К заболеваниям, состояниям и нарушениям, которые можно лечить у человека посредством иммунотерапии, относятся опухоли, включая солидные опухоли, гематологические злокачественные опухоли и меланомы, и включая локализованные и метастазирующие опухоли, инфекционные заболевания, такие как инфекция вирусом или другим патогеном, например ВИЧ, HCV, HBV, CMV, HPV, и паразитарное заболевание, и аутоиммунные и воспалительные заболевания. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой опухоль, рак, злокачественную опухоль, новообразование или другое пролиферативное заболевание или нарушение. Такие заболевания включают, но не ограничиваются ими, лейкоз, лимфому, например, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), ALL, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, рефрактерную фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, вялотекущую В-клеточную лимфому, В-клеточные злокачественные опухоли, злокачественные опухоли толстого кишечника, легкого, печени, молочной железы, предстательной железы, яичника,

кожи, меланому, злокачественные опухоли кости и злокачественную опухоль головного мозга, рак яичника, эпителиальные злокачественные опухоли, почечноклеточный рак, аденокарциному поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, карциному шейки матки, рак ободочной и прямой кишки, глиобластому, нейробластому, саркому Юинга, медуллобластому, остеосаркому, синовиальную саркому и/или мезотелиому.

В некоторых вариантах осуществления средство иммунотерапии связывает по меньшей мере один антиген, который является мишенью для расщепления гамма-секретазой. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ВСМА или представляет собой муцин 1 (Muc1).

1. Терапевтические средства, например антитела

В определенных вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой терапевтическое средство, такое как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых аспектах иммунотерапия представляет собой терапевтическое средство, которое представляет собой или содержит активатор или стимулятор иммунной системы. В определенных вариантах осуществления стимулятор иммунной системы представляет собой средство или терапию, которые активируют по меньшей мере одну иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В определенных вариантах осуществления активатор иммунной клетки представляет собой IL-2, например, пролейкин; γ hу-IFN-альфа-2а и/или γ hу-IFN-альфа-2b, например, Пегасис, Роферон-А, Интрон-А и ПЭГ-интрон; моноклональное антитело против CD3, например, Муромонаб-CD3 и/или Ортоклон ОКТ 3; TGN-1412; и/или блинатумомаб, например, BiTE против CD3хCD3.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия представляет собой или включает привлекающую Т-клетки терапию, которая представляет собой или включает связывающую молекулу, способную связываться с поверхностной молекулой, экспрессируемой на Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления поверхностная молекула представляет собой активирующий компонент на Т-клетке, такой как компонент Т-клеточного рецепторного комплекса. В некоторых вариантах осуществления поверхностная молекула представляет собой CD3 или представляет собой CD2. В некоторых вариантах осуществления привлекающая Т-клетки терапия представляет собой или включает антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления привлекающая Т-клетки терапия представляет собой биспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, связывающийся с активирующим компонентом Т-клетки (например, молекулы поверхности Т-клеток, 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 злокачественной клетке, например, любой из приведенных антигенов, как описано в настоящем описании, например, ВСМА или Muc1. В некоторых вариантах осуществления одновременное или практически одновременное связывание такого антитела с обеими из его мишеней может приводить к временному взаимодействию между клеткой-мишенью и Т-клеткой, тем самым вызывая активацию, например, цитотоксическую активность, Т-клетки и последующий лизис клетки-мишени.

К таким иллюстративным биспецифическим антителам, привлекающим Т-клетки, относятся биспецифические привлекающие Т-клетки (BiTE) молекулы, которые содержат тандемные молекулы scFv, слитые гибким линкером (см., например, Nagorsen and Bauerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011); тандемные молекулы scFv, слитые друг с другом посредством, например, гибкого линкера, и содержащие Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединицы, способных к стабильной ассоциации (WO 2013026837); диантитела и их производные, включая тандемные диантитела (Holliger et al, *Prot Eng* 9, 299-305 (1996); Kipriyanov et al, *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999)); перенацеливающие молекулы с двойной аффинностью (DART), которые могут включать формат диантител с С-концевым дисульфидным мостиком; или антитела triomab, которые включают целые гибридные молекулы IgG мыши/крысы (Seimetz et al, *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)). В некоторых вариантах осуществления привлекающие Т-клетки средства терапии представляют собой блинатумомаб или AMG 330. Любое из таких средств, привлекающих Т-клетки, можно использовать в предусматриваемых способах, композициях или комбинациях.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой ВСМА-специфическую связывающую молекулу, способную связываться с ВСМА и по меньшей мере одним дополнительным антигеном. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный антиген представляет собой CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 или гликолипид F77. Примеры таких биспецифических антител описаны в WO 2017/025038.

Терапевтическое средство, такое как средство иммунотерапии, можно вводить любым подходящим способом, например, посредством болюсной инфузии, посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, окологлазничной инъекции, субретинальной инъекции, инъекции в стекловидное тело, транссклеральной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахорoidalной инъекции, внутрикамерной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, инъекции в субтенозное пространство, ретробульбарной инъекции, околобульбарной инъекции или задней окологлазничной

доставки. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство, такое как средство иммуно-терапии, вводят парентерально, внутривенным путем и интраназально и, если желательно для локального лечения, путем введения внутрь очага повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриаартериальное, внутривентральное, внутрибрюшинное, внутригрудное, внутричерепное или подкожное введение.

В определенных вариантах осуществления вводят одну или несколько доз средства привлекающей Т-клетки терапии и/или стимулятора иммунной системы. В конкретных вариантах осуществления вводят 0,001-5,000 мкг средства привлекающей Т-клетки терапии и/или стимулятора иммунной системы. В конкретных вариантах осуществления вводят от 0,001 мкг до 1,000 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 2,000 мкг до 5000 мкг средства привлекающей Т-клетки терапии. В некоторых вариантах осуществления доза привлекающей Т-клетки терапии представляет собой или включает от 0,01 мкг/кг до 100 мг/кг, от 0,1 мкг/кг до 10 мг/кг, от 10 мкг/кг до 50 мкг/кг, от 50 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, от 10 мг/кг до 100 мг/кг, от 100 мг/кг до 500 мг/кг, от 200 мг/кг до 300 мг/кг, от 100 мг/кг до 250 мг/кг, от 200 мг/кг до 400 мг/кг, от 250 мг/кг до 500 мг/кг, от 250 мг/кг до 750 мг/кг, от 50 мг/кг до 750 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, или от 100 мг/кг до 1000 мг/кг (количество средства лимфодеплекции на массу тела). В некоторых вариантах осуществления доза средства привлекающей Т-клетки терапии составляет или приблизительно составляет 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 1000 мг/кг. В конкретных вариантах осуществления привлекающую Т-клетки терапию проводят перорально, внутривенно, внутривентральное, трансдермальным путем, интратекально, внутримышечно, интраназально, трансмукозальным путем, подкожно или ректально.

В некоторых вариантах осуществления вводимая доза CAR Т-клеток может быть снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более относительно дозы CAR Т-клеток при введении в комбинации с ингибитором гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза CAR Т-клеток при комбинировании с ингибитором гамма-секретазы может быть снижена на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более относительно дозы CAR Т-клеток, вводимой без ингибитора гамма-секретазы.

2. Клеточная терапия

В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений, описанных в настоящем описании, комбинированная терапия включает проведение у индивидуума иммунной клеточной терапии, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки). Проведение такой терапии может начинаться до, после, одновременно с введением ингибитора гамма-секретазы, как описано. Иллюстративные способы клеточной терапии и модифицированные клетки для применения в предусматриваемых способах, композициях, комбинациях, наборах и применениях в рамках настоящего изобретения описаны в разделе II.

В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия представляет собой или включает введение клеток, таких как иммунные клетки, например Т-клетки или NK-клетки, которые нацелены на молекулу, экспрессируемую на поверхности очага повреждения, такого как опухоль или злокачественная опухоль. 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 рецептор антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными для индивидуума. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аллогенными для индивидуума.

В некоторых аспектах клеточная терапия представляет собой или включает терапию инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL), терапию трансгенным TCR или терапию Т-клетками, включающими генетически модифицированные клетки, такую как терапия клетками, экспрессирующими рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор специфически связывается с лигандом, таким как лиганд, ассоциированный с заболеванием или состоянием, например, ассоциированный с или экспрессируемый на клетке опухоли или злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия включает введение Т-клеток, модифицированных для экспрессии химерного рецептора антигена (CAR).

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые клетки экспрессируют и/или модифицированы 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 рецепторы антигена, не являющиеся TCR, такие как химерные рецепторы антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой CAR, который со-

держит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления лиганд, такой как антигена, представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой TCR-подобный CAR и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на клеточной поверхности в контексте молекулы основного комплекса гистосовместимости (МНС).

Модифицированные клетки, включая модифицированные клетки, содержащие рекомбинантные рецепторы, описаны в настоящем описании далее. Иллюстративные рекомбинантные рецепторы, включая CAR и рекомбинантные TCR, а также способы модификации и внесения рецепторов в клетки, включают рецепторы, описанные, например, в публикациях международных патентных заявок номер WO 200014257, WO 2013126726, WO 2012/129514, WO 2014031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061 в публикациях патентных заявок США номер US 2002131960, US 2013287748, US 20130149337, патентах США № 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118 и патентной заявке Европы номер EP2537416, и/или рецепторы, описанные 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 модифицированные рецепторы антигенов включают CAR, как описано в патенте США № 7446190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение индивидууму клеток, например Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, который специфически распознает и/или нацелен на антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью и/или находящийся на универсальной метке. В некоторых вариантах осуществления антиген, который распознается или на который нацелены Т-клетки, представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA), ROR1, карбоангидразу 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностный антиген гепатита В, рецептор фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), EPHA2, erbB2, erbB3, erbB4, димеры erbB, EGFR vIII, связывающий фолаты белок (FBP), FCRL5, FCRH5, фетальный рецептор ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептор с доменом вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, Lewis Y, L1-клеточную молекулу адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), сурвивин, TAG72, B7-H6, рецептор IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE AI, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептор фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин avb6, 8H9, NCAM, рецепторы VEGF, 5T4, фетальный AchR, лиганды NKG2D, CD44v6, двойной антиген, антиген злокачественной опухоли-семенников, мезотелин, CMV мыши, муцин 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), Her2/neu, рецептор эстрогена, рецептор прогестерона, эфрин B2, CD123, c-Met, GD-2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), CE7, антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклин, циклин A2, CCL-1, CD138, необязательно любой из вышеуказанных антигенов, являющийся человеческим; патоген-специфический антиген. В некоторых вариантах осуществления антиген, который распознается и/или на который нацелены Т-клетки, выбран из группы, состоящей из Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, ассоциированного с клеточной поверхностью муцина 1 (MUC1), эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CX3CR1, CXCL16, Delta1, Е-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α 2, IL1R1, IL1R2, IL6R и белка-предшественника амилоида (APP).

В некоторых вариантах осуществления антиген, который распознается и/или на который нацелены Т-клетки, представляет собой антиген созревания В-клеток (BCMA). Иллюстративные антигенсвязывающие домены и CAR, содержащие такие антигенсвязывающие домены, которые нацелены на или специфически связывают BCMA, известны, см., например, WO 2016/090320, WO 2016090327, WO 2010104949A2 и WO 2017173256. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, который содержит VH и VL, происходящий из антитела или фрагмента антитела, специфичного к BCMA. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, который связывает BCMA, представляет собой или содержит VH и VL из антитела или фрагмента антитела, указанного в публикациях международных патентных заявок номер WO 2016/090327 и WO 2016/090320.

Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут быть использованы совместно с предусматриваемыми способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2003/0170238, Gruenberg et al; патенте США № 4690915, выданном 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 клеточную терапию, например, адоптивную терапию Т-

клетками, проводят посредством аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от индивидуума, которому будут проводить клеточную терапию, или из образца, полученного от такого индивидуума. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают от индивидуума, например, пациента, нуждающегося в лечении, и после выделения и обработки клетки вводят тому же индивидууму.

В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную терапию Т-клетками, проводят посредством аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от индивидуума, отличного от индивидуума, которому намереваются проводить или в конечном итоге проводят клеточную терапию, например, от первого индивидуума. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому индивидууму, например, второму индивидууму, того же вида. В некоторых вариантах осуществления первый и второй индивидуумы являются генетически идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй индивидуумы являются генетически сходными. В некоторых вариантах осуществления у второго индивидуума экспрессируется тот же класс или надтип HLA, что и у первого индивидуума.

Клетки можно вводить любыми подходящими способами. Клетки вводят в режиме дозирования для достижения терапевтического эффекта, такого как снижение опухолевой нагрузки. Дозирование и введение могут частично зависеть от схемы введения ингибитора гамма-секретазы, который можно вводить до, после и/или одновременно с началом проведения терапии Т-клетками. Различные схемы дозирования терапии Т-клетками включают, но не ограничиваются ими, однократное или многократное введение на протяжении различных моментов времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

а. Композиции и составы

В некоторых вариантах осуществления доза клеток клеточной терапии, такой как терапия Т-клетками, включающая клетки, модифицированные рекомбинантным рецептором антигена, например, CAR или TCR, предоставляется в качестве композиции или состава, таких как фармацевтическая композиция или состав. Такие композиции можно использовать в соответствии с предусматриваемыми способами, например, для предупреждения или лечения заболеваний, состояний или нарушений.

В некоторых вариантах осуществления средство Т-клеточной терапии, такое как модифицированные способами инженерии Т-клетки (например, CAR Т-клетки), составляют с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретной клеткой, или средством и/или способом введения. Таким образом, 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 более консервантов. Консервант или их смесь обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% по массе всей композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и они включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметэтония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее чем приблизительно 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 (ПЭГ).

В некоторых аспектах в композиции включены буферные вещества. Подходящие буферные вещества включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используют смесь двух или более буферных веществ. Буферные вещества и их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% по массе от всей композиции. Способы получения подлежащих введению фармацевтических композиций известны. Иллюстративные способы более подробно описаны, 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, пригодного для конкретного показания, заболевания или состояния, которое предупреждают или лечат с помощью клеток или средств, где соответствующие активные ингредиенты не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Предпочтительно такие активные ингредиенты присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные вещества или лекарственные средства, такие как

химиотерапевтические средства, например, аспарагиназа, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или предупреждения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. В некоторых вариантах осуществления мониторинг терапевтической или профилактической эффективности проводят путем периодической оценки подвергаемых лечению индивидуумов. Для многократных введений на протяжении нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть пригодными другие режимы дозирования, и они могут быть определены. Требуемую дозировку можно доставлять посредством однократного болюсного введения композиции, посредством многократных болюсных введений композиции, или посредством непрерывной инфузии композиции.

Клетки можно вводить с использованием стандартных способов введения, составов и/или устройств. Предусматриваются 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 можно получать от одного индивидуума и вводить тому же индивидууму или другому совместимому индивидууму. Иммунореактивные клетки периферической крови или их потомки (например, происходящие *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить посредством локализованной инъекции, в том числе введения через катетер, системной инъекции, локализованной инъекции, внутривенной инъекции или парентерального введения. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей модифицированную способами инженерии иммунореактивную клетку), ее обычно составляют в единичной дозированной инъекционной форме (раствор, суспензия, эмульсия).

Составы включают составы для перорального, внутривенного, внутривенного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального введения или введения с помощью суппозитория. В некоторых вариантах осуществления средство или популяции клеток вводят парентерально. Термин "парентеральный", как используют в рамках изобретения, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутривенное введение. В некоторых вариантах осуществления средство или популяции клеток вводят индивидууму с использованием периферической системной доставки посредством внутривенной, внутривенной или подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления композиции предоставляют в качестве стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены для обеспечения определенного значения pH. Жидкие препараты обычно легче получить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции в некоторой степени удобнее вводить, особенно посредством инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, можно составлять в пределах подходящего диапазона вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с определенными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут включать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и подходящие их смеси.

Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или эксципиентом, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза и т.п. Композиции также могут быть лиофилизированными. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие вещества, диспергирующие вещества или эмульгаторы (например, метилцеллюлоза), pH-буферные средства, гелеобразующие средства или повышающие вязкость добавки, консерванты, вкусовые добавки, красители и т.п., в зависимости от желаемого пути введения и препарата. Для получения подходящих препаратов в некоторых аспектах можно руководствоваться стандартными справочниками.

Можно добавлять различные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предупреждение действия микроорганизмов можно обеспечивать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Длительного всасывания инъекционной фармацевтической формы можно достигать с использованием средств для замедленного всасывания, например, моностеарата алюминия и желатина.

Составы для применения для введения *in vivo* обычно являются стерильными. Стерильности можно без труда достигать, например, посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа средства или средства, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, введения средства или клеток для профилактических или терапев-

тических целей, предшествующей терапии, клинического анамнеза индивидуума и ответа на средство или клетки, и мнения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления композиции предпочтительно вводят индивидууму один раз или на протяжении серии введений.

В некоторых случаях клеточную терапию проводят в качестве единичной фармацевтической композиции, содержащей клетки. В некоторых вариантах осуществления данную дозу вводят посредством однократного болюсного введения клеток или средства. В некоторых вариантах осуществления ее вводят посредством многократного болюсного введения клеток или средства, например, на протяжении периода, составляющего не более 3 суток, или посредством введения путем непрерывной инфузии клеток или средства.

b. Схема дозирования и введение

В некоторых вариантах осуществления дозу клеток вводят индивидуумам в соответствии с предусматриваемыми способами комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления размер или время введения доз определяются в зависимости от конкретного заболевания или состояния у индивидуума. Специалист в данной области способен эмпирически определить размер или время введения доз для конкретного заболевания ввиду предоставленного описания.

В определенных вариантах осуществления клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят индивидууму в диапазоне от приблизительно 0,1 миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или это количество клеток на килограмм массы тела индивидуума, как например, от 0,1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток, или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных величин), от 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток, или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных величин), например, от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток, или диапазон, определяемый любыми двумя из вышеуказанных величин), и в некоторых случаях от приблизительно 100 миллионов клеток до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток, приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиарда клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток) или любую величину между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела индивидуума. Дозировка может варьироваться в зависимости от признаков, характерных для заболевания или нарушения, и/или пациента и/или других способов лечения. В некоторых вариантах осуществления такие величины относятся к количеству клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; в других вариантах осуществления они относятся к количеству Т-клеток, или РВМС, или всех вводимых клеток.

В некоторых вариантах осуществления например, когда индивидуумом является человек, клетки вводят в дозе общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), которая находится в диапазоне от приблизительно 1×10^6 до приблизительно $1,2 \times 10^9$ таких клеток, как например, ровно или приблизительно 1×10^7 , ровно или приблизительно 5×10^7 , ровно или приблизительно 1×10^8 , ровно или приблизительно 2×10^8 , ровно или приблизительно $2,5 \times 10^8$, ровно или приблизительно 3×10^8 , ровно или приблизительно $3,5 \times 10^8$, ровно или приблизительно 4×10^8 , ровно или приблизительно $4,5 \times 10^8$ ровно или приблизительно 5×10^8 общих таких клеток, ровно или приблизительно 6×10^8 , ровно или приблизительно 7×10^8 , ровно или приблизительно 8×10^8 , ровно или приблизительно 9×10^8 или ровно или приблизительно 1×10^9 таких клеток, или диапазон между любыми двумя из вышеуказанных величин. В некоторых вариантах осуществления, например, когда индивидуумом является человек, доза включает менее чем приблизительно или приблизительно 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС). В некоторых вариантах осуществления, например, когда индивидуумом является человек, доза включает менее чем приблизительно или приблизительно $3,0 \times 10^8$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС). В некоторых вариантах осуществления, например, когда индивидуумом является человек, доза включает менее чем приблизительно или приблизительно $1,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток

но, или приблизительно 8×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или ровно, или приблизительно 9×10^5 клеток/кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или ровно, или приблизительно 1×10^6 клеток/кг, или по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или ровно, или приблизительно 2×10^6 клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления дозу клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят индивидууму в качестве однократной дозы или вводят только один раз в течение периода, составляющего две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев, 1 год или более.

В некоторых аспектах фармацевтические композиции и составы предоставляют в композиции единичной дозированной формы, включающей количество клеток для введения в данной дозе или их часть.

В некоторых вариантах осуществления клетки дозы можно вводить посредством введения множества композиций или растворов, например, первого и второго, необязательно более, каждый из которых содержит некоторое количество клеток дозы. В некоторых аспектах множество композиций, каждая из которых содержит отличающуюся популяцию 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, которые в каждом случае индивидуально включают клетки, генетически модифицированные 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 дозу $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления введение композиции или дозы, например, введение множества композиций клеток, вовлекает введение композиций клеток по отдельности. В некоторых аспектах отдельное введение проводят 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 0 до 12 ч, от 0 до 6 ч или от 0 до 2 ч. В некоторых вариантах осуществления начало введения первой композиции и начало введения второй композиции проводят с интервалом не более 2 ч, не более 1 ч, или не более 30 мин, не более 15 мин, не более 10 мин или не более 5 мин. В некоторых вариантах осуществления начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции проводят в пределах не более 2 ч, не более 1 ч, или не более 30 мин, не более 15 мин, не более 10 мин или не более 5 мин.

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 до второй композиции.

В некоторых вариантах осуществления доза или композиция клеток включает определенное или заданное соотношение $CD4^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и $CD8^+$ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и/или $CD4^+$ клеток и $CD8^+$ клеток, которое необязательно составляет приблизительно 1:1 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, как например, приблизительно 1:1. В некоторых аспектах введение композиции или дозы с заданным или желаемым соотношением различных популяций клеток (таким как соотношение $CD4^+ : CD8^+$ или соотношение $CAR : CD4^+ : CAR : CD8^+$, например, 1:1) вовлекает введение композиции клеток, содержащей одну из популяций, а затем введение отдельной композиции клеток, содержащей другую из популяций, где введение происходит в или приблизительно в заданном или желаемом соотношении. В некоторых аспектах введение дозы или композиции клеток в определенном соотношении приводит к увеличенной экспансии, персистенции и/или противоопухолевой активности терапии Т-клетками.

В контексте адоптивной клеточной терапии введение данной "дозы" охватывает введение данного количества или числа клеток в качестве одной композиции и/или одного непрерывного введения, например, в качестве однократной инъекции или непрерывной инфузии, и также охватывает введение данного количества или числа клеток в качестве разделенной дозы, предоставленной в виде множества индивидуальных композиций или инфузий, на протяжении определенного периода времени, которое составляет не более 3 суток. Таким образом, в некоторых контекстах доза представляет собой однократное или непрерывное введение определенного количества клеток, осуществляемое или начинающееся в один момент времени. Однако в некоторых контекстах дозу вводят в виде множества инъекций или инфузий на протяжении периода, составляющего не более трех суток, например, один раз в сутки на протяжении трех суток или на протяжении двух суток, или посредством множества инфузий на протяжении одних суток.

Таким образом, в некоторых аспектах клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления клетки дозы вводят в множестве композиций, в совокупности содержащих клетки первой дозы.

Термин "разделенная доза" относится к дозе, которая разделена так, что ее вводят на протяжении более чем одних суток. Этот тип дозирования охватывается способами по настоящему изобретению и

считается однократной дозой. В некоторых вариантах осуществления клетки разделенной дозы вводят в множестве композиций, в совокупности содержащих клетки дозы, на протяжении не более чем трех суток.

Таким образом, дозу можно вводить в виде разделенной дозы. Например, в некоторых вариантах осуществления дозу можно вводить индивидууму на протяжении 2 суток или на протяжении 3 суток. Иллюстративные способы разделенного дозирования включают введение 25% дозы в первый день и введение остальных 75% дозы на второй день. В других вариантах осуществления 33% первой дозы могут быть введены в первый день, и остальные 67% могут быть введены на второй день. В некоторых аспектах 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят на второй день и 60% дозы вводят на третий день. В некоторых вариантах осуществления разделенная доза не распределена более чем на 3 суток.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят множество доз, например, две или более дозы или множество последовательных доз, клеток. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят две дозы. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят последующую дозу, например, вторую дозу, приблизительно через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 суток после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления множество последовательных доз вводят после первой дозы, так что дополнительную дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах количество клеток, вводимых индивидууму в дополнительной дозе, является таким же или сходным с первой дозой и/или последующей дозой. В некоторых вариантах осуществления дополнительная доза или дозы превышают предшествующие дозы.

В некоторых аспектах размер первой и/или последующей дозы определяется, исходя из одного или нескольких критериев, таких как ответ индивидуума на предшествующее лечение, например, химиотерапию, нагрузка заболеванием у индивидуума, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, выраженность или тип метастазов, стадия и/или вероятность или встречаемость у индивидуума развития токсических исходов, 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 последующей дозы составляет от приблизительно 9 до приблизительно 35 суток, от приблизительно 14 до приблизительно 28 суток, или от 15 до 27 суток. В некоторых вариантах осуществления введение последующей дозы проводят в момент времени более чем приблизительно 14 суток после и менее чем приблизительно 28 суток после введения первой дозы. В некоторых аспектах время между первой и последующей дозами составляет приблизительно 21 сутки. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу или дозы, например, последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. В некоторых аспектах дополнительную последующую дозу или дозы вводят по меньшей мере приблизительно через 14 и менее чем приблизительно через 28 суток после введения предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления дополнительную дозу вводят менее чем приблизительно через 14 суток после предшествующей дозы, например, через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 суток после предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления никакой дозы не вводят менее чем приблизительно через 14 суток после предшествующей дозы и/или никакой дозы не вводят более чем приблизительно 28 суток после предшествующей дозы.

В некоторых вариантах осуществления доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, включает две дозы (например, двойную дозу), включающие первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, где одна или обе из первой дозы и второй дозы включает введение разделенной дозы Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления доза клеток, как правило, является достаточно большой, чтобы она была эффективной в отношении снижения нагрузки заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления клетки вводят в требуемой дозировке, которая в некоторых аспектах включает требуемую дозу или количество клеток или типа(ов) клеток, и/или требуемое соотношение типов клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозировка клеток основана на общем количестве клеток (или количество на кг массы тела) и требуемом соотношении индивидуальных популяций или подтипов, таком как соотношение CD4⁺ и CD8⁺. В некоторых вариантах осуществления дозировка клеток основана на требуемом общем количестве (или количестве на кг массы тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типах клеток. В некоторых вариантах осуществления дозировка основана на комбинации таких признаков, таких как требуемое количество всех клеток, требуемое соотношение и требуемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

В некоторых вариантах осуществления популяции или подтипы клеток, такие как CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, вводят на уровне или в пределах допустимого различия требуемой дозы всех клеток, такой как требуемая доза Т-клеток. В некоторых аспектах требуемая доза представляет собой требуемое количество клеток или требуемое количество клеток на единицу массы тела индивидуума, которому клетки вводят, например, количество клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза находится на уровне или выше минимального количества клеток или минимального количества клеток на единицу массы тела. В некоторых аспектах, среди всех клеток, введенных в требуемой дозе, индивидуальные популяции или

подтипы присутствуют на уровне или близко к конечному соотношению (такому как соотношение CD4⁺ и CD8⁺), например, в пределах определенного допустимого различия или ошибки такого соотношения.

В некоторых вариантах осуществления клетки вводят на уровне или в пределах допустимого различия для требуемой дозы одной или нескольких отдельных популяций или подтипов клеток, такой как требуемая доза CD4⁺ клеток и/или требуемая доза CD8⁺ клеток. В некоторых аспектах требуемая доза клеток представляет собой требуемое количество клеток подтипа или популяции или требуемое количество таких клеток на единицу массы тела индивидуума, которому клетки вводят, например, количество клеток/кг. В некоторых аспектах требуемая доза находится на уровне или выше минимального количества клеток популяции или подтипа или минимального количества популяции или подтипа на единицу массы тела.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозировка основана на требуемой фиксированной дозе всех клеток и требуемом соотношении и/или основана на требуемой фиксированной дозе одного или нескольких, например каждого, из отдельных подтипов или субпопуляций. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дозировка основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и требуемом соотношении CD4⁺ и CD8⁺ клеток, и/или основана на требуемой фиксированной или минимальной дозе CD4⁺ и/или CD8⁺ клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки вводят на уровне или в пределах допустимого диапазона требуемого конечного соотношения множества популяций или подтипов клеток, таких как CD4⁺ и CD8⁺ клетки или подтипы. В некоторых аспектах требуемое соотношение может представлять собой определенное соотношение, или оно может представлять собой диапазон соотношений. Например, в некоторых вариантах осуществления требуемое соотношение (например, соотношение CD4⁺ и CD8⁺ клеток) составляет от или приблизительно от 5:1 до или до приблизительно 5:1 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 5:1), или от или приблизительно от 1:3 до или приблизительно до 3:1 (или более чем приблизительно 1:3 и менее чем приблизительно 3:1), например, от или приблизительно от 2:1 до или до приблизительно 1:5 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 2:1, например, ровно или приблизительно 5:1, 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, допустимое различие находится в пределах приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3%, приблизительно 4% приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50% от требуемого соотношения, включая любую величину между этими диапазонами.

Клетки можно вводить любым подходящим способом. Клетки вводят в режиме дозирования для достижения терапевтического эффекта, такого как снижение опухолевой нагрузки. Дозирование и введение может частично зависеть от схемы введения иммуномодулирующего соединения, которое можно вводить до, одновременно и/или после начала проведения терапии Т-клетками. Различные схемы дозирования терапии Т-клетками включают, но не ограничиваются ими, однократное или многократное введение на протяжении различных моментов времени, болюсное введение и импульсную инфузию. В определенных вариантах осуществления модифицированные Т-клетки экспрессируют рекомбинантный рецептор. В определенных вариантах осуществления модифицированные Т-клетки экспрессируют CAR.

В конкретных вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток. В других вариантах осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (РВМС).

В некоторых аспектах величину дозы определяют, исходя из одного или нескольких критериев, таких как ответ индивидуума на предшествующее лечение, например химиотерапию, нагрузка заболеванием у индивидуума, такая как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, выраженность или тип метастазов, стадия и/или вероятность или встречаемость у индивидуума токсических исходов, например, CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина против вводимых клеток и/или рекомбинантных рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы в комбинации с клетками способно повышать, например, существенно или значительно повышать, экспансию или пролиферацию клеток, и, таким образом, индивидууму можно вводить более низкую дозу клеток. В некоторых случаях предусматриваемые способы позволяют введение более низкой дозы таких клеток для достижения такой же или лучшей эффективности лечения, что и в случае дозы в способе, в котором клеточную терапию проводят без введения ингибитора гамма-секретазы, например, по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или в 10 раз более низкой, чем доза в способе, в котором клеточную терапию проводят без введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления, например, доза содержит от или приблизительно от $5,0 \times 10^6$ до $2,25 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^7$, от $5,0 \times 10^6$ до $7,5 \times 10^6$, от $7,5 \times 10^6$ до $2,25 \times 10^7$, от $7,5 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^7$, от $7,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^7$, от $7,5 \times 10^6$ до $1,0 \times 10^7$, от $1,0 \times 10^7$ до

2,25×10⁷, от 1,0×10⁷ до 2,0×10⁷, от 1,0×10⁷ до 1,5×10⁷, от 1,5×10⁷ до 2,25×10⁷, от 1,5×10⁷ до 2,0×10⁷, от 2,0×10⁷ до 2,25×10⁷. В некоторых вариантах осуществления доза клеток содержит количество клеток, которое составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10⁶, 6×10⁶, 7×10⁶, 8×10⁶, 9×10⁶, 10×10⁶ и приблизительно 15×10⁶ экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, таких как экспрессирующие рекомбинантный рецептор клетки, которые являются CD8+. В некоторых вариантах осуществления такая доза, такая как заданное количество клеток, относится к общим экспрессирующим рекомбинантный рецептор клеткам во введенной композиции.

В некоторых вариантах осуществления, например, более низкая доза содержит менее чем приблизительно 5×10⁶ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например CAR) клеток, Т-клеток и/или РВМС на килограмм массы тела индивидуума, как например, менее чем приблизительно 4,5×10⁶, 4×10⁶, 3,5×10⁶, 3×10⁶, 2,5×10⁶, 2×10⁶, 1,5×10⁶, 1×10⁶, 5×10⁵, 2,5×10⁵ или 1×10⁵ таких клеток на килограмм массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления более низкая доза содержит менее чем приблизительно 1×10⁵, 2×10⁵, 5×10⁵ или 1×10⁶ таких клеток на килограмм массы тела индивидуума или величину, находящуюся в диапазоне между любыми двумя из вышеуказанных величин. В некоторых вариантах осуществления такие величины относятся к количествам экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток; в других вариантах осуществления они относятся к количеству Т-клеток, или РВМС, или общих вводимых клеток.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму можно вводить одну или несколько последующих доз. В некоторых вариантах осуществления последующую дозу клеток вводят более чем или более чем приблизительно через 7 суток, 14 суток, 21 сутки, 28 суток или 35 суток после начала введения первой дозы клеток. Последующая доза клеток может быть большей, приблизительно такой же или меньшей чем первая доза. В некоторых вариантах осуществления проведение терапии Т-клетками, такое как введение первой и/или второй дозы клеток, можно повторять.

В некоторых вариантах осуществления начало проведения клеточной терапии, например, введения дозы клеток или первой дозы разделенной дозы клеток, проводят до (перед), одновременно с или после (последовательно или впоследствии) введения ингибитора гамма-секретазы, или его фармацевтически приемлемой соли гидрата.

В некоторых вариантах осуществления дозу клеток или последующую дозу клеток вводят одновременно с началом введения ингибитора гамма-секретазы в соответствии со способами комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления дозу клеток или последующую дозу клеток вводят в тот же день, что и начало введения ингибитора гамма-секретазы, в соответствии со способами комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления дозу клеток или последующую дозу клеток вводят в течение 1 суток, в течение 2 суток, в течение 3 суток, в течение 4 суток, в течение 5 суток, в течение 6 суток, или в течение 7 суток после начала введения ингибитора гамма-секретазы в соответствии со способами комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления дозу клеток или последующую дозу клеток вводят до начала или инициации введения ингибитора гамма-секретазы в соответствии с предусматриваемой комбинированной терапией. В некоторых вариантах осуществления дозу клеток вводят по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 1 ч, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 2 ч, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 3 ч, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 6 ч, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 12 ч, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 1 день, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 2 дня, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 3 дня, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере за 4 дня, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 5 дней, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере за 6 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 7 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 12 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 14 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 21 дня, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 15 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 28 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 30 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 35 дней, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 42 дня, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 60 дней или по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно за 90 дней до введения ингибитора гамма-секретазы в соответствии с предусматриваемой комбинированной терапией.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы происходит в соответствии с предусматриваемой комбинированной терапией в момент времени, в который предшествующее проведение иммунотерапии (например, терапии Т-клетками, такой как терапия CAR-Т-клетками) ассоциировано с или вероятно ассоциировано со снижением функциональности Т-клеток по сравнению с функциональностью Т-клеток, в момент времени непосредственно перед началом иммунотерапии (например, терапии Т-клетками, такой как терапия CAR-Т-клетками) или в предшествующий момент времени после начала терапии Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления способ вовлекает после введения дозы клеток терапии Т-клетками, например, адоптивной терапии Т-клетками, но перед введе-

нием ингибитора гамма-секретазы, оценку образца от индивидуума в отношении одной или нескольких функций Т-клеток, таких как экспансия или персистенция клеток, например, как определяют по уровню или количеству в крови, или другим фенотипа или желаемым исходам, как описано в настоящем описании, например, таким как исходы, описанные в разделе III. Различные параметры определения или оценки режима комбинированной терапии описаны в разделе III.

В. Введение ингибитора гамма-секретазы

В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений, описанных в настоящем описании, проведение комбинированной терапии может осуществляться в одной или нескольких композициях, например, фармацевтической композиции, содержащей ингибитор гамма-секретазы, и/или средство клеточной терапии, например, терапии Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает внутримембранное расщепление одного или нескольких рецепторов на клетке, например, опухолевой/злокачественной клетке. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для ингибирования внутримембранного расщепления рецептора клеточной поверхности на злокачественной/опухолевой клетке составляет менее чем приблизительно 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 0,75 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25 мкМ, 0,1 мкМ, 75 нМ, 50 нМ, 25 нМ или 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление рецептора клеточной поверхности на злокачественной/опухолевой клетке с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,35 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 1,0 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,35 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 1,0 нМ, от 1,0 нМ до 10 нМ, от 1,0 нМ до 5 нМ, от 1,0 нМ до 1 нМ, от 1,0 нМ до 0,5 нМ, от 1,0 нМ до 0,35 нМ, от 1,0 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,25 нМ до 0,35 нМ, от 0,35 нМ до 10 нМ, от 0,35 нМ до 5 нМ, от 0,35 нМ до 1 нМ, от 0,35 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ или от 5 нМ до 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для ингибирования внутримембранного расщепления рецептора клеточной поверхности на злокачественной/опухолевой клетке составляет приблизительно 10 нМ-25 нМ, 25 нМ-50 нМ, 50 нМ-75 нМ, 75 нМ-0,1 мкМ, 0,1 мкМ-0,25 мкМ, 0,25 мкМ-0,5 мкМ, 0,5 мкМ-0,75 мкМ, 0,75 мкМ-1 мкМ, 1 мкМ-10 мкМ, 10 мкМ-25 мкМ, 25 мкМ-50 мкМ, 50 мкМ-75 мкМ или 75 мкМ-100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления рецептор(ы) выбран/выбраны из группы, состоящей из антигена созревания В-клеток (BCMA), Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, ассоциированного с клеточной поверхностью муцина 1 (MUC1), эфрина В2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CX3CR1, CXCL16, Delta1, Е-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α 2, IL1R1, IL1R2, IL6R и белка-предшественника амилоида (APP). В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой ассоциированный с клеточной поверхностью муцин 1 (MUC1).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает внутримембранное расщепление одного или нескольких рецепторов, описанных выше, на клетке, например, опухолевой/злокачественной клетке, и где введение гамма-секретазы повышает уровень экспрессии рецептора на клетке. В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой поверхностный антиген созревания В-клеток (BCMA). В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы препятствует внутримембранному расщеплению поверхностного антигена созревания В-клеток (BCMA), и где IC_{50} для ингибирования расщепления поверхностного BCMA составляет менее чем приблизительно 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 0,75 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25 мкМ, 0,1 мкМ, 75 нМ, 50 нМ, 25 нМ или 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для ингибирования внутримембранного расщепления рецептора клеточной поверхности на злокачественной/опухолевой клетке составляет приблизительно 10-25 нМ, 25-50 нМ, 50-75 нМ, 75-0,1 мкМ, 0,1-0,25 мкМ, 0,25-0,5 мкМ, 0,5-0,75 мкМ, 0,75-1 мкМ, 1-10 мкМ, 10-25 мкМ, 25-50 мкМ, 50-75 мкМ или 75-100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} для ингибирования расщепления поверхностного BCMA составляет менее 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления IC_{50} ингибирования расщепления поверхностного BCMA составляет от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, или от 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, или от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,35 нМ.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы имеет низкое проникновение в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления только 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% ингибитора гамма-секретазы может проникать в головной мозг после введения.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы селективно ингибирует или снижает внутримембранное расщепление части субстратов гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы селективно ингибирует или снижает внутримембранное расщепление поверхностного антигена созревания В-клеток (BCMA).

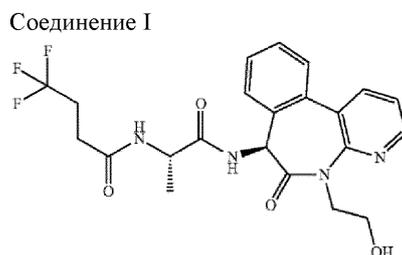
В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор из альдегидных производных пептидов, дифторке-

тонных производных, изостерных производных гидроксиэтилендипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, выбранный из производных бензодиазепинов и производных сульфонамидов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния, например, LY-411575-1 или LY685.458. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор не переходного состояния, такой как DAPT, RO4929097. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой модулятор гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления модулятор гамма-секретазы представляет собой модулятор типа нестероидного противовоспалительного лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой LY3039478, ингибитор I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцин; ингибитор II γ -секретазы (GSI II); ингибитор III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналь, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналь; ингибитор III γ -секретазы (GSI IV); ингибитор III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналь; ингибитор III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбикакло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамид; ингибитор III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитор III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитор X γ -секретазы (GSI X), трет-бутиловый эфир {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил} карбаминовой кислоты; ингибитор XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарин; ингибитор XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитор XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитор XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитор XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитор XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитор XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамид; ингибитор XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-дibenзо[b,d]азепин-7-ил)пропионамид; ингибитор XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)-ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2-,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]diazепин-3-ил)-пропионамид; ингибитор I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Ile-лейциналь; ингибитор II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; MK-0752 (Merck); MRK-003 (Merck); семагацестат/LY450139 (Eli Lilly); RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (дibenзазепин), соединения E ([2(S)-2-[(3,5-дифторфенил)ацетил]амино]-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамида], доступный от Alexis Biochemicals, LY411575 (Eli Lilly and Co.), L-685.458 (Sigma-Aldrich), BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота) (Bristol Myers Squibb).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой LY3039478 или его стереоизомер, или представляет собой фармацевтически приемлемую соль или гидрат вышеуказанных.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:

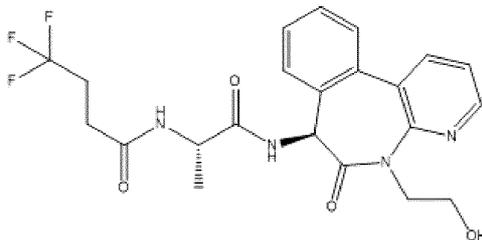


или его стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль или гидрат вышеуказанных.

В некоторых вариантах осуществления соединение 1 представляет собой единичный стереоизомер, как представлено. В некоторых случаях существует два хиральных центра, обеспечивающих четыре стереоизомера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указание на соединение 1 также включает рацемические смеси, включающие соединение 1. Конкретные стереоизомеры можно получать посредством стереоспецифического синтеза с использованием энантиомерно чистых или обогащенных исходных материалов. Конкретные стереоизомеры любого из исходных материалов, промежуточных соединений или рацемических смесей, включающих соединение 1, можно разделять способами, хорошо известными в данной области, такими как способы, приведенные в Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel and S. H. Wilen (Wiley 1994) и Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collet, and S. H. Wilen (Wiley 1991), включая хроматографию на хиральных стационарных фазах, ферментативные

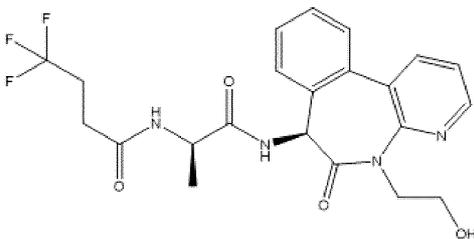
способы разделения или фракционную кристаллизацию или хроматографию диастереомеров, образованных для этой цели, таких как диастереомерные соли.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:



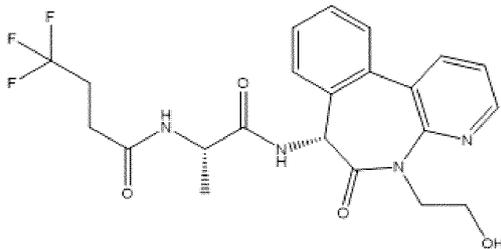
или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:



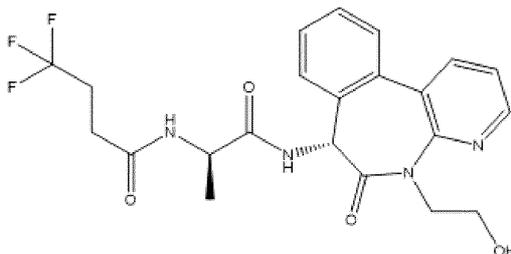
или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:



или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы представляет собой соединение структуры:



или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение 1. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 имеет наименование: 4,4,4-трифтор-N-[(1S)-2-[[[(7S)-5-(2-гидроксиэтил)-6-оксо-7H-пиридо[2,3-d][3]бензазепин-7-ил]амино]-1-метил-2-оксоэтил]бутанамид; и также может иметь наименование: N-[(1S)-2-[[[(7S)-6,7-дигидро-5-(2-гидроксиэтил)-6-оксо-5H-пиридо[3,2-a][3]бензазепин-7-ил]амино]-1-метил-2-оксоэтил]-4,4,4-трифторбутанамид; и могут использоваться другие именованные для однозначной идентификации соединения 1. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 известно как LY3039478. Также см. опубликованную заявку РСТ № WO 2013/016081 для синтеза и получения соединения 1.

1. Композиции и составы

В некоторых вариантах осуществления способов комбинированной терапии, композиций, комбинаций, наборов и применений, описанных в настоящем описании, комбинированную терапию можно проводить введением в одной или нескольких композициях, например, фармацевтической композиции, содержащей ингибитор гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль гидрата.

В некоторых вариантах осуществления композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль гидрата, может включать носители, такие как разбавитель, адъювант, эксципиент или наполнитель, с которым можно вводить

ингибитор гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль гидрата и/или клетки. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" E. W. Martin. Такие композиции содержат терапевтически эффективное количество ингибитора гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемой соли гидрата, как правило, в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, так чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. Также в качестве жидких носителей можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, в частности, для инъекционных растворов. Фармацевтические композиции могут содержать один или несколько из разбавителя(ей), адьюванта(ов), антиадгезива(ов), связующего вещества(веществ), покрытия(ий), наполнителя(ей), вкусовой добавки(добавок), красителя(ей), смазывающего вещества(веществ), вещества(веществ), способствующего скольжению, консерванта(ов), детергента(ов), сорбента(ов), эмульгатора(ов), фармацевтического эксципиента(ов), pH-буферного средства(средств), или подсластителя(ей) и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой жидкость, твердое вещество, лиофилизированный порошок, гелеобразную форму и/или их комбинацию. В некоторых аспектах выбор носителя частично определяется конкретным ингибитором и/или способом введения.

Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и они включают, но не ограничиваются ими: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметэтония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; 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 (ПЭГ), стабилизаторы и/или консерванты. Композиции, содержащие ингибитор гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль гидрата, также могут быть лиофилизированными.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции можно составлять для введения любым путем, известным специалистам в данной области, включая внутримышечное, внутривенное, внутрикожное, проводимое внутрь очага повреждения введение, 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 предусматриваются другие способы введения. В некоторых вариантах осуществления введение проводят посредством болюсной инфузии, посредством инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, окологлазничной инъекции, субретинальной инъекции, инъекции в стекловидное тело, трансептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахороидальной инъекции, внутрикамерной инъекции, субконъюнктивной инъекции, инъекции в субтеноново пространство, ретробульбарной инъекции, околубульбарной инъекции или задней окологлазничной доставки. В некоторых вариантах осуществления введение проводят парентеральным, внутривенным, и интраназальным путем, и, если желательно для местного лечения, посредством введения в очаг повреждения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления данную дозу вводят посредством однократного болюсного введения. В некоторых вариантах осуществления ее вводят посредством многократных болюсных введений, например, на протяжении периода не более 3 суток, или посредством непрерывного инфузионного введения.

В некоторых вариантах осуществления введение может быть локальным, местным или системным, в зависимости от области лечения. В некоторых вариантах осуществления локальное введение в область, нуждающуюся в лечении, можно проводить посредством, например, но не ограничиваясь ими, локальной инфузии в ходе хирургической операции, местного нанесения, например, совместно с наложением повязки после хирургической операции, посредством инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория или посредством имплантата. В некоторых вариантах осуществления композиции также можно вводить с другими биологически активными средствами, либо последовательно, либо поочередно, либо в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления введение также может включать системы контролируемого высвобождения, включающие составы контролируемого высвобождения и устройства контролируемого высвобождения, например, посредством насоса. В некоторых вариантах осуществления введение является пероральным.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически и терапевтически активные соединения и

их производные, как правило, составляют и вводят в единичных дозированных формах или многократных дозированных формах. Такая однократная доза содержит заданное количество терапевтически активного соединения, достаточное для обеспечения желаемого терапевтического эффекта, совместно с требуемым фармацевтическим носителем, наполнителем или разбавителем. В некоторых вариантах осуществления единичные дозированные формы включают, но не ограничиваются ими, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии, и пероральные растворы или суспензии, и эмульсии масло-вода, содержащие подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых производных. Единичные дозированные формы могут включать ампулы и шприцы или индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Единичные дозированные формы можно вводить их частями или множествами. В некоторых вариантах осуществления многократная доза представляет собой множество идентичных единичных дозированных форм, упакованных в один контейнер для введения в отдельной единичной дозированной форме. Примеры многодозовых форм включают флаконы, бутылки с таблетками или капсулами или бутылки объемом, составляющим пинты или галлоны.

2. Схема дозирования ингибитора гамма-секретазы

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ комбинированной терапии вовлекает введение индивидууму терапевтически эффективного количества ингибитора гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемой соли гидрата, и проведение клеточной терапии, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемой соли гидрата начинают до, после, в ходе, в ходе курса, одновременно, практически одновременно, последовательно и/или поочередно с проведением клеточной терапии, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления способ вовлекает начало введения ингибитора гамма-секретазы, или его фармацевтически приемлемой соли гидрата, перед проведением терапии Т-клетками. В других вариантах осуществления способ вовлекает начало введения ингибитора гамма-секретазы, или его фармацевтически приемлемой соли гидрата после проведения клеточной терапии (например, терапии CAR-экспрессирующими Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления схема дозирования включает начало введения ингибитора гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемой соли гидрата одновременно или совместно с проведением клеточной терапии (например, терапии CAR-экспрессирующими Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль вводят курсом. В некоторых вариантах осуществления курс включает период введения, в ходе которого вводят ингибитор гамма-секретазы, после которого следует период покоя, в ходе которого ингибитор гамма-секретазы не вводят. В некоторых вариантах осуществления общее количество дней в курсе, например от начала введения ингибитора гамма-секретазы, составляет более чем, или приблизительно более чем, или приблизительно 1 суток, 3 суток, 7 суток, 14 суток, 21 сутки, 28 суток, 30 суток, 40 суток, 50 суток, 60 суток или более.

В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы проводят по меньшей мере в ходе одного курса и начало проведения клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками) происходит в тот же день, необязательно одновременно. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы по меньшей мере в ходе одного курса происходит до начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы по меньшей мере в ходе одного курса происходит одновременно или в тот же день, что и начало проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят за от или приблизительно от 0 до 30 суток, например, от 0 до 15 суток, от 0 до 6 суток, от 0 до 96 ч, от 0 до 24 ч, от 0 до 12 ч, от 0 до 6 ч, или от 0 до 2 ч, от 2 ч до 15 суток, от 2 ч до 6 суток, от 2 до 96 ч, от 2 до 24 ч, от 2 до 12 ч, от 2 до 6 ч, от 6 ч до 30 суток, от 6 ч до 15 суток, от 6 ч до 6 суток, от 6 до 96 ч, от 6 до 24 ч, от 6 до 12 ч, от 12 ч до 30 суток, от 12 ч до 15 суток, от 12 ч до 6 суток, от 12 до 96 ч, от 12 до 24 ч, от 24 ч до 30 суток, от 24 ч до 15 суток, от 24 ч до 6 суток, от 24 до 96 ч, от 96 ч до 30 суток, от 96 ч до 15 суток, от 96 ч до 6 суток, от 6 суток до 30 суток, от 6 суток до 15 суток, или от 15 суток до 30 суток до начала клеточной терапии (например, терапии CAR-экспрессирующими Т-клетками). В некоторых аспектах ингибитор гамма-секретазы вводят не более чем приблизительно за 96 ч, 72 ч, 48 ч, 24 ч, 12 ч, 6 ч, 2 ч или 1 ч до начала терапии Т-клетками.

В некоторых из любых таких вариантов осуществления, в которых гамма-секретазы или его фармацевтически приемлемую соль гидрата вводят перед клеточной терапией (например, терапией Т-клетками, такой как терапия CAR-Т-клетками), введение ингибитора гамма-секретазы продолжается с регулярными интервалами до начала клеточной терапии и/или в течение некоторого периода времени после начала клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят или дополнительно вводят после проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками, такой как терапии CAR-Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 96 ч, 4 суток, 5 суток, 6 суток или 7 суток, 14

суток, 15 суток, 21 суток, 24 суток, 28 суток, 30 суток, 36 суток, 42 суток, 60 суток, 72 суток или 90 суток после начала проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы вовлекают продолжение введения, например, с регулярными интервалами, ингибитора гамма-секретазы после начала проведения клеточной терапии. Например, ингибитор гамма-секретазы вводят с регулярными интервалами, составляющими каждые сутки, раз в двое суток, раз в трое суток, три раза в неделю или один раз в неделю в течение некоторого периода времени.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят, например с регулярными интервалами, как описано, в течение вплоть до или приблизительно вплоть до 1 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 2 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 3 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 4 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 5 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 6 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 7 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 12 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 14 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 21 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 24 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 28 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 30 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 35 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 42 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 60 суток или вплоть до или приблизительно вплоть до 90 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 120 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 180 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 240 суток, вплоть до или приблизительно вплоть до 360 суток, или вплоть до или приблизительно вплоть до 720 суток или более после проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками, такой как терапия CAR-Т-клетками).

В некоторых из любых таких вариантов осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят до или после начала проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками, такой как терапия CAR-Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы происходит в момент или после, необязательно сразу после или в пределах 1-3 суток после: (i) обнаружения пикового или максимального уровня клеток терапии Т-клетками в крови индивидуума; (ii) того, как количество клеток терапии Т-клетками, обнаруживаемое в крови, после того, как обнаруживалось в крови, не обнаруживается или снижается, необязательно снижается, по сравнению с предшествующим моментом времени после проведения терапии Т-клетками; (iii) снижения количества клеток терапии Т-клетками, обнаруживаемых в крови, в или более чем в 1,2 раза, в 1,5 раза, в 2,0 раза, в 3,0 раза, в 4,0 раза, в 5,0 раз, в 10 раз или более по сравнению с пиковым или максимальным количеством клеток терапии Т-клетками, обнаруживаемым в крови индивидуума после начала проведения терапии Т-клетками; (iv) того, как на момент времени после обнаружения пикового или максимального уровня клеток терапии Т-клетками в крови индивидуума, количество Т-клеток или клеток, происходящих из Т-клеток, обнаруживаемое в крови индивидуума, составляет менее 10%, менее 5%, менее 1% или менее 0,1% от общего количества мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в крови индивидуума; (v) наличия у индивидуума прогрессирования заболевания и/или рецидива после ремиссии после терапии Т-клетками; и/или (iv) наличия у индивидуума увеличенной опухолевой нагрузки по сравнению с опухолевой нагрузкой в момент времени до или после введения Т-клеток и до начала введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых аспектах начало введения ингибитора гамма-секретазы происходит в момент после рецидива или предположительного или вероятного рецидива после проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками, такой как терапия CAR Т-клетками). В некоторых случаях клеточная терапия представляет собой терапию Т-клетками с CAR против ВСМА и ингибитор гамма-секретазы вводят в момент времени после рецидива или предположительного или вероятного рецидива после проведения терапии Т-клетками с CAR против ВСМА.

В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы по меньшей мере в ходе одного курса происходит после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы происходит по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 1 сутки, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 2 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 3 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 4 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 5 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 6 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 7 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 8 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 9 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 10 суток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно через 12 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 14 суток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно через 15 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 21 сутки, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно через 24 дня, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 28 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 30 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 35 суток или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 42 дня, по мень-

шей мере или приблизительно по меньшей мере через 60 суток, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере через 90 суток после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы проводят по меньшей мере через 2 суток после, по меньшей мере через 1 неделю после, по меньшей мере через 2 недели после, по меньшей мере через 3 недели после, или по меньшей мере через 4 недели после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы проводят через 2-28 суток или 7-21 сутки после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления начало введения ингибитора гамма-секретазы проводят в момент времени более чем или приблизительно более чем через 14 суток, 15 суток, 16 суток, 17 суток, 18 суток, 19 суток, 20 суток, 21 сутки, 24 дня или 28 суток после начала проведения клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят несколько раз в сутки, два раза в сутки, каждые сутки, раз в двое суток, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю после начала клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят каждые сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят три раза в сутки. В других вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят раз в двое суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят каждые сутки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе периода введения на протяжении множества последовательных дней, например, в течение вплоть до приблизительно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более 30 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в течение более чем или приблизительно более чем 7 последовательных дней, более чем или приблизительно более чем 14 последовательных дней, более чем или приблизительно более чем 21 последовательных дней, более чем или приблизительно более чем 21 последовательных дней, или более чем или приблизительно более чем 28 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе периода введения вплоть до 21 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе периода введения вплоть до 21 последовательных дней, где курс включает более 30 суток, начиная после начала введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе периода введения не более чем приблизительно 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или не более 30 последовательных дней. В определенных вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят один раз в сутки на протяжении 14 суток в ходе курса лечения из 21 суток. В определенных вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят один раз в сутки в течение 21 суток на протяжении курса лечения из 28 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе периода введения в течение не более 14 последовательных суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе курса, где курс включает введение ингибитора гамма-секретазы в течение множества последовательных дней, за которыми следует период покоя, в ходе которого ингибитор гамма-секретазы не вводят. В некоторых вариантах осуществления период покоя составляет более приблизительно 1 суток, более приблизительно 3 последовательных дней, более приблизительно 5 последовательных дней, более приблизительно 7 последовательных дней, более приблизительно 8 последовательных дней, более приблизительно 9 последовательных дней, более приблизительно 10 последовательных дней, более приблизительно 11 последовательных дней, более приблизительно 12 последовательных дней, более приблизительно 13 последовательных дней, более приблизительно 14 последовательных дней, более приблизительно 15 последовательных дней, более приблизительно 16 последовательных дней, более приблизительно 17 последовательных дней, более приблизительно 18 последовательных дней, более приблизительно 19 последовательных дней, более приблизительно 20 последовательных дней или более приблизительно 21 или более последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления период покоя составляет более 7 последовательных дней, более 14 последовательных дней, более 21 дней или более 28 дней. В некоторых вариантах осуществления период покоя составляет более 14 последовательных дней. В некоторых вариантах осуществления курс введения ингибитора гамма-секретазы не включает период покоя.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в ходе курса, где курс повторяют по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят на протяжении по меньшей мере 2 курсов, по меньшей мере 3 курсов, по меньшей мере 4 курсов, по меньшей мере 5 курсов, по меньшей мере 6 курсов, по меньшей мере 7 курсов, по меньшей мере 8 курсов, по меньшей мере 9 курсов, по меньшей мере 10 курсов, по меньшей мере 11 курсов или по меньшей мере 12 курсов. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят на протяжении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 курсов.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят по меньшей мере шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, раз в трое суток, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю или только один раз до или после начала проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингиби-

тор гамма-секретазы вводят три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора проводят в ходе курса лечения, который составляет по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 14 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 21 сутки или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 28 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в множестве доз с регулярными интервалами до, в ходе, в ходе курса и/или после периода проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят за одну или несколько доз с регулярными интервалами перед проведением клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят за одну или несколько доз с регулярными интервалами после проведения клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько доз ингибитора гамма-секретазы можно вводить одновременно с введением дозы клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления доза, частота, длительность, расписание и/или порядок введения гамма-секретазы определяются, исходя из конкретных пороговых значений или критериев результатов стадии скрининга и/или оценки исходов лечения, описанных в настоящем описании, например, описанных в разделе III настоящего описания.

В некоторых вариантах осуществления способ вовлекает проведение клеточной терапии у индивидуума, которому ранее вводили терапевтически эффективное количество ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят индивидууму до введения дозы клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления лечение ингибитором гамма-секретазы происходит в то же время, что и введение дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят после введения дозы клеток.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы проводят в ходе периода введения от 2 до 28 суток, такого как 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят каждые сутки на протяжении 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят два раза в сутки на протяжении 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят три раза в сутки на протяжении 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят раз в двое суток на протяжении 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят три раза в неделю на протяжении 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят на 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 и 18 сутки после начала проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, введение ингибитора гамма-секретазы и проведение клеточной терапии осуществляют одновременно или практически одновременно.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в общей суточной дозировке не более или приблизительно не более 50 мг/сутки, 100 мг/сутки, 150 мг/сутки, 175 мг/сутки, 200 мг/сутки, 250 мг/сутки, 300 мг/сутки, 350 мг/сутки, 400 мг/сутки, 450 мг/сутки, 500 мг/сутки, 600 мг/сутки, 700 мг/сутки, 800 мг/сутки или менее. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят или каждое введение ингибитора независимо проводят в количестве от 0,5 мг до 500 мг, от 0,5 мг до 250 мг, от 0,5 мг до 100 мг, от 0,5 мг до 50 мг, от 0,5 мг до 25 мг, от 0,5 мг до 10 мг, от 0,5 мг до 5,0 мг, от 0,5 мг до 2,5 мг, от 0,5 мг до 1,0 мг, от 1,0 мг до 500 мг, от 1,0 мг до 250 мг, от 1,0 мг до 100 мг, от 1,0 мг до 50 мг, от 1,0 мг до 25 мг, от 1,0 мг до 10 мг, от 1,0 мг до 5,0 мг, от 1,0 мг до 2,5 мг, от 2,5 мг до 500 мг, от 2,5 мг до 250 мг, от 2,5 мг до 100 мг, от 2,5 мг до 50 мг, от 2,5 мг до 25 мг, от 2,5 мг до 10 мг, от 2,5 мг до 5,0 мг, от 5,0 мг до 500 мг, от 5,0 мг до 250 мг, от 5,0 мг до 100 мг, от 5,0 мг до 50 мг, от 5,0 мг до 25 мг, от 5,0 мг до 10 мг, от 10 мг до 500 мг, от 10 мг до 250 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 50 мг, от 10 мг до 25 мг, от 25 мг до 500 мг, от 25 мг до 250 мг, от 25 мг до 100 мг, от 25 мг до 50 мг, от 50 мг до 500 мг, от 50 мг до 250 мг, от 50 мг до 100 мг, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 250 мг или 250 мг до 500 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор вводят или каждое введение ингибитора независимо проводят в количестве, которое составляет по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или составляет, или приблизительно составляет 0,5 мг, 1,0 мг, 2,5 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, 25 мг, 50 мг, 100 мг, 250 мг или 500 мг. В некоторых вариантах осуществления количество представляет собой количество ингибитора гамма-секретазы для введения один раз в сутки. Такие дозировки можно вводить с регулярными интервалами, как описано, такими как раз в двое суток, раз в трое суток, три раза в неделю или один раз в неделю на протяжении периода введения. В некоторых вариантах осуществления период введения составляет от 2 до 28 суток, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в дозировке от приблизительно 1 мг до приблизительно 20 мг, например, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг, от приблизительно 2,5 мг до приблизительно 7,5 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 15 мг, как

например, приблизительно 5 мг, 10 мг, 15 мг или 20 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в дозе от ровно или приблизительно 10 мкг/кг до ровно или приблизительно 5 мг/кг, например, от ровно или приблизительно 50 мкг/кг до ровно или приблизительно 2 мг/кг, от ровно или приблизительно 50 мкг/кг до ровно или приблизительно 1 мг/кг, от ровно или приблизительно 50 мкг/кг до ровно или приблизительно 500 мкг/кг, от ровно или приблизительно 50 мкг/кг до ровно или приблизительно 250 мкг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до ровно или приблизительно 200 мкг/кг, от ровно или приблизительно 50 до ровно или приблизительно 100 мкг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до ровно или приблизительно 1 мг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до ровно или приблизительно 500 мкг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до ровно или приблизительно 250 мкг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до ровно или приблизительно 200 мкг/кг, от ровно или приблизительно 100 мкг/кг до ровно или приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от ровно или приблизительно 200 мкг/кг до ровно или приблизительно 1 мг/кг, от ровно или приблизительно 200 мкг/кг до ровно или приблизительно 200 мкг/кг до ровно или приблизительно 500 мкг/кг, от ровно или приблизительно 500 мкг/кг, от ровно или приблизительно 200 мкг/кг до ровно или приблизительно 250 мкг/кг или от ровно или приблизительно 250 мкг/кг до ровно или приблизительно 2 мг/кг, от ровно или приблизительно 250 мкг/кг до ровно или приблизительно 1 мг/кг, от ровно или приблизительно 250 мкг/кг до ровно или приблизительно 500 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в дозе от ровно или приблизительно 400 мкг/кг до ровно или приблизительно 600 мкг/кг, такой как ровно или приблизительно 500 мкг/кг. В некоторых вариантах осуществления количество представляет собой количество ингибитора гамма-секретазы для введения один раз в сутки. Такие дозировки можно вводить с регулярными интервалами, как описано, такими как раз в двое суток, раз в трое суток, три раза в неделю или один раз в неделю на протяжении периода введения. В некоторых вариантах осуществления период введения составляет от 2 до 28 суток, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в общей суточной дозировке по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 0,1 мг в сутки, 0,5 мг в сутки, 1,0 мг в сутки, 2,5 мг в сутки, 5 мг в сутки, 10 мг в сутки, 25 мг в сутки, 50 мг в сутки или 100 мг в сутки. В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора составляет приблизительно 25 мг в сутки. В конкретных вариантах осуществления доза ингибитора составляет или приблизительно составляет 10 мг в сутки. Такие дозировки можно вводить с регулярными интервалами, как описано, такими как раз в двое суток, раз в трое суток, три раза в неделю или один раз в неделю на протяжении периода введения. В некоторых вариантах осуществления период введения составляет от 2 до 28 суток, как например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в количестве более чем или приблизительно более чем 1 мг, 2,5 мг, 5 мг, 7,5 мг, 10 мг, 15 мг и менее 25 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят в количестве более чем или приблизительно более чем 1 мг в сутки, 2,5 мг в сутки, 5 мг в сутки, 7,5 мг в сутки, 10 мг в сутки, 15 мг в сутки и менее чем 25 мг в сутки. Такие дозировки можно вводить с регулярными интервалами, как описано, например, раз в двое суток, раз в трое суток, три раза в неделю или один раз в неделю на протяжении периода введения. В некоторых вариантах осуществления период введения составляет от 2 до 28 суток, например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или более 21 суток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят на 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 и 18 сутки после начала проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками).

В некоторых вариантах осуществления дозировки, такие как суточные дозировки, вводят в одной или нескольких разделенных дозах, таких как 2, 3 или 4 дозы, или в одном составе. Ингибитор гамма-секретазы можно вводит отдельно, в присутствии фармацевтически приемлемого носителя, или в присутствии других терапевтических средств.

Специалисту в данной области будет понятно, что можно использовать более высокие или более низкие дозировки ингибитора гамма-секретазы, например, в зависимости от конкретного средства и пути введения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы можно вводить отдельно или в форме фармацевтической композиции, где соединение находится совместно или в смеси с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или разбавителями. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы можно вводить либо системно, либо локально в орган или ткань, подвергаемые лечению. Иллюстративные пути введения включают, но не ограничиваются ими, местный, инъекционный (такой как подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутривенный, внутривенный, внутривенный, пероральный, сублингвальный, ректальный, трансдермальный, интраназальный, вагинальный и ингаляционный пути. В некоторых вариантах осуществления путь введения является пероральным, парентеральным, ректальным, назальным, местным или глазным путем, или ингаляционным путем. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят пероральным путем. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы 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 корректировать для профилактического или поддерживающего лечения. Например, дозировку или частоту введения, или обе из них, можно снижать в зависимости от симптомов до уровня, при котором поддерживается желаемый терапевтический или профилактический эффект. Если симптомы смягчаются до надлежащего уровня, лечение можно прекращать. Однако пациентам может потребоваться повторная терапия на длительной основе при каком-либо рецидиве симптомов. Пациентам также может потребоваться длительное лечение на длительной основе.

3. Дополнительная терапия

В некоторых аспектах предусматриваемые способы, кроме того, могут включать проведение одной или нескольких терапий с лимфодеплецией, например, перед или одновременно с началом проведения клеточной терапии (например, терапии Т-клетками). В некоторых вариантах осуществления терапия с лимфодеплецией включает введение фосфамида, такого как циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления терапия с лимфодеплецией может включать введение флударабина.

В некоторых аспектах предварительное лечение индивидуумов посредством терапии с иммунодеплецией (например, лимфодеплецией) может улучшать эффекты адоптивной клеточной терапии (АСТ). Предварительное лечение средствами лимфодеплеции, включая комбинации циклоспорина и флударабина, было эффективным в отношении повышения эффективности перенесенных инфильтрирующих опухоль лимфоцитарных (TIL) клеток при клеточной терапии, в том числе в отношении улучшения ответа и/или персистенции перенесенных клеток. См., например, Dudley et al., *Science*, 298, 850-54 (2002); Rosenberg et al., *Clin Cancer Res*, 17(13):4550-4557 (2011). Аналогично, в контексте CAR+ Т-клеток несколько исследований включали средства лимфодеплеции, наиболее часто циклофосфамид, флударабин, бендамустин или их комбинации, иногда в сопровождении облучения в низкой дозе. См. Han et al. *Journal 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 лечение можно проводить с целью уменьшения риска одного или нескольких различных исходов, которые могут снизить эффективность терапии. Они включают явление, известное как "цитокиновый слив", когда Т-клетки, В-клетки, NK-клетки конкурируют с TIL за гомеостатические и активирующие цитокины, такие как IL-2, IL-7, и/или IL-15; подавление TIL регуляторными Т-клетками, NK-клетками или другими клетками иммунной системы; влияние негативных регуляторов в микроокружении опухоли. Muranski et al., *Nat Clin Pract Oncol*. December; 3(12): 668-681 (2006).

Таким образом в некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ дополнительно вовлекает проведение терапии с лимфодеплецией у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ вовлекает проведение терапии с лимфодеплецией у индивидуума до введения дозы клеток. В некоторых вариантах осуществления терапия с лимфодеплецией включает химиотерапевтическое средство, такое как флударабин и/или циклофосфамид. В некоторых вариантах осуществления введение клеток и/или проведение терапии с лимфодеплецией проводят посредством амбулаторной доставки.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение средства предварительной терапии, такого как средство лимфодеплеции или химиотерапевтическое средство, такое как циклофосфамид, флударабин или их комбинации, индивидууму до введения дозы клеток. Например, индивидууму можно вводить средство предварительной терапии по меньшей мере за 2 суток до, например, по меньшей мере за 3, 4, 5, 6 или 7 суток до первой или последующей дозы. В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят средство предварительной терапии не более чем за 7 суток до, например, не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 суток до введения дозы клеток.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума предварительно лечат циклофосфамидом в дозе от или приблизительно от 20 мг/кг до 100 мг/кг площади поверхности тела индивидуума, например, от или приблизительно 40 мг/кг до 80 мг/кг. В некоторых аспектах индивидуума предварительно лечат ровно или приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления флударабин можно вводить в однократной дозе или его можно вводить в множестве доз, например, вводить каждые сутки, раз в двое суток или раз в трое суток. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят один раз в сутки на протяжении одних или двух суток. В некоторых вариантах осуществления, когда средство лимфодеплеции включает циклофосфамид, индивидууму вводят циклофосфамид в дозе от или приблизительно от 100 мг/м² до 500 мг/м² площади поверхности тела индивидуума, например, от или приблизительно от 200 мг/м² до 400 мг/м², или от 250 мг/м² до 350 мг/м², включительно. В некоторых случаях индивидууму вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид можно вводить в однократной дозе или его можно вводить в множестве доз, например, вводимых каждые сутки, раз в двое суток или раз в трое суток. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят каждые сутки, например, в течение 1-5 суток, например, в течение от 2 до 4 суток. В некоторых случаях индивидууму вводят приблизительно 300 мг/м² площади поверхности тела индивидуума циклофосфамида каждые сутки в течение 3 суток, перед началом клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления, когда средство лимфодеплеции включает флударабин, индивидууму вводят флударабин в дозе от или приблизительно от 1 мг/м² до 100 мг/м² площади поверхности тела индивидуума, например, от или приблизительно от 10 мг/м² до 75 мг/м², от 15 мг/м² до 50 мг/м², от 20 мг/м² до 30 мг/м², от 20 мг/м² до 40 мг/м², от 24 мг/м² до 35 мг/м², или от 24 мг/м² до 26 мг/м², в каж-

дом случае включительно. В некоторых случаях индивидууму вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина. В некоторых случаях индивидууму вводят 25 мг/м² флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин можно вводить в однократной дозе или можно вводить в множестве доз, например, вводимых каждые сутки, раз в двое суток или раз в трое суток. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят каждые сутки, например, в течение 1-5 суток, например, в течение 3-5 суток или в течение 3-4 суток. В некоторых случаях индивидууму вводят приблизительно 30 мг/м² площади поверхности тела индивидуума флударабин каждые сутки в течение 3 суток перед началом клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления средство лимфодеплеции включает комбинацию средств, такую как комбинация циклофосфида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать циклофосфамид в любой дозе или по любой схеме введения, таких как описаны выше, и флударабин в любой дозе или по любой схеме введения, таких как описаны выше. Например, в некоторых аспектах индивидууму вводят 60 мг/кг (~2 г/м²) циклофосфида и от 3 до 5 доз 25 мг/м² флударабина перед дозой клеток. В некоторых аспектах индивидууму вводят флударабин в дозе или приблизительно в дозе 30 мг/м² площади поверхности тела индивидуума каждые сутки, и циклофосфамид в дозе или приблизительно в дозе 300 мг/м² площади поверхности тела индивидуума каждые сутки в течение 3 суток.

В одном иллюстративном режиме дозирования перед введением первой дозы индивидуумам вводят ингибитор гамма-секретазы за 1 сутки до введения клеток и предварительную химиотерапию с лимфодеплецией из циклофосфида и флударабина (CY/FLU), которую проводят по меньшей мере за двое суток до первой дозы CAR-экспрессирующих клеток и, как правило, не более чем за 7 суток до введения клеток. В другом иллюстративном режиме дозирования индивидуумам вводят ингибитор гамма-секретазы одновременно с введением клеток, например, в тот же день. В другом иллюстративном режиме дозирования индивидуумам вводят ингибитор гамма-секретазы через несколько суток после введения клеток, например, через 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 суток. В некоторых случаях, например, циклофосфамид вводят через от 24 до 27 суток после введения ингибитора гамма-секретазы. После предварительного лечения индивидуумам вводят дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления введение средства предварительной терапии перед инфузией дозы клеток улучшает исход лечения. Например, в некоторых аспектах предварительное лечение повышает эффективность лечения дозой или повышает персистенцию клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки) у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления предварительное лечение повышает выживаемость без заболевания, такую как процент индивидуумов, которые живы и демонстрируют отсутствие минимального остаточного или молекулярно обнаруживаемого заболевания после данного периода времени после доз клеток. В некоторых вариантах осуществления время срединной выживаемости без заболевания возрастает.

После введения клеток индивидууму (например, человеку), в некоторых аспектах биологическую активность модифицированных клеточных популяций измеряют любым из ряда известных способов. Параметры оценки включают специфическое связывание модифицированных или природных Т-клеток или других иммунных клеток с антигеном *in vivo*, например, посредством визуализации, или *ex vivo*, например, посредством ELISA или проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени можно определять с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, такого как анализ цитотоксичности, описанный, 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 определенных вариантах осуществления биологическую активность клеток также можно определять 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 исхода, такого как снижение опухолевой массы или нагрузки. В некоторых аспектах оценивают токсические исходы, персистенцию и/или экспансию клеток, и/или наличие или отсутствие иммунного ответа хозяина.

В некоторых вариантах осуществления введение средства предварительной терапии перед инфузией дозы клеток улучшает исход лечения, например, посредством повышения эффективности лечения дозой, или повышает персистенцию клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки) у индивидуума. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления доза средства предварительной терапии, вводимая в способе, который представляет собой комбинированную терапию ингибитора гамма-секретазы и клеточной терапии, превышает дозу, вводимую в способе без ингибитора гамма-секретазы.

II. Клеточная терапия и модификация клеток

В некоторых вариантах осуществления клеточная терапия (например, терапия Т-клетками) для применения в соответствии с предусматриваемыми способами комбинированной терапии включает введение модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, сконструированные для распознавания и/или специфического связывания с молекулами, ассоциированными с заболеванием или состоянием, и приводит к ответу, такому как иммунный ответ, против таких молекул при связывании с такими молекулами. Рецепторы могут включать химерные рецепторы, например, химерные рецепторы

антигена (CAR) и другие трансгенные рецепторы антигенов, включая трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR).

В некоторых вариантах осуществления клетки содержат или модифицированы для того, чтобы они содержали модифицированный способами инженерии рецептор, например, модифицированный способами инженерии рецептор антигена, такой как химерный рецептор антигена (CAR), или Т-клеточный рецептор (TCR). Также предусматриваются популяции таких клеток, композиции, содержащие такие клетки и/или обогащенные такими клетками, например, в которых клетки определенного типа, такие как Т-клетки или CD8⁺ или CD4⁺ клетки, подвергнуты увеличению в количестве или селекции. К композициям относятся фармацевтические композиции и составы для введения, такие как композиции и составы для адоптивной клеточной терапии. Также предусматриваются способы терапии для введения клеток и композиций индивидуумам, например, пациентам.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или нескольких нуклеиновых кислот, введенных способами генной инженерии, и, тем самым, экспрессируют рекомбинантные или модифицированные способами генной инженерии продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос генов проводят сначала путем стимуляции клеток, например, комбинирования их со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживаемость и/или активация, например, как определяют по экспрессии цитокина или маркера активации с последующей трансдукцией активированных клеток и увеличения в количестве в культуре до количеств, достаточных для клинических применений.

А. Рекомбинантные рецепторы

Клетки, как правило, экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как рецепторы антигенов, включающие функциональные рецепторы антигенов не TCR, например, химерные рецепторы антигенов (CAR), и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR). Также к рецепторам относятся другие химерные рецепторы.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемых способов и применений рекомбинантные рецепторы, включая химерные рецепторы, такие как химерные рецепторы антигенов, содержат один или несколько доменов, которые сочетают в себе лиганд-связывающий домен (например антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность в отношении желаемого антигена (например, опухолевого антигена), с внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой активирующую часть внутриклеточного домена, такую как активирующий Т-клетки домен, предоставляющий первичный сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен для облегчения эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления химерные рецепторы, когда они введены способами генной инженерии в иммунные клетки, могут модулировать активность Т-клеток и в некоторых случаях могут модулировать дифференцировку и гомеостаз Т-клеток, тем самым обеспечивая генетически модифицированные клетки с увеличенной длительностью действия, выживаемостью и/или персистенцией *in vivo*, например, для применения в способах адоптивной клеточной терапии.

1. Химерные рецепторы антигенов (CAR)

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются модифицированные клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют CAR со специфичностью в отношении конкретного антигена (или маркера, или лиганда, или рецептора), такого как антиген, экспрессируемый на поверхности конкретного типа клеток.

В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор, содержит внутриклеточную сигнальную область, которая включает цитоплазматический сигнальный домен (также взаимозаменяемо называемый внутриклеточным сигнальным доменом), такой как цитоплазматическая (внутриклеточная) область, способная индуцировать сигнал первичной активации в Т-клетках, например, цитоплазматический сигнальный домен компонента Т-клеточного рецептора (TCR) (например, цитоплазматический сигнальный домен зета-цепи CD3 (CD3ζ) или его функциональный вариант или сигнальная часть) и/или который содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM).

В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор дополнительно содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, который специфически связывается с лигандом (например, антигеном). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR, который содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления лиганд, такой как антиген, представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, как правило, вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельную область легкой цепи (V_L) антитела, например, scFv-фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой TCR-подобный CAR и антиген представляет собой процессированный пептидный антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы основного комплекса

гистосовместимости (МНС).

Иллюстративные рецепторы антигенов, включая CAR, и способы модификации и введения таких рецепторов в клетки включают рецепторы и способы, которые описаны, например, в публикациях международных патентных заявок номер WO 200014257, WO 2013126726, WO 2012/129514, WO 2014031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061, WO 2016/0046724, WO 2016/014789, WO 2016/090320, WO 2016/094304, WO 2017/025038, WO 2017/173256, в публикациях патентных заявок США номер US 2002131960, US 2013287748, US 20130149337, в патентах США № 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353, 8479118 и 9765342, и в патентной заявке Европы номер EP2537416, и/или рецепторы и способы, описанные Sadelain et al., *Cancer Discov.*, 3(4): 388-398 (2013); Davila et al., *PLoS ONE* 8(4): e61338 (2013); Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 24(5): 633-39 (2012); Wu et al., *Cancer*, 18(2): 160-75 (2012). В некоторых аспектах рецепторы антигенов включают CAR, как описано в патенте США № 7446190, и CAR, описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, как описано в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO 2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190, патент США № 8389282, Kochenderfer et al., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al., *J. Immunother.* 35(9): 689-701 (2012); и Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 5(177) (2013). Также см. WO 2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патенте США № 7446190, патенте США № 8389282, WO 2016/090320, WO 2016090327, WO 2010104949A2 и WO 2017173256.

В некоторых вариантах осуществления конструируют CAR, обладающий специфичностью к конкретному антигену (или маркеру, или лиганду, или рецептору), такому как антиген, экспрессирующийся в конкретном типе клеток, подлежащем нацеливанию посредством адоптивной терапии, например, маркер злокачественной опухоли и/или антиген, предназначенный для индукции торможения ответа, такой как антиген, экспрессирующийся на нормальном или не связанным с заболеванием типе клеток. Таким образом, CAR, как правило, включает в его внеклеточной части одну или несколько антигенсвязывающих молекул, таких как один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или несколько вариабельных доменов антител, и/или молекул антител. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), происходящий из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) моноклонального антитела (mAb).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть экспрессируется на клетках в качестве части рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. К рецепторам антигенов относятся функциональные не являющиеся TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигенов (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может обозначаться как TCR-подобный CAR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный к комплексу МНС-пептид TCR-подобного CAR, связан с одним или несколькими компонентами внутриклеточной передачи сигнала, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен(ы). В некоторых вариантах осуществления такие молекулы, как правило, имитируют или приблизительно соответствуют сигналу через природный рецептор антигенов, такой как TCR, и, необязательно, сигналу через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор, такой как химерный рецептор (например, CAR), включает лиганд-связывающий домен, который связывается, например, специфически связывается, с антигеном (или лигандом, или рецептором). Среди антигенов, на которые нацелены химерные рецепторы, представлены антигены, экспрессирующиеся в контексте заболевания, состояния или типа клеток, подлежащих нацеливанию посредством адоптивной клеточной терапии. Среди заболеваний и состояний представлены пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и нарушения, включая рак и опухоли, включая гематологические злокачественные опухоли, злокачественные опухоли иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как В, Т и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы.

В некоторых вариантах осуществления антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, например, на опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или не являющимися мишенями клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на модифицированных клетках.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), которые специфически распознают антиген, такой как интактный антиген, экспрессирующийся на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд, или рецептор) представляет собой

опухолевый антиген или маркер злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой или включает интегрин $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3, B7-H6, карбоангидразу 9 (CA9, также известная CAIX или G250), антиген злокачественной опухоли-семенников, антиген злокачественной опухоли/семенников 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), карциноэмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, лиганд 1 хемокина с C-C-мотивом (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), мутант рецептора эпидермального фактора роста типа III (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин B2, рецептор эфрина A2 (EPHa2), рецептор эстрогенов, Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5; также известный как гомолог 5 Fc-рецептора или FCRH5), фетальный рецептор ацетилхолина (фетальный AchR), связывающий фолаты белок (FBP), рецептор фолатов альфа, ганглиозид GD2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан 3 (GPC3), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, высокомолекулярный ассоциированный меланомой антиген человека (HMW-MAA), поверхностный антиген гепатита В, лейкоцитарный антиген человека A1 (HLA-A1), лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2), рецептор IL-22 альфа (IL-22Ra), рецептор IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), CE7-эпитоп из L1-CAM, содержащий лейцин-богатый повтор представитель A семейства 8 (LRRC8A), Lewis Y, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, мезотелин (MSLN), с-Met, цитомегаловирус мышей (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды представителя D группы 2 натуральный киллеров (NKG2D), мелан А (MART-1), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), онкофетальный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), рецептор прогестерона, простатспецифический антиген, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор 1 (ROR1), сурвивин, гликопротеин трофобластов (TPBG, также известный 5T4), ассоциированный с опухолью гликопротеин 72 (TAG72), родственный тирозиназе белок 1 (TRP1, также известный как TYRP1 или gp75), родственный тирозиназе белок 2 (TRP2, также известный как допахром таутомераза, допахром дельта-изомераза или DCT), рецептор сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецептор 2 сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR2), антиген 1 опухоли Вильмса (WT-1), патоген-специфический или экспрессируемый патогеном антиген, или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточной злокачественной опухолью, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой или включает BCMA, CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

В некоторых вариантах осуществления антиген (или лиганд) представляет собой или включает орфанный тирозинкиназный рецептор ROR1, антиген созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразу 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и поверхностный антиген гепатита В, рецептор фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеры erbB, EGFR vIII, фолат-связывающий белок (FBP), FCRL5, FCRH5, фетальный рецептор ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептор с доменом вставки киназы (kdr), легкую цепь каппа, Lewis Y, молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), меланомо-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), сурвивин, TAG72, B7-H6, IL-13 рецептор альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептор фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин $\alpha v \beta 6$, 8H9, NCAM, рецепторы VEGF, 5T4, фетальный AchR, лиганды NKG2D, CD44v6, двойной антиген, антиген злокачественной опухоли-семенников, мезотелин, CMV мыши, муцин 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), Her2/neu, рецептор эстрогенов, рецептор прогестерона, эфрин B2, CD123, с-Met, GD-2, O-ацетилированный GD2 (OGD2), CE7, антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклин, циклин A2, CCL-1, CD138, патоген-специфический антиген и антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами. Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточной злокачественной опухолью, такие как любой из ряда известных В-клеточных маркеров. В некоторых вариантах осуществления антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30.

Антигены, на которые нацелены рецепторы, в некоторых вариантах осуществления включают орфанный тирозинкиназный рецептор ROR1, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, CEA и по-

верхностный антиген гепатита В, рецептор фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетальный рецептор ацетилхолина e, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкую цепь каппа, Lewis Y, молекулу клеточной адгезии L1, MAGE-A1, мезотелин, MUC1, MUC16, PSCA, лиганды NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетальный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбриональный антиген (CEA), простатспецифический антиген, PSMA, Her2/neu, рецептор эстрогенов, рецептор прогестерона, эфрин B2, CD123, c-Met, GD-2, и MAGE A3, CE7, антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклин, такой как циклин A1 (CCNA1), и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые ВИЧ, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых вариантах осуществления CAR является специфическим для вирусных антигенов (таких как ВИЧ, HCV, HBV, и т.д.), бактериальных антигенов и/или паразитических антигенов.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит TCR-подобное антитело, такое как антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), которые специфически распознают внутриклеточный антиген, такой как ассоциированный с опухолью антиген, презентуемый на поверхности в качестве комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которая распознает комплекс МНС-пептид, может экспрессироваться на клетках в качестве части рекомбинантного рецептора, такого как рецептор антигена. Среди рецепторов антигенов представлены функциональные не являющиеся TCR рецепторы антигенов, такие как химерные рецепторы антигена (CAR). Как правило, CAR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который демонстрирует TCR-подобную специфичность, направленную против комплексов пептид-МНС, также может обозначаться как TCR-подобный CAR.

Указание на "Основной комплекс гистосовместимости" (МНС) относится к белку, главным образом, гликопротеину, который содержит полиморфный пептид-связывающий центр или связывающую бороздку, которая в некоторых случаях может образовывать комплекс с пептидными антигенами полипептидов, включая пептидные антигены, процессируемые клеточным аппаратом. В некоторых случаях молекулы МНС могут экспонироваться или экспрессироваться на клеточной поверхности, в том числе в качестве 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 представляют собой гетеродимеры, имеющие проходящую через мембрану α -цепь, в некоторых случаях с тремя α -доменами, и нековалентно связанный β 2-микроглобулин. Как правило, молекулы МНС класса II состоят из двух трансмембранных гликопротеинов, α и β , оба из которых, как правило, проходят через мембрану. Молекула МНС может включать эффективную часть МНС, которая содержит антигенсвязывающий центр или центры для связывания пептида и последовательностей, необходимых для распознавания соответствующим рецептором антигена. В некоторых вариантах осуществления молекулы МНС класса I доставляют пептиды, образующиеся в цитозоле, на клеточную поверхность, где комплекс МНС-пептид распознается Т-клетками, в основном CD8⁺ Т-клетками, но в некоторых случаях CD4⁺ Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления молекулы МНС класса II доставляют пептиды, образующиеся в везикулярной системе, на клеточную поверхность, где они обычно распознаются CD4⁺ Т-клетками. В основном, молекулы МНС кодируются группой связанных локусов, которые в совокупности называются H-2 у мыши и лейкоцитарным антигеном человека (HLA) у человека. Таким образом, обычно МНС человека также может упоминаться как лейкоцитарный антиген человека (HLA).

Термины "комплекс МНС-пептид" или "комплекс пептид-МНС", или их варианты, относятся к комплексу или ассоциации пептидного антигена и молекулы МНС, обычно, путем нековалентных взаимодействий пептида связывающей бороздке или щели молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления комплекс МНС-пептид презентуется или экспонируется на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления комплекс МНС-пептид может специфически распознаваться рецептором антигена, таким как TCR, TCR-подобный CAR или его антигенсвязывающие части.

В некоторых вариантах осуществления пептид, такой как пептидный антиген или эпитоп, полипептида может ассоциировать с молекулой МНС, например, для распознавания рецептором антигена. Как правило, пептид происходил или основан на фрагменте более длинной биологической молекулы, такой как полипептид или белок. В некоторых вариантах осуществления пептид обычно имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 24 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептид имеет длину от или от приблизительно 9 до 22 аминокислот для распознавания в комплексе с МНС класса II. В некоторых вариантах осуществления пептид имеет длину от или от приблизительно 8 до 13 аминокислот для распознавания в комплексе с МНС класса I. В некоторых вариантах осуществления при распознавании пептида в контексте молекулы МНС, таком как комплекс МНС-пептид, рецептор антигена, такой как TCR или TCR-подобный CAR, генерирует или запускает сигнал активации на Т-клетках, который индуцирует Т-клеточный ответ, такой как пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов, ответ цитотоксических Т-клеток или другой ответ.

В некоторых вариантах осуществления TCR-подобное антитело или антигенсвязывающая часть известны или могут быть получены способами, известными в данной области (см., например, опублико-

ванные заявки США № US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US 20090226474; US 20090304679; и международную публикацию PCT № WO 03/068201).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, которые специфически связываются с комплексом МНС-пептид, можно получать путем иммунизации хозяина эффективным количеством иммуногена, содержащего конкретный комплекс МНС-пептид. В некоторых случаях пептид комплекса МНС-пептид представляет собой эпитоп антигена, способного связываться с МНС, такого как опухолевый антиген, например, универсальный опухолевый антиген, антиген миеломы или другой антиген. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество иммуногена затем вводят хозяину для индукции иммунного ответа, где иммуноген сохраняет его трехмерную форму в течение периода времени, достаточного для индукции иммунного ответа против трехмерной конфигурации пептида в связывающей бороздке молекулы МНС. Затем сыворотку, полученную от хозяина, анализируют для определения того, продуцируются ли требуемые антитела, которые распознают трехмерную конфигурацию пептида в связывающей бороздке молекулы МНС. В некоторых вариантах осуществления продуцированные антитела можно оценивать для подтверждения того, что антитело может отличать комплекс МНС-пептид от молекулы МНС отдельно, представляющего интерес пептида отдельно и комплекса МНС и постороннего пептида. Затем требуемые антитела можно выделять.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, которая специфически связывается с комплексом МНС-пептид, можно получать с использованием способов дисплея на библиотеках, таких как фаговые библиотеки антител. В некоторых вариантах осуществления можно получать, например, библиотеки фагового дисплея мутантного Fab, scFv или других форм антител, в которых представители библиотеки являются мутантными по одному или нескольким остаткам CDR или нескольких CDR. См., например, опубликованную заявку США № US 20020150914, US 2014/0294841; и Cohen CJ. et al. (2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332.

Термин "антитело" в рамках настоящего изобретения используют в наиболее широком значении, и он включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антител, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, рекомбинантные IgG (rIgG)-фрагменты, переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и фрагменты в виде однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, наноантитело). Термин охватывает модифицированные способами генной инженерии и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интраантитела, пептидантитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгированные антитела, полиспецифические, например, биспецифические антитела, диантитела, триантитела и тетраантитела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если нет иных указаний, термин "антитело" следует понимать как охватывающее функциональные фрагменты антител. Также термин охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD. В определенных вариантах осуществления мультиспецифические связывающие молекулы, например, мультиспецифические химерные рецепторы, такие как мультиспецифические CAR, могут содержать любые из мультиспецифических антител, включая, например, биспецифические антитела, мультиспецифические одноцепочечные антитела, например, диантитела, триантитела и тетраантитела, тандемные ди-scFv и тандемные три-scFv.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления тяжелые и легкие цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv)). В других вариантах осуществления константную область тяжелой цепи антитела выбирают, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбирают из, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (например, IgG1 человека). В другом варианте осуществления константную область легкой цепи антитела выбирают, например, из каппа или лямбда, в частности, каппа.

К предусматриваемым антителам относятся фрагменты антител. "Фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диантитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен в предусматриваемых CAR представляет собой или содержит фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L). В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи, такие как scFv.

Термин "переменная область" или "переменный домен" относится к домену тяжелой или легкой

цепи антитела, который вовлечен в связывание антитела с антигеном. Варибельные 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 обеспечения специфичности связывания антигена. Более того, антитела, которые связывают конкретный антиген, можно выделять с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_L или V_H , соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Термины "определяющая комплементарность область" и "CDR", являющиеся синонимами "гиперварибельной области" или "HVR", известны в данной области и относятся к не являющимся смежными последовательностям аминокислот в варибельных областях антитела, которые обеспечивают специфичность к антигену и/или аффинность связывания. Как правило, существует три CDR в каждой варибельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой варибельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). "Каркасные области" и "FR" известны в данной области и относятся к не являющимся CDR частям варибельных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, существует четыре FR в каждой полноразмерной варибельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4), и четыре FR в каждой полноразмерной варибельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

Точные границы аминокислотных последовательностей данных CDR или FR могут быть без труда определены 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." ("контактная" схема нумерации); 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"); Honninger 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, в то время как схема Chothia основана на структурной информации. Нумерация согласно как схеме Kabat, так и схеме Chothia, основана на наиболее частых длинах последовательностей областей антител со вставками, указываемыми буквами вставок, например "30a", и делециями в некоторых антителах. Эти две схемы размещают определенные инсерции и делеции ("инсерции-делеции") в различных положениях, что приводит к дифференциальной нумерации. Контактная схема основана на анализе комплексных кристаллических структур и является сходной во многих аспектах со схемой нумерации Chothia. Схема AbM является компромиссом между определениями по Kabat и по Chothia на основе определений, используемых программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular.

В табл. 1, ниже приведены иллюстративные положения границ CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, идентифицированных согласно схемам Kabat, Chothia, AbM и контактной, соответственно. Для CDR-H1, нумерация остатков приведена с использованием схем нумерации как Kabat, так и Chothia. FR находятся между CDR, например, причем FR-L1 находится перед CDR-L1, FR-L2 находится между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 находится между CDR-L2 и CDR-L3 и т.д. Следует отметить, что, поскольку показанная схема нумерации Kabat помещает инсерции в положения H35A и H35B, конец петли CDR-H1 Chothia, когда его нумеруют с использованием показанных правил нумерации Kabat, варьирует между H32 и H34, в зависимости от длины петли.

Таблица 1
Границы CDR согласно различным схемам нумерации

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Контактная
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 по Kabat ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Нумерация по 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 нет иных указаний, следует понимать, что "CDR" или "определяющая комплементарность область" или индивидуальные точно определенные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такой как его переменная область, охватывают (или точно определяют) определяющую комплементарность область, как определено в соответствии с любой из вышеупомянутых схем или другими известными схемами. Например, когда утверждается, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в данной аминокислотной последовательности области V_H или V_L , понятно, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в переменной области, как определено в соответствии с любой из вышеупомянутых схем или другими известными схемами. В некоторых вариантах осуществления конкретные последовательности CDR точно определены. Иллюстративные последовательности CDR предусматриваемых антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что предусматриваемое антитело может включать CDR, как описано в соответствии с любой из вышеупомянутых схем нумерации или другими схемами нумерации, известными специалисту в данной области.

Аналогично, если нет иных указаний, FR или индивидуальная точно определенная FR (несколько FR) (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4), данного антитела или его области, такой как его переменная область, следует понимать как охватывающую (или точно определяющую) каркасную область, как определено в соответствии с любой из известных схем. В некоторых случаях схема идентификации конкретной CDR, FR, или нескольких FR или нескольких CDR указана в качестве CDR, определяемой способом Kabat, Chothia, AbM или контактным способом, или в соответствии с другими известными схемами. В других случаях приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывает антиген, такой как маркер злокачественной опухоли или антиген клеточной поверхности клетки или заболевания, подлежащих нацеливанию, таких как опухолевая клетка или злокачественная клетка, такой как любой из описанных в настоящем описании или антигенов-мишеней, известных в данной области.

Фрагменты антител можно получать различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой фрагменты, полученные рекомбинантными способами, такие как фрагменты, содержащие расположение элементов, которое не встречается в природе, такие как фрагменты, в которых две или более областей или цепей антитела соединены синтетическими линкерами, например, пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены расщеплением ферментом встречающегося в природе интактного антитела. В некоторых аспектах, фрагменты антител представляют собой scFv.

"Гуманизированное" антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR происходят из не являющихся человеческими CDR и все или по существу все аминокислотные остатки FR происходят из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую из антитела человека. "Гуманизированная форма" не являющегося человеческого антитела относится к варианту не являющегося человеческого антитела, который претерпел гуманизацию, как правило, для уменьшения им-

муногенности у человека, при сохранении специфичности и аффинности исходного не являющегося человеческим антителом. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизованном антителе заменены соответствующими остатками из не являющегося человеческого антитела (например, антитело, из которого происходят остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена, в том числе TCR-подобные CAR, включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, такой как одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), или диантитело, или однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой однодоменное антитело, содержащее только V_H-область. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, содержащий переменную область (V_H) тяжелой цепи и переменную область (V_L) легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, такой как scFv, который включает один или несколько линкеров, соединяющих два домена или области антитела, таких как переменная область (V_H) тяжелой цепи и переменная область (V_L) легкой цепи. Линкер, как правило, представляет собой пептидный линкер, например, гибкий и/или растворимый пептидный линкер. К линкерам относятся линкеры, богатые глицином и серином и/или в некоторых случаях треонином. В некоторых вариантах осуществления линкеры дополнительно включают заряженные остатки, такие как лизин и/или глутамат, которые могут повышать растворимость. В некоторых вариантах осуществления линкеры дополнительно включают один или несколько остатков пролина. В некоторых аспектах линкеры, богатые глицином и серином (и/или треонином), включают по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% такой аминокислоты(аминокислот). В некоторых вариантах осуществления они включают по меньшей мере ровно или приблизительно 50%, 55%, 60%, 70% или 75% глицина, серина и/или треонина. В некоторых вариантах осуществления линкер по существу полностью состоит из глицина, серина и/или треонина. Линкеры, как правило, имеют длину от приблизительно 5 до приблизительно 50 аминокислот, как правило, от ровно или приблизительно 10 до ровно или приблизительно 30, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, и в некоторых вариантах от 10 до 25 аминокислот. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие различные количества повторов последовательности GGGGS (4GS; SEQ ID NO: 26) или GGS (3GS; SEQ ID NO: 27), например, 2, 3, 4 или 5 повторов такой последовательности. Иллюстративные линкеры включают линкеры, имеющие или состоящие из последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 28 (GGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 29 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG), SEQ ID NO: 30 (SRGGGSGGGSGGGGSLEMA) или SEQ ID NO: 38 (ASGGGSGGRASGGGS).

В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR против BCMA, который является специфичным в отношении BCMA, например, BCMA человека. Химерные рецепторы антигенов, содержащие антитела против BCMA, включая антитела мыши против BCMA человека и антитела человека против BCMA человека, и клетки, экспрессирующие такие химерные рецепторы, описаны ранее. См. Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060, US 9765342, WO 2016/090320, WO 2016090327, WO 2010104949A2, WO 2016/0046724, WO 2016/014789, WO 2016/090320, WO 2016/094304, WO 2017/025038 и WO 2017173256. В некоторых вариантах осуществления CAR против BCMA содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и/или переменную область легкой цепи (V_L), происходящую из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO 2016090327. В некоторых вариантах осуществления CAR против BCMA содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и/или переменную область легкой цепи (V_L), происходящую из антитела, описанного в WO 2016/090320 или WO 2016090327. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L). В некоторых аспектах область V_H представляет собой или включает аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью области V_H, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18, 20, 22, 24, 32, 34, 36, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 145, 147, 149 и 151; и/или область V_L представляет собой или включает аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью области V_L, приведенной в любой из SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25, 33, 35, 37, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 146, 148, 150 и 152.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 18, и V_L, указанную в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv, содержит V_H, указанную в SEQ ID NO: 20, и V_L, указанную в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, такой как scFv,

CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176, 177 и 175, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, 179 и 175, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент предусматриваемого CAR содержит область V_H , которая имеет CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, 181 и 182, соответственно, и область V_L , которая имеет CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187 и 185, соответственно. В некоторых вариантах осуществления область V_H содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, и область V_L содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, такой как scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 188, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 188. В некоторых вариантах осуществления CAR против ВСМА имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ NO: 124 или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления CAR против ВСМА имеет последовательность аминокислот, приведенную в SEQ NO: 125, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает sdAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит последовательность, по меньшей мере или приблизительно на 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, указанной в SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления к таким антителам или антигенсвязывающим доменам в предусматриваемых CAR относятся антитела, способные связывать белок ВСМА, такой как белок ВСМА человека, обладающий по меньшей мере определенной аффинностью при определении любым из ряда известных способов. В некоторых вариантах осуществления аффинность отображается посредством равновесной константы диссоциации (K_D); в некоторых вариантах осуществления аффинность отображается посредством EC_{50} .

В некоторых вариантах осуществления к таким антителам или антигенсвязывающим доменам в предусматриваемых CAR относятся антитела, или антигенсвязывающие домены, или CAR, в которых связывание с растворимым или высвободившимся белком ВСМА составляет менее чем, или равно, или приблизительно 10% от связывания антитела со связанным с мембраной белком ВСМА.

Известны различные способы анализа для оценки аффинности связывания и/или определения того, связывается ли связывающая молекула (например, антитело или его фрагмент) специфически с конкретным лигандом (например, антигеном, таким как белок ВСМА). Специалист в данной области способен определить аффинность связывания связывающей молекулы, например антитела, в отношении антигена, например ВСМА. Например, в некоторых вариантах осуществления можно использовать устройство VIAcoqe® для определения кинетики и констант связывания для комплекса между двумя белками (например, антитело или его фрагмент, и антиген, такой как белок клеточной поверхности ВСМА, растворимый белок ВСМА), с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (см., например, Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; и патенты США № 5283173, 5468614, или эквивалент).

SPR измеряет изменения концентрации молекул на поверхности сенсора по мере связывания молекул или диссоциации их с поверхности. Изменение сигнала SPR прямо пропорционально изменению

массовой концентрации вблизи к поверхности, тем самым позволяя измерение кинетики связывания между двумя молекулами. Константу диссоциации для комплекса можно определять путем мониторинга изменений индекса рефракции в зависимости от времени по мере прохождения буфера над чипом. Другие подходящие способы анализа для определения связывания одного белка с другим включают, например, способы иммуноанализа, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунный анализ (RIA), или определение связывания путем мониторинга изменения спектроскопических или оптических свойств белков посредством флуоресценции, УФ-поглощения, кругового дихроизма или ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Другие иллюстративные способы анализа включают, но не ограничиваются ими, вестерн-блоттинг, ELISA, аналитическое ультрацентрифугирование, спектроскопию, проточную цитометрию, секвенирование и другие способы детекции экспрессируемых полинуклеотидов или связывания белков.

В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, например, антитело или его фрагмент, или антигенсвязывающий домен CAR, связывается, например, специфически связывается, с антигеном, например, белком ВСМА клеточной поверхности или растворимым белком ВСМА, или их эпитопом, с аффинностью или K_A (т.е. равновесная константа ассоциации для конкретной реакции связывания с единицами $1/M$; равная соотношению константы скорости ассоциации [k_{on} или k_a] и константы скорости диссоциации [k_{off} или k_d] для этой реакции ассоциации, предполагая бимолекулярное взаимодействие), равной или превышающей $10^5 M^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления антитело, или его фрагмент, или антигенсвязывающий домен CAR демонстрирует аффинность связывания в отношении пептидного эпитопа с K_D (т.е. равновесная константа диссоциации для конкретного связывающего взаимодействия с единицами M ; равная соотношению константы скорости диссоциации [k_{off} или k_d] и константы скорости ассоциации [k_{on} или k_a] для этой реакции ассоциации, предполагая бимолекулярное взаимодействие), равной или меньшей $10^{-5} M$. Например, равновесная константа диссоциации K_D находится в диапазоне от $10^{-5} M$ до $10^{-13} M$, таком как от $10^{-7} M$ до $10^{-11} M$, от $10^{-8} M$ до $10^{-10} M$, или от $10^{-9} M$ до $10^{-10} M$. Константа скорости ассоциации (on-rate; k_{on} или k_a ; единицы $1/MC$) и константу скорости диссоциации (off-rate; k_{off} или k_d ; единицы $1/c$) можно определять с использованием любого из способов анализа, известных в данной области, например, поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или константа диссоциации антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) или антигенсвязывающего домена CAR с белком ВСМА, таким как белок ВСМА человека, составляет от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $500 nM$, от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $400 nM$, от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $100 nM$, от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $50 nM$, от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $10 nM$, от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $1 nM$, от или приблизительно от $0,01 nM$ до приблизительно $0,1 nM$, от или приблизительно от $0,1 nM$ до приблизительно $500 nM$, от или приблизительно от $0,1 nM$ до приблизительно $400 nM$, от или приблизительно от $0,1 nM$ до приблизительно $100 nM$, от или приблизительно от $0,1 nM$ до приблизительно $10 nM$, от или приблизительно от $0,1 nM$ до приблизительно $1 nM$, от или приблизительно от $0,5 nM$ до приблизительно $200 nM$, от или приблизительно от $1 nM$ до приблизительно $500 nM$, от или приблизительно от $1 nM$ до приблизительно $100 nM$, от или приблизительно от $1 nM$ до приблизительно $50 nM$, от или приблизительно от $1 nM$ до приблизительно $10 nM$, от или приблизительно от $2 nM$ до приблизительно $50 nM$, от или приблизительно от $10 nM$ до приблизительно $500 nM$, от или приблизительно от $10 nM$ до приблизительно $100 nM$, от или приблизительно от $10 nM$ до приблизительно $50 nM$, от или приблизительно от $50 nM$ до приблизительно $500 nM$, от или приблизительно от $50 nM$ до приблизительно $100 nM$ или от или приблизительно от $100 nM$ до приблизительно $500 nM$. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или равновесная константа диссоциации, K_D , антитела в отношении белка ВСМА, такого как белок ВСМА человека, составляет ровно, или менее чем, или приблизительно $400 nM$, $300 nM$, $200 nM$, $100 nM$, $50 nM$, $40 nM$, $30 nM$, $25 nM$, $20 nM$, $19 nM$, $18 nM$, $17 nM$, $16 nM$, $15 nM$, $14 nM$, $13 nM$, $12 nM$, $11 nM$, $10 nM$, $9 nM$, $8 nM$, $7 nM$, $6 nM$, $5 nM$, $4 nM$, $3 nM$, $2 nM$ или $1 nM$, или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с белком ВСМА, таким как белок ВСМА человека, с субнаномолярной аффинностью связывания, например, с аффинностью связывания менее чем приблизительно $1 nM$, такой как менее чем приблизительно $0,9 nM$, приблизительно $0,8 nM$, приблизительно $0,7 nM$, приблизительно $0,6 nM$, приблизительно $0,5 nM$, приблизительно $0,4 nM$, приблизительно $0,3 nM$, приблизительно $0,2 nM$ или приблизительно $0,1 nM$, или менее.

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания может быть классифицирована как высокая аффинность или как низкая аффинность. В некоторых случаях, связывающая молекула (например, антитело или его фрагмент), или антигенсвязывающий домен CAR, которые демонстрируют аффинность связывания от низкой до умеренной, демонстрируют K_A вплоть до $10^7 M^{-1}$, вплоть до $10^6 M^{-1}$, вплоть до $10^5 M^{-1}$. В некоторых случаях, связывающая молекула (например, антитело или его фрагмент), которая демонстрирует высокую аффинность связывания с конкретным эпитопом, взаимодействует с таким эпитопом с K_D по меньшей мере $10^7 M^{-1}$, по меньшей мере $10^8 M^{-1}$, по меньшей мере $10^9 M^{-1}$, по меньшей мере $10^{10} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{11} M^{-1}$, по меньшей мере $10^{12} M^{-1}$ или по меньшей мере 10^{13}

M^{-1} . В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или равновесная константа диссоциации, K_D , связывающей молекулы, например, антитела против ВСМА, или его фрагмента, или антигенсвязывающего домена CAR, с белком ВСМА, составляет от или приблизительно от 0,01 нМ до приблизительно 1 мкМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 50 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 500 нМ, от 10 нМ до 100 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 100 нМ или от 100 нМ до 500 нМ. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания (EC_{50}) и/или равновесная константа диссоциации, K_D , связывающей молекулы, например, антитела против ВСМА или его фрагмента, или антигенсвязывающего домена CAR, с белком ВСМА, составляет ровно, или приблизительно, или менее чем, или приблизительно 1 мкМ, 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 25 нМ, 20 нМ, 19 нМ, 18 нМ, 17 нМ, 16 нМ, 15 нМ, 14 нМ, 13 нМ, 12 нМ, 11 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, или 1 нМ или менее. Степень аффинности конкретного антитела можно сравнивать с аффинностью известного антитела, такого как эталонное антитело (например, эталонное антитело против ВСМА).

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания антитела против ВСМА или антигенсвязывающего домена CAR в отношении отличающейся формы или топологического типа антигенов, например, растворимого или высвободившегося белка ВСМА, по сравнению с аффинностью связывания с мембраносвязанным ВСМА, используют для определения предпочтительного связывания или относительной аффинности в отношении конкретной формы или топологического типа. Например, в некоторых аспектах антитела против ВСМА или антигенсвязывающий домен CAR могут демонстрировать предпочтительное связывание с мембраносвязанным ВСМА по сравнению с растворимым или высвобождаемым ВСМА, и/или демонстрируют более высокую аффинность связывания в отношении мембраносвязанного ВСМА по сравнению с растворимым или высвобождаемым ВСМА. В некоторых вариантах осуществления равновесную константу диссоциации, K_D , в отношении отличающейся формы или топологического типа белков ВСМА можно сравнивать для определения предпочтительного связывания или относительной аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное связывание или относительная аффинность в отношении мембраносвязанного ВСМА по сравнению с растворимым или высвобождаемым ВСМА, может быть высокой. Например, в некоторых случаях соотношение K_D для растворимого или высвобождаемого ВСМА и K_D для мембраносвязанного ВСМА составляет более 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 2000 или более и антитело или антигенсвязывающий домен предпочтительно связывает или обладает более высокой аффинностью связывания в отношении мембраносвязанного ВСМА. В некоторых случаях соотношение K_A для мембраносвязанного ВСМА и K_A для растворимого или высвобождаемого ВСМА составляет более 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000, 2000 или более и антитело или антигенсвязывающий домен предпочтительно связывает или обладает более высокой аффинностью связывания в отношении мембраносвязанного ВСМА. В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий домен CAR связывает растворимый или высвобождаемый ВСМА и мембраносвязанный ВСМА в сходной степени, например, соотношение K_D в отношении растворимого ВСМА и K_D в отношении мембраносвязанного ВСМА равно или приблизительно равно 1. В некоторых случаях антитело или антигенсвязывающий домен CAR связывает растворимый или высвобождаемый ВСМА и мембраносвязанный ВСМА в сходной степени, например, соотношение K_A в отношении растворимого ВСМА и K_A в отношении мембраносвязанного ВСМА равно или приблизительно равно 1. Степень предпочтительного связывания или относительной аффинности в отношении мембраносвязанного ВСМА или растворимого или высвобождаемого ВСМА можно сравнивать со степенью связывания известного антитела, такого как эталонное антитело (например, эталонный CAR против ВСМА). В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело (например, эталонный CAR против ВСМА) связывается с мембраносвязанным и растворимым или высвобождаемым белком ВСМА.

В некоторых аспектах химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточную сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область включает внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой 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, содержащий иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM).

В некоторых вариантах осуществления антителая часть рекомбинантного рецептора, например CAR, дополнительно включает спейсер, который может представлять собой или может включать по меньшей мере часть константной области или варианта иммуноглобулина, или его вариант или модифицированную версию, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4, шарнирная область IgG1 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 константная область или часть представляет собой IgG человека, такой как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между распознающим антиген компонентом, например scFv, и трансмембранным доменом.

Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает увеличение способности клетки к ответу после

связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. Иллюстративные спейсеры, например, шарнирные области, включают спейсеры, описанные в публикации международной патентной заявки номер WO 2014031687. В некоторых примерах спейсер имеет длину ровно или приблизительно 12 аминокислот или не более 12 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают спейсеры, имеющие по меньшей мере приблизительно от 10 до 229 аминокислот, приблизительно от 10 до 200 аминокислот, приблизительно от 10 до 175 аминокислот, приблизительно от 10 до 150 аминокислот, приблизительно от 10 до 125 аминокислот, приблизительно от 10 до 100 аминокислот, приблизительно от 10 до 75 аминокислот, приблизительно от 10 до 50 аминокислот, приблизительно от 10 до 40 аминокислот, приблизительно от 10 до 30 аминокислот, приблизительно от 10 до 20 аминокислот, или приблизительно от 10 до 15 аминокислот, и включая любое целое число между конечными величинами любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область имеет приблизительно 12 аминокислот или менее, приблизительно 119 аминокислот или менее, или приблизительно 229 аминокислот или менее. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой спейсер, имеющий по меньшей мере конкретную длину, например, имеющий длину по меньшей мере 100 аминокислот, например, по меньшей мере 110, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают только шарнирную область IgG4, шарнирную область IgG4, связанную с доменами C_H2 и C_H3, или шарнирную область IgG4, связанную с доменом C_H3. Иллюстративные спейсеры включают только шарнирную область IgG4, шарнирную область IgG4, связанную с доменами C_H2 и C_H3, или шарнирную область IgG4, связанную с доменом C_H3. Иллюстративные спейсеры включают только шарнирную область IgG4, шарнирную область IgG4, связанную с доменами C_H2 и C_H3, или шарнирную область IgG4, связанную с доменом C_H3. Иллюстративные спейсеры включают, но не ограничиваются ими, спейсеры, описанные в Hudecek et al., Clin. Cancer Res., 19:3153 (2013), Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135, публикация международной патентной заявки номер WO 2014031687, патент США № 8822647 или опубликованная заявка № US 2014/0271635. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает последовательность шарнирной области иммуноглобулина, область C_H2 и C_H3. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из шарнирной области, C_H2 и C_H3 происходят полностью или частично из IgG4 или IgG2. В некоторых случаях шарнирная область, C_H2 и C_H3 происходит из IgG4. В некоторых аспектах одна или несколько из шарнирной области, C_H2 и C_H3 является химерной и содержит последовательность, происходящую из IgG4 и IgG2. В некоторых примерах спейсер содержит химерную шарнирную область IgG4/2, область C_H2 IgG2/4 и область C_H3 IgG4.

В некоторых вариантах осуществления спейсер может происходить полностью или частично из IgG4 и/или IgG2 и может содержать мутации, такие как одна или несколько единичных аминокислотных мутаций, в одном или нескольких доменах. В некоторых примерах аминокислотная модификация представляет собой замену пролином (P) серина (S) в шарнирной области IgG4. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация представляет собой замену глутамином (Q) аспарагина (N) для снижения гетерогенности гликозилирования, такую как мутация N177Q в положении 177 области C_H2 полной последовательности Fc IgG4 или N176Q в положении 176 области C_H2 полной последовательности Fc IgG4.

В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность ESKYGPPCPPCP (указанную в SEQ ID NO: 1) и кодируется последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления кодируемый спейсер представляет собой или содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть представляет собой константную область или часть IgD. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

Другие иллюстративные спейсерные области включают шарнирные области, происходящие из CD8a, CD28, CTLA4, PD-1 или FcγRIIIa. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит укороченный внеклеточный домен или шарнирную область CD8a, CD28, CTLA4, PD-1 или FcγRIIIa. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой укороченную шарнирную область CD28. В некоторых вариантах осуществления присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий остатки аланина или аланин и аргинин, например, триплет аланина (AAA) или RAAA (SEQ ID NO: 144), и он образует связь между scFv и спейсерной областью CAR. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 81-83. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществле-

ния спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет 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 любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 31, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 88 или 89.

В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 157-165. В некоторых вариантах осуществления спейсер имеет последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 157-165.

Этот антигенраспознающий домен обычно связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через рецепторный комплекс для антигена, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или передает сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или несколькими трансмембранными или внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен слит с внеклеточным доменом, например, связан или слит между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным сигнальным доменом. В одном варианте осуществления используют трансмембранный домен, который в природе ассоциирован с одним из доменов в рецепторе, например CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют посредством аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или отличающихся поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен происходит либо из природного, либо из синтетического источника. Когда источник является природным, в некоторых аспектах домен происходит из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие из (т.е. содержат по меньшей мере трансмембранную область(и) из) альфа, бета или зета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8a, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB), CD154, CTLA-4 или PD-1. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен 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 находится на каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связывание осуществляется посредством линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена(ов). В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Иллюстративные последовательности трансмембранных доменов представляют собой или содержат последовательности, указанные в SEQ ID NO: 8, 79, 85, 87, 142 или 143.

Среди внутриклеточных сигнальных доменов или областей представлены те, которые имитируют или приблизительно соответствуют сигналу через природный рецептор антигена, сигналу через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигналу через костимулирующий рецептор отдельно. В некоторых вариантах осуществления присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий остатки глицина и серина, например, дублет глицин-серин, и он образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

Рецептор, например CAR, как правило, включает по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых аспектах CAR включает первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые оказывают стимулирующее действие, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные активирующие мотивы на основе тирозина или ITAM. Примеры содержащих ITAM первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей включают последовательности, происходящие из цепи CD3 TCR, которая опосредует стимуляцию и/или активацию и цитотоксичность T-клеток, например, цепь CD3-зета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, FcR-гамма, FcR-бета, CDS, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Некоторые примеры содержащих ITAM первичных сигнальных последовательностей включают последовательности, происходящие из цепи CD3-зета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, происходящую из CD3-зета.

В некоторых вариантах осуществления рецептор включает внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь CD3 TCR, которая опосредует стимуляцию и/или активацию T-клеток и цитотоксичность, например, зета-цепь CD3. Таким образом, в некоторых аспектах антигенсвязывающая часть связана с одним или несколькими передающими сигнал модулями клеток. В некоторых вариантах осу-

ществления передающие сигнал модули клеток включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранные домены CD. В некоторых вариантах осуществления рецептор, например CAR, дополнительно включает часть одной или нескольких дополнительных молекул, такую как Fc-рецептор γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR или другой химерный рецептор включает химерную молекулу между CD3-зета (CD3- ζ) или Fc-рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления при связывании CAR или другого химерного рецептора цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунных клеток, например, T-клеток, модифицированных для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах CAR индуцирует функцию T-клеток, такую как цитолитическая активность или T-хелперная активность, такая как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления вместо интактной иммуностимулирующей цепи используют укороченную часть внутриклеточного сигнального домена рецепторного компонента антигена или костимулирующей молекулы, например, если она передает сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен, или домены, включает цитоплазматические последовательности T-клеточного рецептора (TCR) и в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в естественных условиях действуют совместно с такими рецепторами, иницируя передачу сигнала после связывания рецептора антигена, и/или любое производное или вариант таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, которая обладает той же функциональной способностью.

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

Стимуляция и/или активация T-клеток в некоторых аспектах описывается как опосредуемая двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательностями, которые иницируют антигензависимую первичную стимуляцию и/или активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные области, домены или последовательности), и последовательностями, которые действуют антигеннезависимым образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические сигнальные области, домены или последовательности). В некоторых аспектах CAR включает один или оба из таких сигнальных компонентов.

В некоторых вариантах осуществления CAR включает сигнальную область и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов. В некоторых аспектах один и тот же CAR включает как первичную цитоплазматическую сигнальную область, так и костимулирующие сигнальные компоненты. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен, происходящий из T-клеточной костимулирующей молекулы или ее функционального варианта, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах T-клеточная костимулирующая молекула представляет собой CD28 или 41BB.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько различных рекомбинантных рецепторов могут содержать одну или несколько различных внутриклеточную сигнальную область(и) или домен(ы). В некоторых вариантах осуществления первичная цитоплазматическая сигнальная область включена в один CAR, в то время как костимулирующий компонент предоставляется другим рецептором, например, другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, и костимулирующие CAR, все из которых экспрессируются на одной и той же клетке (см. WO 2014/055668).

В некоторых аспектах клетки включают один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно включают ингибиторные CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013), такие как CAR, распознающие антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфического для заболевания или состояния, причем активирующий сигнал, доставляемый через нацеленный на заболевание CAR, уменьшается или ингибируется посредством связывания ингибиторного CAR с его лигандом, например, для уменьшения неспецифических эффектов.

В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибиторный сигнал для клетки, так что связывание рецептора с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, но связывание второго ингибиторного рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или снижает этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибиторных CAR (iCAR). Такую стратегию можно использовать, например, для снижения вероятности неспецифических эффектов, когда активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболе-

вании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, и ингибиторный рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

В некоторых аспектах химерный рецептор представляет собой или включает ингибиторный CAR (например, iCAR) и включает внутриклеточные компоненты, которые снижают или подавляют иммунный ответ, такой как стимулируемый ITAM и/или костимулирующей молекулой ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются внутриклеточные сигнальные компоненты, встречающиеся на молекулах иммунной точки контроля, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах модифицированная клетка включает ингибиторный CAR, включающий сигнальный домен такой ингибиторной молекулы, или происходящий из нее, так что он служит для снижения ответа клетки, например, индуцируемый активирующим и/или костимулирующим CAR.

В определенных вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный и сигнальный домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-зета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3-зета.

В некоторых вариантах осуществления CAR охватывает один или несколько, например, два или более, костимулирующих доменов и первичных цитоплазматических сигнальных областей в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR включают внутриклеточные компоненты, такие как внутриклеточная сигнальная область(и) или домен(ы) из CD3-зета, CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит внутриклеточную сигнальную область или домен Т-клеточной костимулирующей молекулы, например, из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS, в некоторых случаях, между трансмембранным доменом и внутриклеточной сигнальной областью или доменом. В некоторых аспектах Т-клеточная костимулирующая молекула представляет собой одну или несколько из CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D и/или ICOS.

В некоторых случаях CAR упоминаются как CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах, CAR первого поколения представляет собой CAR, который только обеспечивает индуцируемый CD3-целью сигнал при связывании антигена; в некоторых аспектах CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, который включает внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в некоторых аспектах CAR третьего поколения представляет собой CAR, который включает множество костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах химерный рецептор антигена включает внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент включает scFv, и внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен зета-цепи CD3 (CD3 ζ). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы для Т-клеток. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны прямо или непрямо. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны спейсером, таким как любой спейсер, описанный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит внеклеточную часть молекулы, из которой происходит трансмембранный домен, такую как внеклеточная часть CD28. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор антигена содержит внутриклеточный домен, происходящий из костимулирующей молекулы для Т-клеток, или его функциональный вариант, например, между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых аспектах костимулирующая молекула для Т-клеток представляет собой CD28 или 41BB.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть CD28 или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3-зета или ее функциональный вариант. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антитело, например, фрагмент антитела, трансмембранный домен, который представляет собой или содержит трансмембранную часть CD28 или ее функциональный вариант, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий сигнальную часть 4-1BB или ее функциональный вариант, и сигнальную часть CD3-зета или ее функциональный вариант. В некоторых таких вариантах осуществления рецептор дополнительно включает спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как молекула Ig человека, такая как шарнирная область Ig, например, шарнирная об-

ласть IgG4, такой как спейсер только из шарнирной области.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен рекомбинантного рецептора, например, CAR, представляет собой или включает трансмембранный домен CD28 человека (например, номер доступа № P10747.1) или CD8a (номер доступа № P01732.1), или его вариант, такой как трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, 79, 142 или 143, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 8, 79, 142 или 143; в некоторых вариантах осуществления содержащая трансмембранный домен часть рекомбинантного рецептора содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислоты, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с ней.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный компонент(ы) рекомбинантного рецептора, например, CAR, содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD28 человека или его функциональный вариант или часть, такие 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 обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 10 или 11. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен включает внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен из 4-1BB (например, номер доступа № Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, такие как последовательность аминокислот, указанная в SEQ ID NO: 12, 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: 12.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен рекомбинантного рецептора, например CAR, содержит стимулирующий сигнальный домен CD3-зета человека или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 CD3 ζ человека (номер доступа P20963.2) или сигнальный домен CD3-зета, как описано в патенте США № 7446190 или в патенте США № 8911993. Например, в некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность аминокислот, как указано в SEQ ID NO: 13, 14 или 15, 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: 13, 14 или 15.

В некоторых аспектах спейсер содержит только шарнирную область IgG, такую как только шарнирная область IgG4 или IgG1, например, спейсер только с шарнирной областью, указанный в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 89. В других вариантах осуществления спейсер представляет собой или содержит шарнирную область Ig, например, происходящую из IgG4 шарнирную область, необязательно связанную с доменами C_H2 и/или C_H3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например, шарнирную область IgG4, связанную с доменами C_H2 и C_H3, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область Ig, например, шарнирную область IgG4, связанную только с доменом C_H3, например, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. В некоторых вариантах осуществления спейсер представляет собой шарнирную область CD8a, как указано в любой из SEQ ID NO: 81-83, шарнирную область Fc γ RIIIa, как указано в SEQ ID NO: 88, шарнирную область CTLA4, как указано в SEQ ID NO: 84, или шарнирную область PD-1, как указано в SEQ ID NO: 86.

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

В некоторых вариантах осуществления рецептор антигена дополнительно включает маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой рецептор антигена, дополнительно включают суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который можно использовать для подтверждения трансдукции или модификации клеток для экспрессии рецептора. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, не встречающийся в при-

роде на Т-клетках или не встречающийся в природе на поверхности Т-клеток, или ее часть. В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой не собственную молекулу, например, не собственный белок, т.е. белок, который не распознается как "собственный" иммунной системой хозяина, которому проводят адоптивный перенос клеток. В некоторых вариантах осуществления маркер не выполняет терапевтической функции и/или не обеспечивает эффекта, отличного от применения в качестве маркера для генной инженерии, например, для селекции клеток, успешно модифицированных. В других вариантах осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, демонстрирующую иной желаемый эффект, такую как лиганд для клетки, которая встретится *in vivo*, такой как костимулирующая молекула или молекула иммунной точки контроля для усиления и/или снижения ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом. В некоторых аспектах маркер включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR или рецептора эпидермального фактора роста, такой как укороченная версия 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 представлять собой любой маркер и линкерную последовательность, как описано в опубликованной патентной заявке № WO 2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (tEGFR), т.е. необязательно связанный с линкерной последовательностью, такой как последовательность расщепляемого линкера T2A.

Иллюстративный полипептид для укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7 или 166, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 или 166. Иллюстративная линкерная последовательность T2A содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6 или 167, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью с SEQ ID NO: 6 или 167.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие такие конструкции CAR, дополнительно включают последовательность, кодирующую элемент рибосомального пропускания T2A и/или последовательность tEGFR, например, ниже последовательности, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует элемент рибосомального пропускания T2A, указанный в SEQ ID NO: 6 или 167, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6 или 167. В некоторых вариантах осуществления также можно получать Т-клетки, экспрессирующие рецептор антигена (например, CAR), для экспрессии укороченного EGFR (EGFRt) в качестве неиммуногенного селективного эпитопа (например, путем внесения конструкции, кодирующей CAR и EGFRt, разделенные рибосомальным переключателем T2A, для экспрессии двух белков с одной конструкцией), который затем можно использовать в качестве маркера для обнаружения таких клеток (см., например, патент США № 8802374). В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует последовательность tEGFR, указанную в SEQ ID NO: 7 или 166, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления кодируемая последовательность CAR может дополнительно включать сигнальную последовательность или сигнальный пептид, который направляет или доставляет CAR на поверхность клетки, в которой экспрессируется CAR. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид происходит из трансмембранного белка. В некоторых примерах сигнальный пептид происходит из CD8a, CD33 или IgG. Иллюстративные сигнальные пептиды включают последовательности, указанные в SEQ ID NO: 39, 40 и 153.

В некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело против ВСМА или фрагмент, такие как любое из антител против ВСМА человека, включая sdAb и scFv, описанные в настоящем описании, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнирную область Ig, или других спейсеров, описанных в настоящем описании, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и сигнальный домен CD3-зета. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антитело против ВСМА или фрагмент, такие как любое из антител против ВСМА человека, включая sdAb и scFv, описанные в настоящем описании, спейсер, такой как любой из спейсеров, содержащих шарнирную область Ig или других спейсеров, описанных в настоящем описании, трансмембранный домен CD28, внутриклеточный сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-зета. В некоторых вариантах осуществления такие конструкции CAR дополнительно включают элемент рибосомального пропускания T2A и/или последовательность tEGFR, например, ниже CAR.

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, введенными индивидууму, обычно распознают или специфически связывают молекулу, которая экспрессируется в, ассоциирована с

и/или является специфической для заболевания или состояния, которые подвергаются лечению, или связанных с ними клетками. При специфическом связывании с молекулой, например, антигеном, рецептор обычно доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как передаваемый через ITAM сигнал, в клетку, тем самым стимулируя иммунный ответ, нацеленный на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки экспрессируют CAR, который специфически связывается с антигеном, экспрессируемым клеткой или тканью, пораженной заболеванием или состоянием или связанной с заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления CAR специфически связывается с ВСМА, таким как ВСМА человека, и включает антитело против ВСМА человека или фрагмент, как описано. Неограничивающие иллюстративные последовательности CAR, включая последовательности CAR против ВСМА, являются такими, как указано в SEQ ID NO: 90-141. В некоторых вариантах осуществления CAR против ВСМА включает аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 90-141, или аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, ровно или приблизительно 99% идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 90-141, и где CAR специфически связывает ВСМА, например, ВСМА человека.

2. Химерный рецептор аутоантител (СААР)

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор аутоантител (СААР). В некоторых вариантах осуществления СААР связывает, например, специфически связывает или распознает, аутоантитело. В некоторых вариантах осуществления клетку, экспрессирующую СААР, такую как Т-клетка, модифицированная для экспрессии СААР, можно использовать для специфического связывания и уничтожения клеток, экспрессирующих аутоантитела, но не нормальных клеток, экспрессирующих антитела. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие СААР клетки можно использовать для лечения аутоиммунного заболевания, ассоциированного с экспрессией собственных антигенов, таких как аутоиммунные заболевания. В некоторых вариантах осуществления СААР-экспрессирующие клетки могут быть нацелены на В-клетки, которые в конечном итоге продуцируют аутоантитела и экспонируют аутоантитела на их клеточных поверхностях, маркируя эти В-клетки в качестве специфических для заболевания мишеней для терапевтического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления СААР-экспрессирующие клетки можно использовать для эффективного нацеливания и уничтожения патогенных В-клеток при аутоиммунных заболеваниях путем нацеливания на вызывающие заболевание В-клетки с использованием антигенспецифического химерного рецептора аутоантител. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный рецептор представляет собой СААР, такой как любой СААР, описанный в публикации патентной заявки США № US 2017/0051035.

В некоторых вариантах осуществления СААР содержит связывающий домен аутоантител, трансмембранный домен и одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическим сигнальным доменом или областью). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная сигнальная область содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой или содержит первичный сигнальный домен, сигнальный домен, который способен стимулировать и/или индуцировать первичный сигнал активации в Т-клетке, компонент сигнального домена Т-клеточного рецептора (TCR) (например, внутриклеточный сигнальный домен или область зета-цепи CD3-зета (CD3 ζ) или его функциональный вариант или сигнальную часть), и/или сигнальный домен, содержащий иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM).

В некоторых вариантах осуществления связывающий домен аутоантитела содержит аутоантиген или его фрагмент. Выбор аутоантигена может зависеть от типа аутоантитела, на которое осуществляют нацеливание. Например, аутоантиген может быть выбран, поскольку он распознает аутоантитело на клетке-мишени, такой как В-клетка, ассоциированной с конкретным болезненным состоянием, например, аутоиммунным заболеванием, таким как опосредуемое аутоантителами аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание включает пемфигус обыкновенный (PV). Иллюстративные аутоантигены включают десмоглеин 1 (Dsg1) и Dsg3.

3. TCR

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются модифицированные способами инженерии клетки, такие как Т-клетки, которые экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR) или его антигенсвязывающую часть, которые распознают пептидный эпитоп или Т-клеточный эпитоп полипептида-мишени, такого как антиген опухоли, вирусный или аутоиммунный белок. В некоторых аспектах TCR представляет собой или включает рекомбинантный TCR.

В некоторых вариантах осуществления "Т-клеточный рецептор" или "TCR" представляет собой молекулу, которая содержит переменные цепи α и β (также известные как TCR α и TCR β , соответственно)

или переменные цепи γ и δ (также известные как TCR α и TCR β , соответственно), или их антигенсвязывающую часть, и которая способна специфически связываться с пептидом, связанным с молекулой МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR имеет форму $\alpha\beta$. Как правило, TCR, которые существуют в формах $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$, являются структурно сходными, однако Т-клетки, экспрессирующие их, могут иметь различные анатомические положения или функции. TCR может находиться на поверхности клетки или может быть в растворимой форме. Как правило, TCR находится на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно ответственен за распознавание антигенов, связанных с молекулами основного комплекса гистосовместимости (МНС).

Если нет иных указаний, термин "TCR" следует интерпретировать как охватывающий полные TCR, а также их антигенсвязывающие части или антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой интактный или полноразмерный TCR, включая TCR в форме $\alpha\beta$ или в форме $\gamma\delta$. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающую часть, которая является меньшей, чем полноразмерный TCR, но которая связывается со специфическим пептидом, связанным с молекулой МНС, т.е. связывается с комплексом МНС-пептид. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть или фрагмент TCR может содержать только часть структурных доменов полноразмерного или интактного TCR, но, тем не менее, способна связывать эпитоп пептида, такой как комплекс МНС-пептид, с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит переменные домены TCR, такие как переменная цепь α и переменная цепь β TCR, достаточные для образования связывающего участка для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид. Как правило, переменные цепи TCR содержат определяющие комплементарность области, вовлеченные в распознавание пептида, МНС и/или комплекса МНС-пептид.

В некоторых вариантах осуществления переменные домены TCR содержат гиперпеременные петли или определяющие комплементарность области (CDR), которые обычно вносят основной вклад в распознавание антигена и способность к связыванию и его специфичность. В некоторых вариантах осуществления CDR TCR или их комбинация формирует весь или по существу весь антигенсвязывающий центр данной молекулы TCR.

Различные CDR в переменной области цепи TCR обычно разделены каркасными областями (FR), которые обычно демонстрируют меньшую переменность 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; также см. Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 представляет собой основной CDR, ответственный за связывание антигена или специфичность к нему, или является наиболее важным среди трех CDR на данной переменной 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 C-концевой частью пептида. В некоторых контекстах CDR2 вносит наибольший вклад или является основным CDR, ответственным за взаимодействие с или распознавание МНС-частью комплекса МНС-пептид. В некоторых вариантах осуществления переменная область β -цепи может содержать дополнительную гиперпеременную область (CDR4 или HVR4), которая обычно вовлечена в связывание суперантигена и не вовлечена в распознавание антигена (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткую цитоплазматическую хвостовую часть (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 обладать N-концевым переменным доменом иммуноглобулина, одним константным доменом иммуноглобулина, трансмембранной областью и короткой цитоплазматической хвостовой частью на C-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR ассоциирован с инвариантными белками комплекса CD3, вовлеченного в опосредование передачи сигнала.

В некоторых вариантах осуществления TCR-цепь содержит один или несколько константных доменов. Например, внеклеточная часть данной цепи TCR (например, α -цепи или β -цепи) может содержать два иммуноглобулин-подобных домена, таких как переменный домен (например, V α или V β ; как правило, аминокислоты с 1 по 116 на основе нумерации по 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 α , обычно положения с 117 по 259 цепи на основе нумерации Kabat, или константный домен β -цепи или C β , обычно положения с 117 по 295 цепи на основе Kabat) рядом с клеточной мембраной. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два наиболее близких к мембране константных домена и два наиболее отдаленных от мембраны переменных домена, каждый из которых содержит CDR. Константный домен TCR может содержать короткие соединяющие 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 цепей α и β , так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях цепь TCR содержит цитоплазматическую хвостовую часть. В некоторых случаях структура позволяет TCR ассоциировать с другими молекулами, такими как CD3, и их субъединицами. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может закоривать белок на клеточной мембране и связываться с инвариантными субъединицами аппарата или комплекса передачи сигнала CD3. Внутриклеточные хвостовые части сигнальных субъединиц CD3 (например, цепи CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ и CD3 ζ) содержат один или несколько иммунорецепторных активирующих мотивов на основе тирозина или ITAM, которые вовлечены в способность комплекса TCR передавать сигнал.

В некоторых вариантах осуществления TCR может представлять собой гетеродимер двух цепей α и β (или необязательно γ и δ), или он может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (цепи α и β или цепи γ и δ), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями.

В некоторых вариантах осуществления TCR можно получать из известной последовательности(ей) TCR, такой как последовательности цепей V α , β , полная кодирующая последовательность которых по существу легко доступна. Способы получения полноразмерных последовательностей TCR, включая последовательности V-цепи, из клеточных источников хорошо известны. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, можно получать из различных источников, например, путем амплификации с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) кодирующих TCR нуклеиновых кислот, находящихся в данной клетке или клетках или выделенных из данной клетки или клеток, или синтеза общедоступных последовательностей ДНК TCR.

В некоторых вариантах осуществления рецепторы антигенов включают рекомбинантные T-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонированные из встречающихся в природе T-клеток. В некоторых вариантах осуществления идентифицируют клон высокоаффинных T-клеток для выделенного антигена-мишени (например, антигена злокачественной опухоли) от пациента, и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для антигена-мишени получают у трансгенных мышей, которым встроены способами инженерии гены иммунной системы человека (например, система лейкоцитарного антигена человека, или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al. (2009) *Clin Cancer Res.* 15:169-180 и Cohen et al. (2005) *J Immunol.* 175:5799-5808). В некоторых вариантах осуществления для выделения TCR против антигена-мишени используют фаговый дисплей (см., например, Varela-Rohena et al. (2008) *Nat Med.* 14:1390-1395 и Li (2005) *Nat Biotechnol.* 23:349-354).

В некоторых вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, например, из T-клетки (например, цитотоксическая T-клетка), T-клеточной гибридомы или другого общедоступного источника. В некоторых вариантах осуществления T-клетки можно получать из клеток, выделенных *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой TCR, подвернутый селекции в тимусе. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой TCR рестриктированный по не-оэпитопам. В некоторых вариантах осуществления T-клетки могут представлять собой культивируемую T-клеточную гибридому или клон. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающую часть можно получать способами синтеза, зная последовательность TCR.

В некоторых вариантах осуществления TCR получают из TCR, идентифицированного или отобранного в результате скрининга библиотеки TCR-кандидатов против полипептида-антигена, являющегося мишенью, или его T-клеточного эпитопа, являющегося мишенью. Библиотеки TCR можно получать путем амплификации репертуара V α и V β из выделенных T-клеток от индивидуума, включая клетки, присутствующие в РВМС, селезенке или другом лимфоидном органе. В некоторых случаях T-клетки можно увеличивать в количестве из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В некоторых вариантах осуществления можно получать библиотеки TCR из CD4+ или CD8+ клеток. В некоторых вариантах осуществления TCR можно амплифицировать из источника T-клеток нормального здорового индивидуума, т.е. библиотек нормального TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR можно амплифицировать из источника T-клеток индивидуума, страдающего заболеванием, т.е. библиотек связанного с заболеванием TCR. В некоторых вариантах осуществления используют вырожденные праймеры для амплификации репертуара генов V α и V β , например, посредством ОТ-ПЦР, в образцах, таких как T-клетки, полученные от человека. В некоторых вариантах осуществления библиотеки scTv можно собирать из библиотек наивных V α и V β , в которых амплифицированные продукты клонированы или собраны так, чтобы они были разделены линкером. В зависимости от индивидуума и источника клеток, библиотеки могут быть специфическими в отношении HLA-аллеля. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления библиотеки TCR можно получать путем мутагенеза или диверсификации исходной или каркасной молекулы TCR. В некоторых аспектах TCR подвергают направленной эволюции, например, посредством мутагенеза, например, цепи α или β . В некоторых аспектах, изменяют конкретные остатки в CDR TCR. В некоторых вариантах осуществления выбранные TCR можно модифицировать посредством созревания

аффинности. В некоторых вариантах осуществления можно выбирать антигенспецифические Т-клетки, например, посредством скрининга для оценки активности CTL против пептида. В некоторых аспектах, TCR, например, присутствующие на антигенспецифических Т-клетках, можно отбирать, например, по активности связывания, например, специфической аффинности или авидности в отношении антигена.

В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть представляет собой TCR или его антигенсвязывающую часть, которые являются модифицированными или сконструированными способами инженерии. В некоторых вариантах осуществления для получения TCR с измененными свойствами, например, с более высокой аффинностью в отношении специфического комплекса МНС-пептид, используют способы направленных изменений. В некоторых вариантах осуществления направленные изменения осуществляются способами дисплея, включая, но не ограничиваясь ими, 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 Т-клеточный дисплей (Chervin et al. (2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84). В некоторых вариантах осуществления подхода дисплея вовлекают конструирование или модификацию известного, исходного или эталонного TCR. Например, в некоторых случаях TCR дикого типа можно использовать в качестве матрицы для получения мутантных TCR, в которых один или несколько остатков CDR являются мутантными, и отбирать мутанты с желаемым измененным свойством, таким как более высокая аффинность в отношении требуемого антигена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления пептиды полипептида-мишени для применения для продуцирования или получения представляющего интерес TCR известны и могут быть без труда идентифицированы. В некоторых вариантах осуществления пептиды, пригодные для применения для получения TCR или антигенсвязывающих частей, можно определять, исходя из присутствия рестриктированного по HLA мотива в представляющем интерес полипептиде-мишени, таком как полипептид-мишень, описанный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления пептиды идентифицируют с использованием доступных компьютерных прогнозирующих моделей. В некоторых вариантах осуществления для прогнозирования участков связывания МНС класса I такие модели включают, но не ограничиваются ими, ProPredl (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 рестриктированный по МНС эпитоп представляет собой HLA-A0201, который экспрессируется у приблизительно 39-46% всех европеоидов и, таким образом, является подходящим для выбора антигеном МНС для применения для получения TCR или другой молекулы, связывающей МНС-пептид.

HLA-A0201-связывающие мотивы и участки расщепления для протеасом и иммунных протеасом с использованием компьютерных прогнозирующих моделей известны. Для прогнозирования участков связывания МНС класса I такие модели включают, но не ограничиваются ими, ProPredl (более подробно описанная в Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *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 антигенсвязывающая часть могут представлять собой рекомбинантно продуцируемый природный белок или его мутантную форму, у которых одно или нескольких свойств, таких как характеристика связывания, изменены. В некоторых вариантах осуществления TCR может происходить из одного из различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса или другое млекопитающее. TCR может находиться в связанной с клеткой или растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления для целей предусматриваемых способов TCR находится в связанной с клеткой форме, экспрессируемой на поверхности клетки.

В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой полноразмерный TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой димерный TCR (dTCR). В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой одноцепочечный TCR (scTCR). В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR имеют структуры, как описано в WO 03/020763, WO 04/033685, WO 2011/044186.

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

В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит первый полипептид, где последовательность, соответствующая вариабельной области α -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной области α -цепи TCR, и второй полипептид, где последовательность, соответствующая последовательности вариабельной области β -цепи TCR, слита с N-концом последовательности, соответствующей внеклеточной последовательности константной

области β -цепи TCR, причем 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 остатков цистеина могут быть включены во внеклеточные последовательности константных областей пары полипептидов dTCR. В некоторых случаях может быть желательной как нативная, так и ненативная дисульфидная связь. В некоторых вариантах осуществления TCR содержит трансмембранную последовательность для закрепления на мембране.

В некоторых вариантах осуществления dTCR содержит α -цепь TCR, содержащую варибельный α -домен, константный α -домен и первый мотив димеризации, связанный с С-концом константного α -домена, и β -цепь TCR, содержащую варибельный β -домен, константный β -домен и первый мотив димеризации, связанный с С-концом 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, связывающем α -цепь TCR и β -цепь TCR вместе.

В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой scTCR. Как правило, scTCR можно получать 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); международные опубликованные РСТ № 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 ненативную дисульфидную межцепочечную связь для облегчения ассоциации цепей TCR (см., например, международную опубликованную РСТ № WO 03/020763). В некоторых вариантах осуществления scTCR представляет собой связанный дисульфидной связью укороченный TCR, в котором гетерогенные лейциновые молнии, слитые с их С-концами, облегчают ассоциацию цепей (см., например, международную опубликованную РСТ № WO 99/60120). В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит варибельный домен TCR α , ковалентно связанный с варибельным доменом TCR β через пептидный линкер (см., например, международную опубликованную РСТ № WO 99/18129).

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

В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит первый сегмент, состоящий из последовательности варибельной области α -цепи, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константного домена α -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности варибельной 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 варибельной области β -цепи TCR, слитой с N-концом последовательности внеклеточного константного домена β -цепи, и второй сегмент, состоящий из последовательности варибельной 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 представлять собой любой линкер, способный образовывать единую полипептидную цепь при сохранении специфичности связывания TCR. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может иметь формулу, например, -P-AA-P-, где P представляет собой пролин и AA представляет собой аминокислотную последовательность, где аминокислоты представляют собой глицин и серин. В некоторых вариантах осуществления первый и второй сегменты образуют пару, так что их последовательности варибельной области ориентированы для такого связывания. Таким образом, в некоторых случаях линкер имеет достаточную длину для того, чтобы он охватывал расстояние между С-концом первого сегмента и N-концом второго сегмента, или наоборот, но не был слишком длинным, чтобы не произошло блокирование или уменьшение связывания scTCR с лигандом-мишенью. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать от 10 до 45 аминокислот или от приблизительно 10 до 45 аминокислот, например, от 10 до 30 аминокислот или от 26 до 41 аминокислотного остатка, например 29, 30, 31 или 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет формулу -PGGG-(SGGG)₅-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин (SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления линкер имеет последовательность

GSADDAKKDAAKKGKGS (SEQ ID NO: 17).

В некоторых вариантах осуществления scTCR содержит ковалентную дисульфидную связь, связывающую остаток области иммуноглобулина константного домена α -цепи с остатком области иммуноглобулина константного домена β -цепи. В некоторых вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь в нативном TCR отсутствует. Например, в некоторых вариантах осуществления один или несколько остатков цистеина могут быть включены во внеклеточные последовательности константной области первого и второго сегментов полипептида scTCR. В некоторых случаях может быть желательной как нативная, так и ненативная дисульфидная связь.

В некоторых вариантах осуществления dTCR или scTCR, содержащего встроенные межцепочечные дисульфидные связи, нативные дисульфидные связи не присутствуют. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нативных остатков цистеина, образующих нативные межцепочечные дисульфидные связи, заменены другим остатком, например, серином или аланином. В некоторых вариантах осуществления встроенная дисульфидная связь может быть образована путем мутации являющихся цистеином остатков на первом и втором сегментах на цистеин. Иллюстративные ненативные дисульфидные связи TCR описаны в опубликованной международной РСТ № WO 2006/000830.

В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающий фрагмент обладают аффинностью с равновесной константой связывания в отношении антигена мишени, составляющей от или приблизительно от 10^{-5} до 10^{-12} М, включая все индивидуальные величины и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой комплекс МНС-пептид или лиганд.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие TCR, такие как α - и β -цепи, можно амплифицировать способом ПЦР, клонированием или другим подходящим способом и клонировать в подходящий экспрессирующий вектор или векторы. Экспрессирующий вектор может представлять собой любой подходящий рекомбинантный экспрессирующий вектор, и его можно использовать для трансформации или трансфекции какого-либо подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, сконструированные для увеличения в количестве и экспансии, или для экспрессии, или для обеих целей, такие как плазмиды и вирусы.

В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вектор серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, LaJolla, Calif.), серии pET (Novagen, Madison, Wis.), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Швеция) или серии pEX (Clontech, Palo Alto, Calif.). В некоторых случаях также можно использовать векторы на основе бактериофагов, такие как λ G10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NM1149. В некоторых вариантах осуществления можно использовать экспрессирующие векторы растений, и они включают pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых вариантах осуществления используют вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные экспрессирующие векторы можно получать с использованием стандартных способов рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления векторы могут содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими в отношении типа хозяина (например, бактерии, грибы, растений или животные), которому вводят вектор, в зависимости от ситуации и учитывая, является ли вектор вектором на основе ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей TCR или антигенсвязывающую часть (или другую молекулу, связывающую МНС-пептид). В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, находящийся в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Также предусматриваются другие известные промоторы.

В некоторых вариантах осуществления для получения вектора, кодирующего TCR, цепи α и β амплифицируют способом ПЦР с тотальной кДНК, выделенной из клона Т-клеток, экспрессирующего представляющий интерес TCR, и клонируют в экспрессирующий вектор. В некоторых вариантах осуществления цепи α и β клонируют в тот же вектор. В некоторых вариантах осуществления цепи α и β клонируют в различные векторы. В некоторых вариантах осуществления полученные цепи α и β встраивают в ретровирусный, например, лентивирусный вектор.

4. Множественное нацеливание

В некоторых вариантах осуществления клетки и способы включают стратегии множественного нацеливания, такие как экспрессия двух или более модифицированных способами генной инженерии рецепторов на клетке, которые распознают один и тот же или различные антигены и, как правило, включают различные компоненты внутриклеточной передачи сигнала. Такие стратегии множественного нацеливания описаны, например, в публикации РСТ № WO 2014055668 A1 (в которой описаны комбинации активирующих и костимулирующих CAR, например, нацеливание на два различных антигена, присутст-

вующих по отдельности на нецелевых, например, нормальных клетках, но присутствуют вместе только на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, подвергаемым лечению) и Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013) (где описаны клетки, экспрессирующие активирующий и ингибиторный CAR, такие как клетки, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым как на нормальных или не связанных с заболеванием клетках, так и на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, подвергаемым лечению, и ингибиторный CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, на которые нежелательно воздействовать).

Например, в некоторых вариантах осуществления клетки включают рецептор, экспрессирующий первый модифицированный способами инженерии рецептор антигена (например, CAR или TCR), который способен индуцировать активирующий сигнал в клетке, как правило, при специфическом связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например, с первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно включает второй модифицированный способами генной инженерии рецептор антигена (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который способен индуцировать костимулирующий сигнал в иммунной клетке, обычно при специфическом связывании со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В некоторых вариантах осуществления первый антиген и второй антиген являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый антиген и второй антиген различаются.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй модифицированный способами инженерии рецептор антигена (например, CAR или TCR) способен индуцировать активирующий сигнал в клетке. В некоторых вариантах осуществления рецептор включает компонент внутриклеточной передачи сигнала, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления активация, индуцируемая первым рецептором, вовлекает передачу сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, которые приводят к инициации иммунного ответа, такой как фосфорилирование ITAM и/или инициация опосредуемого ITAM каскада передачи сигнала, образование иммунологического синапса и/или кластеризация молекул вблизи связываемого рецептора (например, CD4 или CD8, и т.д.), активация одного или нескольких факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1, и/или индукция экспрессии генов факторов, таких как цитокины, пролиферация и/или выживание.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор включает внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов, таких как CD28, CD137 (41BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления первый и второй рецепторы включают внутриклеточные сигнальные домены костимулирующего рецептора, которые различаются. В одном варианте осуществления первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28 и второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB, или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор включает как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

В некоторых вариантах осуществления первый рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, и второй рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора. Костимулирующий сигнал в комбинации с активирующим сигналом, индуцированным в одной клетке, представляет собой сигнал, который приводит к иммунному ответу, такому как устойчивый и длительный иммунный ответ, такой как увеличенная экспрессия генов, секреция цитокинов и других факторов, и опосредуемые Т-клетками эффекторные функции, такие как уничтожение клеток.

В некоторых вариантах осуществления ни связывание только первого рецептора, ни связывание только второго рецептора не индуцирует устойчивый иммунный ответ. В некоторых аспектах, если связывается только один рецептор, клетка становится толерантной или не отвечающей на антиген, или ингибируется, и/или не индуцируется к пролиферации или секреции факторов или выполнению эффекторных функций. Однако в некоторых таких вариантах осуществления, когда связывается несколько рецепторов, например, когда встречается клетка, экспрессирующая первый и второй антигены, достигается желаемый ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, на что указывает, например, секреция одного или нескольких цитокинов, пролиферация, персистенция и/или выполнение иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клетки-мишени.

В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, дополнительно включают ингибиторные CAR (iCAR, см. Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от антигена, ассоциированного с и/или специфического в отношении заболевания или состояния, где активирующий сигнал, доставляемый посредством направленного на заболевание CAR, снижается или ингибируется посредством связывания ингибиторного CAR с его лигандом, например, снижая неспецифические эффекты.

В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют, соответственно, активирующий и ингибиторный сигнал в клетке, так что связывание одного из рецепторов с его антигеном активирует клетку или индуцирует ответ, однако связывание второго ингибиторного рецептора с его антигеном индуцирует сигнал, который подавляет или тормозит этот ответ. Примерами являются комбинации активи-

рующих CAR и ингибиторных CAR, или iCAR. Можно использовать такую стратегию, например, в которой активирующий CAR связывает антиген, экспрессирующийся при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, и ингибиторный рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

В некоторых аспектах химерный рецептор представляет собой или включает ингибиторный CAR (например, iCAR), и включает внутриклеточные компоненты, которые снижают или подавляют иммунный ответ, такой как стимулируемый ITAM и/или костимулирующей молекулой ответ в клетке. Примерами таких внутриклеточных сигнальных компонентов являются компоненты, встречающиеся на молекулах иммунной точки контроля, включая PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, рецепторы PGE2, рецепторы аденозина EP2/4, включая A2AR. В некоторых аспектах модифицированная клетка включает ингибиторный CAR, включающий сигнальный домен такой ингибиторной молекулы или происходящий из нее, так что он служит для снижения ответа клетки, например, который индуцируется активирующим и/или костимулирующим CAR.

В некоторых вариантах осуществления стратегии множественного нацеливания используют в случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на не связанной с заболеванием клетке и/или экспрессируется на самой модифицированной способами инженерии клетке, либо временно (например, при стимуляции в ассоциации с геной инженерией), либо постоянно. В таких случаях, вследствие необходимости связывания двух отдельных и обладающих индивидуальной специфичностью рецепторов антигенов, может повышаться специфичность, селективность и/или эффективность.

В некоторых вариантах осуществления множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессируются на клетке, в ткани или при заболевании или состоянии, на которые осуществляют нацеливание, например, на злокачественной клетке. В некоторых аспектах, клетка, ткань, заболевание или состояние представляет собой множественную миелому или клетку множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько антигенов, как правило, также экспрессируются на клетке, на которую нежелательно нацеливание посредством клеточной терапии, такой как нормальная или не связанная с заболеванием клетка или ткань, и/или сами модифицированные способами инженерии клетки. В таких вариантах осуществления, вследствие необходимости связывания множества рецепторов для достижения ответа клетки, может быть достигнута специфичность и/или эффективность.

С. Клетки и получение клеток для модификации способами геной инженерии

Среди клеток, экспрессирующих рецепторы и вводимых предусматриваемыми способами, представлены модифицированные способами инженерии клетки. Модификация способами геной инженерии обычно вовлекает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или сконструированный компонент, в композицию, содержащую клетки, например, посредством ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из такой клетки, например, нуклеиновые кислоты, полученные из другого организма или клетки, которые, например, обычно не присутствуют в клетке, подвергаемой модификации способами инженерии, и/или организме, из которого такая клетка происходит. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются не встречающимися в природе, такими как нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе, включая нуклеиновую кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующие различные домены множества различных типов клеток.

Клетки, как правило, представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и, как правило, они представляют собой клетки человека. В некоторых вариантах осуществления клетки происходят из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, и представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, главным образом, Т-клетки и/или НК-клетки. Другие иллюстративные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, в том числе индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки, как правило, представляют собой первичные клетки, такие как клетки, выделенные непосредственно от индивидуума и/или выделенные от индивидуума и замороженные. В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или несколько подгрупп Т-клеток или других типов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, CD4⁺ клетки, CD8⁺ клетки, и их субпопуляции, такие как субпопуляции, определяемые функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом к дифференцировке, экспансии, рециркуляцией, локализацией и/или способностью к персистенции, специфичностью к антигену, типом рецептора антигена, присутствием в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркеров или цитокинов, и/или степенью дифференцировки. Что касается индивидуума, подвергаемого лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. Способы включают стандартные способы. В некоторых аспектах, например, в случае стандартных технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотент-

ные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления способы включают выделение клеток от индивидуума, подготовку, переработку, культивирование и/или модификацию их способами инженерии, и обратное введение их тому же индивидууму, до или после криоконсервации.

Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4+ и/или CD8+ Т-клеток представлены наивные Т (T_N) клетки, эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{scm}), центральные Т-клетки памяти (T_{cm}), эффекторные Т-клетки 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, ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT), встречающиеся в природе и адаптивные регуляторные T(Treg)-клетки, хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой натуральные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных способами генной инженерии, и, тем самым, экспрессируют рекомбинантные или модифицированные способами генной инженерии продукты, такие как нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, как например, нуклеиновые кислоты, полученные из другого организма или клетки, которые, например, обычно не встречаются в клетке, подвергаемой модификации способами инженерии, и/или организме, из которого такая клетка происходит. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не являются встречающимися в природе, как например, нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе, включая нуклеиновую кислоту, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих различные домены из нескольких различных типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления получение модифицированных способами инженерии включает одну или несколько стадий культивирования и/или получения. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, можно выделять из образца, такого как биологический образец, например, образец, полученный от или происходящий из индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, клетку которого выделяют, представляет собой индивидуума, имеющего заболевание или состояние, или индивидуума, который нуждается в клеточной терапии или которому клеточную терапию будут проводить. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек, нуждающийся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, процессируют и/или модифицируют способами инженерии.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой первичные клетки, например, первичные клетки человека. Образцы включают образцы ткани, жидкости и другие образцы, которые берут непосредственно от индивидуума, а также образцы, полученные в результате одной или нескольких стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, модификация способами генной инженерии (например, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубация. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который обрабатывают. Биологические образцы включают, но не ограничиваются ими, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, цереброспинальная жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы органов и тканей, в том числе обработанные образцы, происходящие из них.

В некоторых аспектах образец, из которого происходят или выделяют клетки, представляет собой кровь или происходящий из крови образец, или представляет собой или происходит из продукта афереза или лейкоафереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты, клетки костного мозга, тимуса, биоптат ткани, клетки опухоли, лейкоза, лимфомы, лимфатического узла, ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой лимфоидной ткани, селезенки, других лимфоидных тканей, печени, легкого, желудка, кишечника, толстого кишечника, почки, поджелудочной железы, молочной железы, кости, предстательной железы, шейки матки, яичек, яичников, миндалевидной железы или другого органа, и/или клетки, происходящие из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления клетки происходят из клеточных линий, например, линий Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки получают из ксеногенного источника, например, из мыши, крысы, не являющегося человеком примата и свиньи.

В некоторых вариантах осуществления выделение клеток включает одну или несколько стадий препаративного и/или не аффинного разделения клеток. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удале-

ния нежелательных компонентов, обогащения желательными компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, способность к прикреплению, размер, чувствительность и/или резистентность к конкретным компонентам.

В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови индивидуума получают, например, посредством афереза или лейкофереза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах они содержат клетки, отличные от эритроцитов и тромбоцитов.

В некоторых вариантах осуществления клетки крови, полученные от индивидуума, промывают, например, для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В некоторых вариантах осуществления в промывочном растворе отсутствует кальций и/или магний, и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах стадию промывания проводят в полуавтоматической "проточной" центрифуге (например, устройство для обработки клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями изготовителя. В некоторых аспектах стадию промывания проводят посредством проточной фильтрации вдоль потока (TFF) в соответствии с инструкциями изготовителя. В некоторых вариантах осуществления после промывания клетки суспендируют в различных биосовместимых буферах, например, таких как свободный от $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS. В определенных вариантах осуществления компоненты образца крови удаляют и клетки прямо ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления способы включают способы разделения по плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови посредством лизиса эритроцитов и центрифугирования в градиенте Percoll или Ficoll.

В некоторых вариантах осуществления способы выделения включают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких определенных молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. В некоторых вариантах осуществления разделение представляет собой аффинное или иммуноаффинное разделение. Например, в некоторых аспектах выделение включает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии или уровня экспрессии клетками одного или нескольких маркеров, как правило, маркеров клеточной поверхности, например, посредством инкубации с антителом или партнером по связыванию, которые специфически связываются с такими маркерами, после которой обычно следуют стадии промывания и отделения клеток, связавших антитело или партнер по связыванию, от клеток, которые не связались с антителом или партнером по связыванию.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительной селекции, при которой клетки, связавшие реагенты, сохраняются для дальнейшего применения, и/или отрицательной селекции, при которой сохраняются клетки, не связавшиеся с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для дальнейшего применения. В некоторых аспектах негативная селекция может быть полезной, в частности, когда отсутствует доступное антитело, которое специфически идентифицирует тип клеток в гетерогенной популяции, так что разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от требуемой популяции.

Разделение не должно приводить к 100% обогащению или устранению конкретной клеточной популяции или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительная селекция или увеличение в количестве клеток конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не должна приводить к полному отсутствию клеток, экспрессирующих маркер. Аналогично, негативная селекция, удаление или истощение клеток конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процента таких клеток, но оно не должна приводить к полному устранению таких клеток.

В некоторых примерах проводят несколько раундов разделения, где подвергнутую позитивной или негативной селекции фракцию подвергают другой стадии разделения, такой как последующая позитивная или негативная селекция. В некоторых примерах одна стадия разделения может истощать клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, посредством инкубации клеток с несколькими антителами или партнерами по связыванию, каждый из которых является специфичным к маркеру, на который нацелена отрицательная селекция. Аналогично, несколько типов клеток можно одновременно подвергать позитивной селекции посредством инкубации с несколькими антителами или партнерами по связыванию, экспрессируемыми на различных типах клеток.

Например, в некоторых аспектах способами позитивной или негативной селекции выделяют определенные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, $\text{CD}28^+$, $\text{CD}62\text{L}^+$, $\text{CCR}7^+$, $\text{CD}27^+$, $\text{CD}127^+$, $\text{CD}4^+$, $\text{CD}8^+$, $\text{CD}45\text{RA}^+$ и/или $\text{CD}45\text{RO}^+$ Т-клетки.

Например, $\text{CD}3^+$, $\text{CD}28^+$ Т-клетки можно подвергать позитивной селекции с использованием конъюгированных с антителом против $\text{CD}3$ /антителом против $\text{CD}28$ магнитных гранул (например, DY-

NABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

В некоторых вариантах осуществления выделение поводят посредством увеличения в количестве конкретной популяции клеток путем позитивной селекции или истощения конкретной популяции клеток путем негативной селекции. В некоторых вариантах осуществления позитивную или негативную селекцию проводят путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другими связывающими соединениями, которые специфически связываются с одним или несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми (маркер+) или экспрессируемыми на относительно более высоком уровне (маркер^{высокий}) на клетках, подвергнутых позитивной или негативной селекции, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из образца РВМС посредством негативной селекции по маркерам, экспрессируемым на не Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие лейкоциты, такие как CD14. В некоторых аспектах стадию CD4+ или CD8+ селекции используют для разделения CD4+ хелперных и CD8+ цитотоксических Т-клеток. Такие популяции CD4+ и CD8+ можно далее сортировать на субпопуляции посредством позитивной или негативной селекции маркеров, экспрессируемых или экспрессируемых на относительно более высоком уровне на одной или нескольких наивных субпопуляциях Т-клеток, субпопуляциях Т-клеток памяти и/или субпопуляциях эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления среди CD8+ клеток далее увеличивают содержание или истощают наивные клетки, центральные клетки памяти, эффекторные клетки памяти и/или центральные стволовые клетки памяти, например, путем позитивной или негативной селекции на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления увеличение содержания центральных Т-клеток (Т_{CM}) памяти проводят для повышения эффективности, например, для повышения долговременной выживаемости, экспансии и/или приживления после введения, которые в некоторых аспектах являются особенно устойчивыми в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. Blood. 1:72-82 (2012); Wang et al. J Immunother. 35(9):689-701 (2012). В некоторых вариантах осуществления комбинирование обогащенных по TCM CD8+ Т-клеток и CD4+-клеток далее повышает эффективность.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L+, так и в CD62L- подгруппах CD8+ лимфоцитов периферической крови человека. В РВМС можно увеличивать содержание или истощать CD62L-CD8+ и/или CD62L+CD8+ фракции, например, с использованием антител против CD8 и против CD62L.

В некоторых вариантах осуществления увеличение содержания центральных Т-клеток памяти (Т_{CM}) основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах оно основано на негативной селекции клеток, экспрессирующих или экспрессирующих на высоком уровне CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах выделение CD8+ популяции, обогащенной клетками TCM, проводят путем истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и позитивной селекции или увеличения содержания клеток, экспрессирующих CD62L. В одном аспекте увеличение содержания центральных Т-клеток памяти (TCM) проводят, начиная с негативной фракции клеток, подвергнутой селекции на основе экспрессии CD4, которые подвергают негативной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и позитивной селекции на основе CD62L. Такую селекцию в некоторых аспектах проводят одновременно и в других аспектах ее проводят последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах ту же стадию селекции на основе экспрессии CD4, которую используют для получения популяции или субпопуляции CD8+ клеток, также используют для получения популяции или субпопуляции CD4+ клеток, так что как положительные, так и отрицательные фракции при разделении на основе CD4 сохраняются и используются для последующих стадий способов, необязательно после одной или нескольких дополнительных стадий позитивной или негативной селекции.

В конкретном примере образец РВМС или другой образец лейкоцитов подвергают селекции CD4+ клеток, где сохраняют как негативные, так и позитивные фракции. Негативную фракцию затем подвергают негативной селекции на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19, и позитивной селекции на основе маркера, характерного для центральных Т-клеток памяти, такого как CD62L или CCR7, где позитивную и негативную селекцию проводят в любом порядке.

CD4+ Т-хелперные клетки сортируют на наивные клетки, центральные клетки памяти и эффекторные клетки посредством идентификации популяций клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4+ лимфоциты можно получать стандартными способами. В некоторых вариантах осуществления наивные CD4+ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления центральные CD4+ клетки памяти являются CD62L+ и CD45RO+. В некоторых вариантах осуществления эффекторные CD4+ клетки представляют собой CD62L- и CD45RO-.

В одном примере для увеличения содержания CD4+ клеток посредством негативной селекции коктейль моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело или партнер по связыванию связывают с твердой подложкой или матрицей, такой как магнитные гранулы или парамагнитные гранулы, чтобы обеспечить

разделение клеток для позитивной и/или негативной селекции. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют с использованием способов иммуномагнитного (или аффинномагнитного) разделения (рассмотренных 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 и U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

В некоторых аспектах образец или композицию клеток, подлежащие разделению, инкубируют с мелким намагничивающимся или магниточувствительным материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как гранулы Dynalbeads или MACS). Магниточувствительный материал, например, частицы, обычно прямо или непрямо связан с партнером по связыванию, например, антителом, который специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательнее разделить, например, которые намереваются подвергнуть негативной или позитивной селекции.

В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или гранула содержит магниточувствительный материал, связанный с определенным связывающим партнером, таким как антитело или другой связывающий партнер. Существует множество магниточувствительных материалов, используемых в способах разделения. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патент США № 4452773, и описании патента Европы EP 452342 B, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок. Другими примерами являются коллоидные распределенные по размеру частицы, такие как частицы, описанные в патенте США № 4795698, Owen, и патенте США № 5200084, Liberti et al.

Инкубацию, как правило, 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 связаны с магнитной частицей или гранулой, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле и клетки, с которыми связаны магниточувствительные или намагничиваемые частицы, связываются с магнитом и отделяются от немеченых клеток. Для позитивной селекции клетки, связавшиеся с магнитом, сохраняют; для негативной селекции сохраняют клетки, которые не связались (немеченые клетки). В некоторых аспектах комбинацию позитивной и негативной селекции проводят в ходе той же стадии селекции, где позитивные и негативные фракции сохраняют и далее обрабатывают или подвергают другим стадиям разделения.

В определенных вариантах осуществления магниточувствительные частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В определенных вариантах осуществления магнитные частицы связывают с клетками посредством покрытия первичными антителами, специфичными к одному или нескольким маркерам. В определенных вариантах осуществления клетки, а не гранулы, метят первичным антителом или партнером по связыванию, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфическим для типа клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидин). В определенных вариантах осуществления покрытые стрептавидином магнитные частицы используют совместно с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы оставляют связанными с клетками, которые затем инкубируют, культивируют и/или модифицируют способами инженерии; в некоторых аспектах частицы оставляют связанными с клетками для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся или магниточувствительные частицы извлекают из клеток. Способы извлечения намагничиваемых частиц из клеток известны, и они включают, например, использование конкурирующих немеченых антител, и намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся частицы являются биodeградируемыми.

В некоторых вариантах осуществления селекцию на основе аффинности проводят посредством магнитно-активируемой сортировки клеток (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитно-активируемой сортировки клеток (MACS) способны к селекции с высокой чистотой клеток, с которыми связаны намагниченные частицы. В определенных вариантах осуществления MACS действует в режиме, в котором не являющиеся мишенью и являющиеся мишенью типы клеток последовательно элюируются после применения внешнего магнитного поля. Иными словами, клетки, связанные с магнитными частицами, удерживаются на месте, в то время как несвязанные типы клеток элюируются. Затем после завершения этой первой стадии элюирования типы клеток, которые были захвачены в магнитное поле и элюирование которых предотвращалось, освобождают таким образом, чтобы их можно было элюировать и извлечь. В определенных вариантах осуществления не являющиеся мишенью клетки метят и устраняют из гетерогенной популяции клеток.

В определенных вариантах осуществления выделения или разделения проводят с использованием системы, устройства или аппарата, которые осуществляют одну или несколько из стадий выделения, подготовки клеток, разделения, процессинга, инкубации, культивирования и/или составления. В некото-

рых аспектах используют систему для проведения каждой из этих стадий в закрытой или стерильной среде, например, для минимизации ошибки, обработки пользователем и/или контаминации. В одном примере система представляет собой систему, как описано в публикации PCT номер WO 2009/072003 или US 20110003380 A1.

В некоторых вариантах осуществления система или устройство проводят одну или несколько, например, все из стадий выделения, обработки, модификации и составления в объединенной или автономной системе, и/или автоматическим или программируемым образом. В некоторых аспектах система или устройство включает компьютер и/или компьютерную программу, соединенные с системой или устройством, которые позволяют пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или корректировать различные аспекты стадий обработки, выделения, модификации способами инженерии и составления.

В некоторых аспектах разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток в клиническом масштабе в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать интегрированный микрокомпьютер, элемент магнитного разделения, перистальтический насос и различные запорные клапаны. В некоторых аспектах интегрированный компьютер контролирует все компоненты устройства и управляет системой для выполнения повторяющихся процедур в стандартизированной последовательности. В некоторых аспектах элемент магнитного разделения включает подвижный постоянный магнит и подставку для колонки для селекции.

Перистальтический насос контролирует скорость потока через комплект трубок и, вместе с запорным клапаном обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и непрерывное суспендирование клеток.

В некоторых аспектах система CliniMACS использует намагничиваемые частицы, с которыми связано антитело, которые предоставляются в стерильном не пирогенном растворе. В некоторых вариантах осуществления после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления избытка частиц. Затем к комплекту трубок подсоединяют мешок для получения клеток, который в свою очередь соединяют с мешком, содержащим буфер, и мешком для сбора клеток. Комплект трубок состоит из заранее собранных стерильных трубок, в том числе трубки предколонки и колонки для разделения, и они предназначены только для однократного применения. После начала программы разделения, система автоматически подает образец клеток в колонку для разделения. Меченые клетки удерживаются в колонке, в то время как немеченые клетки удаляют посредством серии стадий промывания. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящем описании, являются немечеными и не удерживаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящем описании, являются мечеными и остаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящем описании, элюируются из колонки после устранения магнитного поля и собираются в мешок для сбора клеток.

В определенных вариантах осуществления разделение и/или другие стадии проводят с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). В некоторых аспектах система CliniMACS Prodigy оборудована элементом переработки клеток, который позволяет автоматическое промывание и фракционирование клеток посредством центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальный конечный этап фракционирования клеток путем различения макроскопических слоев продукта исходных клеток. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на слои эритроцитов, лейкоцитов и плазматитов. Система CliniMACS Prodigy также может включать встроенную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, например, такие как дифференцировка и экспансия клеток, нагрузка антигеном и длительное культивирование клеток. Входные отверстия могут позволить стерильное удаление и восполнение среды, и мониторинг клеток можно проводить с использованием встроенного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. *J Immunother.* 35(9): 651-660 (2012), Terakura et al. *Blood*.1:72-82 (2012), и Wang et al. *J Immunother.* 35(9):689-701 (2012).

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) проточной цитометрией, при которой клетки, окрашенные на несколько маркеров клеточной поверхности, перемещаются в потоке жидкости. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) сортировкой в препаративном масштабе (FACS). В определенных вариантах осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем описании, собирают и обогащают (или истощают) с использованием чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системной детекцией на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. *Lab Chip* 10, 1567-1573 (2010); и Godin et al. *J Biophoton.* 1(5):355-376 (2008)). В обоих случаях клетки можно метить несколькими маркерами, что позволяет выделение определенных подгрупп Т-клеток с высокой чистотой.

В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию метят одним или не-

сколькими поддающимися обнаружению маркерами для облегчения разделения для позитивной и/или негативной селекции. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно меченными антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфичных к одному или нескольким маркерам клеточной поверхности, проводят в потоке жидкости, например, посредством активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS), в том числе в препаративном масштабе (FACS), и/или на чипах микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в комбинации с системой проточно-цитометрической детекции. Такие способы позволяют позитивную и негативную селекцию на основе множества маркеров одновременно.

В некоторых вариантах осуществления способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации, клеток либо до, либо после выделения, инкубации и/или модификации способами инженерии. В некоторых вариантах осуществления стадия замораживания и последующего размораживания устраняет гранулоциты и в некоторой степени моноциты из популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадии промывания для плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах можно использовать любые из множества известных растворов для замораживания и параметров. Один пример вовлекает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточный альбумин человека (HSA), или другой подходящей среды для замораживания клеток. Затем ее разбавляют 1:1 средой до конечной концентрации DMSO и HSA 10% и 4%, соответственно. Затем клетки обычно замораживают до -80°C со скоростью 1°C в минуту и хранят в паровой фазе емкости для хранения с жидким азотом.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют и/или культивируют до или совместно с модификацией способами генной инженерии. Стадии инкубации могут включать культивирование, обработку, стимуляцию, активацию и/или увеличение в количестве. Инкубацию и/или модификацию способами инженерии можно проводить в емкости для культивирования, такой как элемент, камера, лунка, колонка, пробирка, комплект трубок, клапан, емкость, чашка для культивирования, мешок или другой контейнер для культивирования или обработки клеток. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий или стимулирующего средства. Такие условия включают условия, предназначенные для индукции пролиферации, экспансии, активации и/или выживаемости клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для подготовки клеток для модификации способами генной инженерии, например, для введения рекомбинантного рецептора антигена.

Условия могут включать одно или несколько из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания диоксида углерода, времени, средств, 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 средства, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления условия стимуляции или средства включают одно или несколько средств, например, лиганд, которые способны активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах средство включает или инициирует каскад внутриклеточной передачи сигнала TCR/CD3 в Т-клетке. Такие средства могут включать антитела, такие как антитела, специфичные к TCR, например, компоненту и/или костимулирующему рецептору, например, антитело против CD3, антитело против CD28, например, связаны с твердой подложкой, такой как гранулы, и/или одним или несколькими цитокинами. Необязательно, способ экспансии может дополнительно включать стадию добавления антитела против CD3 и/или против CD28 в культуральную среду (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие средства включают IL-2 и/или IL-15, например, IL-2 в концентрации по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах инкубацию проводят в соответствии со способами, такими как способы, описанные в патенте США № 6040177, выданном Riddell et al., Klebanoff et al., *J Immunother.* 35(9): 651-660 (2012), Terakura et al., *Blood.* 1:72-82 (2012), и/или Wang et al., *J Immunother.* 35(9): 689-701 (2012).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки увеличивают в количестве путем добавления в композицию для инициации культуры фидерных клеток, таких как не делящиеся мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) (например, так чтобы конечная популяция клеток содержала по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС на каждый Т-лимфоцит в первоначальной популяции, подлежащей увеличению в количестве); и инкубации культуры (например, в течение периода времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах не делящиеся фидерные клетки могут включать облученные гамма-излучением фидерные клетки РВМС. В некоторых вариантах осуществления РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне приблизительно от 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах фидерные клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления условия стимуляции включают температуру, пригодную для выращивания Т-лимфоцитов человека, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, как правило, по меньшей мере приблизительно 30 градусов Цельсия, и обычно ровно или прибли-

тельно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление не делящихся трансформированных EBV лимфобластоидных клеток (LCL) в качестве фидерных клеток. LCL можно облучать гамма-лучами в диапазоне приблизительно от 6000 до 10000 рад. В некоторых аспектах фидерные клетки LCL предоставляют в любом подходящем количестве, таком как соотношение фидерных клеток LCL и исходных Т-лимфоцитов, составляющее по меньшей мере приблизительно 10:1.

В некоторых вариантах осуществления антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают путем стимуляции наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов антигеном. Например, линии или клоны антигенспецифических Т-клеток к антигенам цитомегаловируса можно получать путем получения Т-клеток от инфицированных индивидуумов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном.

С. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генной инженерии

В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, модифицируют способами инженерии для экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления модификацию проводят путем введения молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют рекомбинантный рецептор. Также предусматриваются молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или молекулы нуклеиновых кислот.

В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, химерный рецептор антигена (CAR), содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. В некоторых аспектах сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, происходящий из нативного полипептида. В других аспектах сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид происходит из трансмембранного белка. В некоторых примерах сигнальный пептид происходит из CD8a, CD33 или IgG. Неограничивающие иллюстративные примеры сигнальных пептидов включают, например, сигнальный пептид CD33, указанный в SEQ ID NO: 153, сигнальный пептид CD8a, указанный в SEQ ID NO: 39, или сигнальный пептид, указанный в SEQ ID NO: 40, или его модифицированный вариант.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, который функционально связан для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах молекула нуклеиновой кислоты содержит два, три или более промоторов, функционально связанных для контроля экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может содержать регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфическими для типа хозяина (например, бактерия, грибок, растение или животное), которому собираются вводить молекулу нуклеиновой кислоты, в зависимости от ситуации и учитывая, является ли молекула нуклеиновой кислоты основанной на ДНК или на РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может содержать регуляторные элементы/элементы контроля, такие как промотор, энхансер, интрон, сигнал полиаденилирования, консенсусная последовательность Козака и акцептор или донор сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты может содержать ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей рекомбинантный рецептор, и/или одним или несколькими дополнительным полипептидом(ами). В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из промотора РНК pol I, pol II или pol III. В некоторых вариантах осуществления промотор распознается РНК-полимеразой II (например, промотор CMV, ранняя область SV40 или основной поздний промотор аденовируса). В другом варианте осуществления промотор распознается РНК-полимеразой III (например, промотор U6 или H1). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой невирусный промотор или вирусный промотор, такой как промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, находящийся в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мыши. Также предусматриваются другие промоторы.

В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой или включает конститутивный промотор. Иллюстративные конститутивные промоторы включают, например, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), предранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор убиквитина С человека (UBC), промотор фактора элонгации 1 α человека (EF1 α), промотор фосфоглицераткиназы 1 мыши (PGK) и промотор β -актина курицы, сопряженный с ранним энхансером CMV (CAGG). В некоторых вариантах осуществления конститутивный промотор представляет собой синтетический или модифицированный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой или включает промотор MND, синтетический промотор, который содержит область U3 модифицированного LTR MoMuLV с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы (см. Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В другом варианте осуществления промотор представляет собой вирусный промотор. В другом варианте осуществления промотор представляет собой невирусный промотор.

В другом варианте осуществления промотор представляет собой регулируемый промотор (например, индуцибельный промотор). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор или репрессируемый промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит последовательность Лас-оператора, последовательность тетрациклинового оператора, последовательность галактозного оператора или последовательность доксицилинового оператора, или представляет собой их аналог и способен быть связанным Лас-репрессором или тетрациклиновым репрессором, или их аналогом. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты не включает регуляторный элемент, например, промотор.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например, CAR или другой рецептор антигена, дополнительно включает последовательности нуклеиновых кислот кодирующие маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой антиген, включают маркер, например, заместительный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который можно использовать для подтверждения трансдукции или модификации клеток для экспрессии рецептора, такой как укороченная версия поверхностного рецептора, такая как укороченный EGFR (tEGFR). В некоторых вариантах осуществления один или несколько маркер(ов) представляет собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или селективный маркер.

В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный маркер можно использовать для детекции клеток, в которые введена молекула нуклеиновой кислоты, например, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления маркер трансдукции может указывать на или подтверждать модификацию клетки. В некоторых вариантах осуществления суррогатный маркер представляет собой белок, который получен для совместной экспрессии на поверхности клетки с рекомбинантным рецептором, например CAR. В конкретных вариантах осуществления такой суррогатный маркер представляет собой белок поверхности, модифицированный так чтобы он имел небольшую активность или не имел активности. В определенных вариантах осуществления суррогатный маркер кодируется той же молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно отделенной участком внутренней посадки рибосомы (IRES), или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает рибосомальное пропускание, такой как последовательность 2A, такая как T2A (например, SEQ ID NO: 6 или 167), P2A (например, SEQ ID NO: 168 или 169), E2A (например, SEQ ID NO: 170) или F2A (например, SEQ ID NO: 172). В некоторых случаях можно использовать посторонние маркерные гены совместно с модифицированной клетки для обеспечения детекции или селекции в клетках и, в некоторых случаях, также для стимуляции клеточного суицида.

Иллюстративные суррогатные маркеры могут включать укороченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как укороченные формы, которые являются нефункциональными и не передают или не способны передавать сигнал, обычно передаваемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не интернализуются или не способны интернализироваться. Иллюстративные укороченные полипептиды клеточной поверхности включают укороченные формы факторов роста или других рецепторов, таких как укороченный рецептор эпидермального фактора роста рецептор 2 человека (tHER2), укороченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, иллюстративная последовательность tEGFR приведена в SEQ ID NO: 7 или 166) или простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или их модифицированную форму. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимабом (Erbitux®) или другим терапевтическим антителом против EGFR или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или селекции клеток, модифицированных конструкцией tEGFR, и кодируемого экзогенного белка, и/или для устранения или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый экзогенный белок. См. патент США № 8802374 и Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434). В некоторых аспектах маркер, например, суррогатный маркер, включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR, CD19 или укороченный CD19, например, укороченный не являющийся человеческим CD19, или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как сверхсвернутый GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), синий флуоресцентный белок (BFP), усиленный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP), и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или усиленные варианты флуоресцентных белков. В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген lacZ из *E. coli*, щелочную фосфатазу, секретлируемую эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT). Иллюстративные репортерные гены для испускания света включают люциферазу

(luc), β-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β-глюкуронидазу (GUS) или их варианты.

В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой селективный маркер. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или включает полипептид, который обеспечивает резистентность к экзогенным агентам или лекарственным средствам. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику.

В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой ген устойчивости к антибиотику, который сообщает клетке млекопитающего устойчивость к антибиотику. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер представляет собой или содержит ген устойчивости к пуромицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомизину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину, или их модифицированную форму.

В некоторых аспектах маркер, например, суррогатный маркер, включает весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR или рецептора эпидермального фактора роста (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 представлять собой любой маркер и линкерную последовательность, описанные в публикации РСТ № WO 2014031687. Например, маркер может представлять собой укороченный EGFR (tEGFR), который необязательно связан с линкерной последовательностью, такой как последовательность расщепляемого линкера T2A. Иллюстративный полипептид для укороченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7 или 166, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7 или 166. Иллюстративная последовательность линкера T2A включает последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6 или 167, или последовательность аминокислот, которая обладает по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6 или 167.

В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, белок клеточной поверхности, не встречающуюся в природе на Т-клетках или не встречающуюся в природе на поверхности Т-клеток, или ее часть. В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой не собственную молекулу, например, не собственный белок, т.е. белок, который не распознается как "собственный" иммунной системой хозяина, которому будут проводить адоптивный перенос клеток.

В некоторых вариантах осуществления маркер не выполняет терапевтическую функцию и/или не имеет эффекта, отличного от применения в качестве маркера для генной инженерии, например, для селекции успешно модифицированных клеток. В других вариантах осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом проявляющую некоторый желаемый эффект, такую как лиганд для клетки, которая встретится *in vivo*, такой как костимулирующая молекула или молекула иммунной точки контроля для усиления и/или снижения ответов клеток при адоптивном переносе и встрече с лигандом.

В некоторых вариантах осуществления один промотор может контролировать экспрессию РНК, которая содержит в одной рамке считывания (ORF) два или три гена, разделенных последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательности 2A) или участок распознавания протеазой (например, фурин). Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который либо в процессе (в случае 2A), либо после трансляции процессируется в индивидуальные белки. В некоторых случаях пептид, такой как T2A, может вызывать пропуск рибосомой (рибосомальное пропускание) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и нижеследующим пептидом (см., например, de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и deFelipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)). Многие элементы 2A известны в данной области. Примеры последовательностей 2A, которые можно использовать в способах и нуклеиновых кислотах, описанных в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, последовательности 2A из вируса ящура (F2A), вируса А ринита лошадей (E2A), вируса *Thosea asigna* (T2A, например, SEQ ID NO: 6), и тесховируса 1 свиней (P2A), как описано в публикации патента США № 20070116690.

Введение молекул нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантный рецептор, в клетку можно проводить с использованием любого из ряда известных векторов. Такие векторы включают вирусные и невирусные системы, в том числе лентивирусные и гамма-ретровирусные системы, а также системы на основе транспозонов, такие как системы переноса генов на основе PiggyBac или Sleeping Beauty. Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе посредством вирусной, например, ретровирусной или лентивирусной, трансдукции, транспозонов и электропорации.

В некоторых вариантах осуществления перенос генов проводят сначала путем стимуляции клетки, например, применения к ней стимула, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживание

и/или активация, например, при определении по экспрессии цитокина или маркера активации с последующей трансдукцией активированных клеток и экспансией в культуре до количеств, достаточных для клинических применений.

В некоторых вариантах осуществления перед или в ходе переноса генов клетки инкубируют или культивируют в присутствии ингибитора гамма-секретазы, включая любой ингибитор гамма-секретазы, описанный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы добавляют в ходе процесса получения клеток, например, в ходе процесса модификации CAR-T-клеток. В некоторых аспектах присутствие ингибитора гамма-секретазы может повышать качество популяции получаемых клеток. В некоторых аспектах ингибитор гамма-секретазы может повышать пролиферацию или экспансию клеток или может изменять один или несколько каскадов передачи сигнала, тем самым получая клетки с менее дифференцированным или менее активированным фенотипом поверхности, несмотря на демонстрацию значительной экспансии и/или эффекторной функции.

В некоторых контекстах сверхэкспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может быть токсичной для индивидуума. Таким образом, в некоторых контекстах модифицированные способами инженерии клетки включают сегменты генов, которые делают клетки чувствительными к негативной селекции *in vivo*, например, при введении в адоптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах клетки модифицируют способами инженерии так, чтобы их можно было удалить посредством изменения условий *in vivo* у индивидуума, которому их вводят. Поддающийся негативной селекции фенотип может быть результатом инсерции гена, который сообщает чувствительность введённому средству, например, соединению. Поддающиеся негативной селекции гены включают ген тимидинкиназы вируса простого герпеса типа I (HSV-I TK) (Wigler et al., *Cell* 2:223, 1977), который сообщает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT), ген бактериальной цитозиндезаминазы (Mullen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:33 (1992)).

В некоторых вариантах осуществления клетки трансфицируют рекомбинантными нуклеиновыми кислотами с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, например, таких как векторы, происходящие из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в T-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 концевого повтора (LTR), например, ретровирусный вектор происходит из вируса лейкоза мышей Молодни (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мышей (MESV), вируса стволовых клеток мышей (MSCV), вируса некроза селезенки (SFFV) или аденоассоциированного вируса (AAV). Большинство ретровирусных векторов происходят из ретровирусов мыши. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают ретровирусы, происходящие из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы, как правило, являются амфотерными, что означает, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, в том числе человека. В одном варианте осуществления ген, подлежащий экспрессии, заменяет ретровирусные последовательности *gag*, *pol* и/или *env*. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США № 5219740; 6207453; 5219740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

Способы лентивирусной трансдукции известны. Иллюстративные 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; и Cavalieri et al. (2003) *Blood*. 102(2): 497-505.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в T-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 T-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 иммунных клетках включают трансфекцию с фосфатом кальция (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, опосредуемую катионными липосомами трансфекцию; облегченную частицами вольфрама бомбардировку микрочастиц (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, представляют собой векторы и подходы, описанные, например, в публикации международной патентной заявки № WO2014055668 и патенте США №7446190.

В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, можно трансфицировать либо в процессе, либо после экспансии, например, Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным рецептором антигена (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желаемого рецептора можно проводить, например, с помощью любого подходящего ретровирусного вектора. Затем популяцию генетически модифицированных клеток можно освобождать от первоначального стимула (стимул CD3/CD28, например), а затем стимулировать вторым типом стимула, например, через введенный *de novo* рецептор). Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме молекулы пептид/МНС, собственного (связывающего) лиганда введенного способами генной инженерии рецептора (например, природный лиганд CAR) или любого лиганда (такого как антитело), который прямо связывается с каркасом нового рецептора (например, посредством распознавания константных областей в рецепторе). 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*).

В некоторых случаях можно использовать вектор, который не требует активации клеток, например, Т-клеток. В некоторых таких случаях клетку можно подвергать селекции и/или трансдуцировать перед активацией. Таким образом, клетки можно модифицировать способами инженерии до или после культивирования клеток и в некоторых случаях в то же время или в процессе по меньшей мере части культивирования.

В некоторых аспектах, клетки, кроме того, модифицируют способами инженерии для обеспечения экспрессии цитокинов или других факторов. Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, генов, подлежащих введению, представлены гены, которые повышают эффективность терапии, например, путем обеспечения жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены, предоставляющие генетический маркер для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены, повышающие безопасность, например, делая клетку чувствительной к отрицательной селекции *in vivo*, как описано Lupton S. D. et al., *Mol. и Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); также см. публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601, Lupton et al., в которых описано применение бифункциональных селективных слитых генов, образованных путем слияния доминантного положительного селективного маркера с негативным селективным маркером. См., например, Riddell et al., патент США № 6040177, колонки 14-17.

III. Иллюстративные исходы лечения и способы их оценки

В некоторых вариантах осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений, описанных в настоящем описании, предусматриваемая комбинированная терапия приводит к одному или нескольким исходам лечения, таким как признак, ассоциированный с одним или несколькими из параметров, ассоциированных с терапией или лечением, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ включает оценку экспозиции, персистенции и пролиферации Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления экспозицию, или длительную экспансию, и/или длительность нахождения клеток, и/или изменения клеточных фенотипов или функциональной активности клеток, например, клеток, введенных для иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, в способах, описанных в настоящем описании, можно определять путем оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы анализа можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, используемых для иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, до или после проведения клеточной терапии, описанной в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия, кроме того, может включать одну или несколько стадий скрининга для идентификации индивидуумов для лечения посредством комбинированной терапии и/или продолжения комбинированной терапии, и/или стадию оценки исходов лечения и/или мониторинга исходов лечения. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы, пригодные для лечения, имеют низкую поверхностную экспрессию ВСМА. В некоторых вариантах осуществления низкую поверхностную экспрессию ВСМА выявляют путем сравнения экспрессии ВСМА у индивидуума со средней поверхностной экспрессией ВСМА в популяции индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия ВСМА представляет собой уровень экспрессии ВСМА, который ниже средней популяционной величины. В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия ВСМА представляет собой уровень экспрессии ВСМА, который ровно, приблизительно, по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 раз или более меньше, или на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или более меньше среднего уровня экспрессии ВСМА в популяции здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления низкую поверхностную экспрессию ВСМА выявляют путем сравнения экспрессии ВСМА у индивидуума со средней поверхностной экспрессией ВСМА в популяции здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия ВСМА представляет собой уровень экспрессии ВСМА, который меньше средней популяционной величины. В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия ВСМА представляет собой уровень экспрессии ВСМА, который ровно, приблизительно, по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 раз или более меньше, или на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или более меньше среднего уровня

экспрессии ВСМА в популяции здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления низкую поверхностную экспрессию ВСМА выявляют путем сравнения экспрессии ВСМА у индивидуума против средней поверхностной экспрессии ВСМА в популяции пациентов (например, популяция пациентов с множественной миеломой). В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия ВСМА представляет собой уровень экспрессии ВСМА, который равно, приблизительно, по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 раз или более меньше, или на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более меньше среднего уровня экспрессии ВСМА в популяции пациентов (например, популяция пациентов с множественной миеломой). В некоторых вариантах осуществления низкую поверхностную экспрессию ВСМА выявляют путем сравнения экспрессии ВСМА у индивидуума со средней поверхностной экспрессией ВСМА в популяции пациентов (например, популяция пациентов с множественной миеломой). В некоторых вариантах осуществления низкая экспрессия ВСМА представляет собой уровень экспрессии ВСМА, который равно, приблизительно, по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 раз или более меньше, или на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или более меньше, среднего уровня экспрессии ВСМА в популяции пациентов (например, популяция пациентов с множественной миеломой). В некоторых вариантах осуществления определение низкой экспрессии ВСМА у индивидуума можно проводить путем сравнения экспрессии ВСМА у индивидуума в два или более различных моментов времени (например, до постановки диагноза и после постановки диагноза, при постановке диагнозе и в момент времени после постановки диагноза, до лечения и после лечения и т.д.). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этим способом низкую экспрессию ВСМА можно рассматривать как приблизительно или по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более снижение экспрессии ВСМА по сравнению с более ранним моментом времени.

В некоторых вариантах осуществления низкой экспрессией ВСМА считают экспрессию ВСМА ниже порогового уровня. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень равно, приблизительно, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более ниже среднего или среднего уровня экспрессии ВСМА, установленного для популяции здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень равно, приблизительно, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более ниже среднего или среднего уровня экспрессии ВСМА, установленного для популяции пациентов (например, пациенты с множественной миеломой). В некоторых вариантах осуществления пороговый уровень равно, приблизительно, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более ниже уровня экспрессии ВСМА, полученного для индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления стадия оценки исходов лечения может включать стадии оценки, и/или мониторинга лечения, и/или идентификации индивидуумов для проведения дополнительных или остальных стадий терапии и/или для повторения терапии. В некоторых вариантах осуществления стадию скрининга и/или оценку исходов лечения можно использовать для определения дозы, частоты, длительности, времени и/или порядка комбинированной терапии, описанной в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления любую из стадий скрининга и/или оценку исходов лечения, описанные в настоящем описании, можно использовать до, в ходе, в ходе курса или после проведения одной или нескольких стадий предусматриваемой комбинированной терапии, например, проведения терапии Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), и/или введения ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят до, в ходе, в ходе курса или после проведения любого из способов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят до проведения способов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят после проведения одной или нескольких стадий способов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят до проведения одной или нескольких стадий предусматриваемой комбинированной терапии, например, для скрининга и идентификации пациентов пригодных и/или восприимчивых к проведению комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят в ходе, в ходе курса или после проведения одной или нескольких стадий предусматриваемой комбинированной терапии, например, для оценки промежуточного или конечного исхода лечения, например, для определения эффективности лечения и/или для определения того, продолжать ли или повторять ли лечение, и/или для определения того, проводить ли остальные стадии комбинированной терапии.

В некоторых вариантах осуществления исходы лечения включают улучшение иммунной функции, например, иммунной функции Т-клеток, введенных для терапии на основе клеток, и/или эндогенных Т-клеток в организме. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные исходы лечения включают, но не ограничиваются ими, усиленную пролиферацию Т-клеток, усиленную функциональную активность Т-клеток, изменения экспрессии фенотипических маркеров иммунных клеток, такие как признаки, ассоциированные с модифицированными Т-клетками, например CAR-Т-клетками, вводимыми индивидууму. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные исходы лечения включают снижение нагрузки заболеванием, например, опухолевой нагрузки, улучшение клинических исходов и/или повышение эффективности терапии.

В некоторых вариантах осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения включает оценку выживания и/или функции Т-клеток, введенных для клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения включает оценку уровней цитокинов или факторов роста. В некоторых вариантах осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения включает оценку нагрузки заболеванием и/или улучшений, например, оценку опухолевой нагрузки и/или клинических исходов. В некоторых вариантах осуществления любая из стадий скрининга и/или оценки исходов лечения может включать любой из способов оценки и/или анализов, описанных в настоящем описании и/или известных в данной области, и их можно проводить один или несколько раз, например, до, в ходе, в ходе курса или после проведения одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Иллюстративные наборы параметров, ассоциированных с исходом лечения, которые можно оценивать в некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании, включают профиль популяции иммунных клеток в периферической крови и/или опухолевую нагрузку.

В некоторых вариантах осуществления способы влияют на эффективность клеточной терапии у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления персистенция, экспансия и/или присутствие экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например, экспрессирующих CAR, клеток у индивидуума после введения дозы клеток в способе с ингибитором гамма-секретазы являются более высокими, чем в случае способа без введения ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления способов иммунотерапии, описанных в настоящем описании, таких как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), оценка параметра включает оценку экспансии и/или персистенции у индивидуума введенных Т-клеток для иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, по сравнению со способом, в котором иммунотерапию проводят у индивидуума в отсутствие ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления способы приводят к демонстрации введенными Т-клетками увеличенной или пролонгированной экспансии и/или персистенции у индивидуума по сравнению со способом, при котором терапию Т-клетками проводят у индивидуума в отсутствие ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы снижает нагрузку заболеванием, например, опухолевую нагрузку, у индивидуума по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят индивидууму в отсутствие ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы снижает число бластов в костном мозге индивидуума по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят индивидууму в отсутствие ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы приводит к улучшенному клиническому исходу, например, объективному показателю ответа (ORR), выживаемости без прогрессирования (PFS) и общей выживаемости (OS) по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят индивидууму в отсутствие ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума можно подвергать скринингу перед проведением одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Например, индивидуума можно подвергать скринингу в отношении характеристик заболевания и/или нагрузки заболеванием, например, опухолевой нагрузки, перед проведением комбинированной терапии для определения пригодности, способности отвечать и/или восприимчивости к проведению комбинированной терапии. В некоторых вариантах осуществления стадию скрининга и/или оценку исхода лечения можно использовать для определения дозы, частоты, длительности, времени и/или порядка комбинированной терапии, предусматриваемой в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления индивидуума можно подвергать скринингу после проведения одной из стадий комбинированной терапии для определения и идентификации индивидуумов для проведения остальных стадий комбинированной терапии и/или для мониторинга эффективности терапии. В некоторых вариантах осуществления количество, уровень или число введенных Т-клеток, и/или пролиферацию и/или активность введенных Т-клеток оценивают до введения и/или после введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят до тех пор, пока концентрация или количество модифицированных клеток в крови индивидуума не составит (i) по меньшей мере ровно или приблизительно 10 модифицированных клеток на микролитр, (ii) по меньшей мере 20%, 30%, 40% или 50% от общего числа мононуклеарных клеток периферической крови (ПВМС), (iii) по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^5 модифицированных клеток; или (iv) по меньшей мере 5000 копий кодирующей рекомбинантный рецептор ДНК на микрограмм ДНК; и/или на 90 сутки после начала введения согласно (а), экспрессирующие CAR клетки поддаются обнаружению в крови или сыворотке индивидуума; и/или на 90 сутки после начала введения согласно (а) кровь индивидуума содержит по меньшей мере 20% экспрессирующих CAR клеток, по меньшей мере 10 экспрессирующих CAR клеток на микролитр или по меньшей мере 1×10^4 экспрессирующих CAR клеток.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор гамма-секретазы вводят, пока присутствует клиническая польза лечения, например снижение по меньшей мере или более чем на 50% общего объема

опухоли, до полного ответа (CR), при котором поддающаяся обнаружению опухоль исчезает, при наличии выживаемости без прогрессирования или выживаемости без заболевания в течение более 6 месяцев, или более или 1 года или более.

В некоторых вариантах осуществления определяют или оценивают изменение и/или варьирование, например, повышение, увеличение, снижение или уменьшение уровней, величин или показателей параметра или исхода по сравнению с уровнями, величинами или показателями того же параметра или исхода в другой момент времени оценки, в других условиях, в эталонный момент времени и/или у другого индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления можно определять кратность изменения, например, увеличение или снижение, конкретных параметров, например, количества модифицированных Т-клеток в образце, по сравнению с тем же параметром в других условиях, например, до или после введения ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления определяют уровень, величины или показатели двух или более параметров и сравнивают относительные уровни. В некоторых вариантах осуществления определенные уровни, величины или показатели параметров сравнивают с уровнями, величинами или параметрами для контрольного образца или образца пациента без лечения. В некоторых вариантах осуществления определенные уровни, величины или показатели параметров сравнивают с уровнями из образца от того же индивидуума, но в другой момент времени. Величины, полученные при количественном определении индивидуального параметра, можно комбинировать для оценки заболевания, например, путем арифметической или логической операции для уровней, величин или показателей параметров с использованием мультипараметрического анализа. В некоторых вариантах осуществления можно вычислять соотношение двух или более конкретных параметров.

А. Экспозиция, персистенция и пролиферация Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления параметр, ассоциированный с исходом терапии или лечения, который включает параметры, которые можно оценивать для стадий скрининга и/или оценки исходов лечения, и/или для мониторинга исходов лечения, представляет собой или включает оценку экспозиции, персистенции и пролиферации Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение экспозиции, или пролонгирование экспансии и/или персистенции клеток, и/или изменения клеточных фенотипов или функциональной активности клеток, например, клеток, введенных для иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, в способах, предусматриваемых в настоящем описании, можно определять путем оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы анализа можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, используемых для иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, до или после проведения одной или нескольких стадий комбинированной терапии, описанной в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы предназначено для усиления воздействия на индивидуума клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток, например, путем повышения их экспансии и/или персистенции с течением времени. В некоторых вариантах осуществления терапия Т-клетками демонстрирует увеличенную или пролонгированную экспансию и/или персистенцию у индивидуума по сравнению со способом, в котором терапию Т-клетками проводят у индивидуума в отсутствие ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы усиливают воздействие на индивидуума введенных клеток (например, увеличивают количество клеток или длительность воздействия) и/или улучшают эффективность и терапевтические исходы иммунотерапии, например, терапии Т-клетками. В некоторых аспектах способы являются преимущественными, поскольку более высокая и/или более длительная степень воздействия клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, например, CAR-экспрессирующие клетки, улучшает исходы лечения по сравнению с другими способами. Такие исходы могут включать выживаемость и ремиссию пациентов даже у индивидуумов с тяжелой опухолевой нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы может повышать максимальное, общее воздействие и/или длительность воздействия клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток, у индивидуума по сравнению с введением Т-клеток отдельно или в отсутствие ингибитора гамма-секретазы. В некоторых аспектах введение ингибитора гамма-секретазы в контексте высокой нагрузки заболеванием (и, таким образом, более высоких количеств антигена) и/или более агрессивной или резистентной злокачественной опухоли повышает эффективность по сравнению с введением Т-клеток отдельно в отсутствие ингибитора гамма-секретазы в том же контексте, что может приводить к иммуносупрессии, анергии и/или истощению, которые могут препятствовать экспансии и/или персистенции клеток.

В некоторых вариантах осуществления проводят определение присутствия и/или количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, введенных для терапии на основе Т-клеток) у индивидуума после введения Т-клеток и до, в ходе и/или после введения ингибитора гамма-секретазы. В некоторых аспектах количественную ПЦР (кПЦР) используют для оценки количества клеток, экспрессирующих рецептор (например, CAR-экспрессирующие клетки для терапии на основе Т-клеток) в образце крови, или сыворотки, или органа, или ткани (например, пора-

женной заболеванием области, например, в образце опухоли) индивидуума. В некоторых аспектах персистенция количественно определяют в качестве количества копий ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, например, CAR, на микрограмм ДНК, или в качестве количества экспрессирующих рецептор, например, экспрессирующих CAR, клеток на микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), или лейкоцитов, или Т-клеток, на микролитр образца.

В некоторых вариантах осуществления клетки выявляют у индивидуума ровно или по меньшей мере через 4, 14, 15, 27 или 28 суток после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток. В некоторых аспектах клетки выявляют ровно или по меньшей мере через 2, 4 или 6 недель, или через 3, 6, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев, или через 1, 2, 3, 4, 5 или более лет после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления персистенция экспрессирующих рецептор клеток (например, CAR-экспрессирующих клеток) у индивидуума после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или ингибитора гамма-секретазы, способами является более высоким по сравнению с персистенцией, которое было бы достигнуто с помощью альтернативных способов, таких как способы, вовлекающие проведение иммунотерапии отдельно, например, введение Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, в отсутствие ингибитора гамма-секретазы.

Экспозиция, например, количество клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии Т-клетками, указывающая на экспансию и/или персистенция, может быть указана в значениях максимальных количеств клеток, воздействию которых подвергается индивидуум, длительности обнаружения клеток или обнаружения клеток выше определенного количества или процента, площади под кривой для количества клеток с течением времени и/или их комбинаций и индикаторов. Такие исходы можно оценивать с использованием известных способов, таких как кПЦР, для определения количества копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, по сравнению с общим количеством нуклеиновой кислоты или ДНК в конкретном образце, например, крови, сыворотке, плазме или ткани, таком как образец опухоли, и/или проточно-цитометрического анализа, определяющего клетки, экспрессирующие рецептор, как правило, с использованием антител, специфичных к рецепторам. Клеточные способы анализа также можно использовать для определения количества или процента функциональных клеток, таких как клетки, способные связываться, и/или нейтрализовывать, и/или индуцировать ответы, например, цитотоксические ответы, против клеток, связанных с заболеванием или состоянием, или экспрессирующих антиген, распознаваемый рецептором.

В некоторых аспектах усиление воздействия на индивидуума клеток включает увеличение экспансии клеток. В некоторых вариантах осуществления экспансия экспрессирующих рецептор клеток, например, CAR-экспрессирующих клеток, происходит у индивидуума после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или после введения ингибитора гамма-секретазы. В некоторых аспектах способы приводят к большей экспансии клеток по сравнению с другими способами, такими как способы, вовлекающими введение Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, в отсутствие введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых аспектах способ приводит к высокой пролиферации *in vivo* введенных клеток, например, при определении проточной цитометрией. В некоторых аспектах выявляют высокие максимальные соотношения клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления при пиковом или максимальном уровне или концентрации после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или ингибитора гамма-секретазы в крови или пораженной заболеванием области индивидуума или их лейкоцитарной фракции, например, фракции РВМС или фракции Т-клеток, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR.

В некоторых вариантах осуществления способ приводит к максимальной концентрации в крови или сыворотке, или другой жидкости организма, или органе, или ткани индивидуума, составляющей по меньшей мере 100, 500, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000 или 15000 копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рецептор, например CAR, на микрограмм ДНК, или по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 или 0,9 экспрессирующих рецептор, например, CAR-экспрессирующих клеток, на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), общее количество мононуклеарных клеток, общее количество Т-клеток или общее количество микролитров. В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рецептор, выявляют в количестве по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50 или 60% от РВМС в крови индивидуума, и/или на таком уровне в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 36, 48 или 52 недель после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или ингибитора гамма-секретазы или в течение 1, 2, 3, 4 или 5, или более лет после такого введения.

В некоторых аспектах, способ приводит к увеличению копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, например, CAR, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, на микрограмм ДНК, например, в образце сыво-

ротки, плазмы, крови или ткани, например, образце опухоли, индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие рецептор, обнаруживаются в образце сыворотки, плазмы, крови или ткани, например, образце опухоли, индивидуума, например, определенным способом, таким как кПЦР или способ обнаружения на основе проточной цитометрии, по меньшей мере через 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 или более суток после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, или после введения ингибитора гамма-секретазы, в течение по меньшей мере ровно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 или более недель после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых аспектах по меньшей мере приблизительно 1×10^2 , по меньшей мере приблизительно 1×10^3 , по меньшей мере приблизительно 1×10^4 , по меньшей мере приблизительно 1×10^5 , или по меньшей мере приблизительно 1×10^6 или по меньшей мере приблизительно 5×10^6 или по меньшей мере приблизительно 1×10^7 или по меньшей мере приблизительно 5×10^7 или по меньшей мере приблизительно 1×10^8 экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, например, CAR-экспрессирующих клеток, и/или по меньшей мере 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, или 500, или 1000 экспрессирующих рецептор клеток на микролитр, например, по меньшей мере 10 на микролитр, обнаруживается или присутствует у индивидуума или в его жидкости, плазме, сыворотке, ткани или отделе, например, в его периферической крови, пораженной заболеванием области, например, опухоли. В некоторых вариантах осуществления такое количество или концентрация клеток обнаруживаются у индивидуума в течение по меньшей мере приблизительно 20 суток, по меньшей мере приблизительно 40 суток, или по меньшей мере приблизительно 60 суток, или по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 2 или 3 лет после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или после введения ингибитора гамма-секретазы. Такие количества клеток могут быть такими, как обнаруживают с использованием способов на основе проточной цитометрии или количественной ПЦР, и экстраполируют к общим количествам клеток с использованием известных способов. См., например, Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5(177), Park et al, *Molecular Therapy* 15(4):825-833 (2007), Savoldo et al., *JCI* 121(5):1822-1826 (2011), Davila et al., (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338, Davila et al., *Oncoimmunology* 1(9): 1577-1583 (2012), Lamers, *Blood* 2011 117:72-82, Jensen et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 2010 September; 16(9): 1245-1256, Brentjens et al., *Blood* 2011 118(18):4817-4828.

В некоторых аспектах количество копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, например, количество копий вектора, на 100 клеток, например, в периферической крови или костном мозге, или другом отделе, как определяют посредством иммуногистохимии, ПЦР и/или проточной цитометрии, составляет по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 1 или по меньшей мере 10, через приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель или по меньшей мере приблизительно 6 недель, или по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев, или по меньшей мере 2 или 3 года после введения клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления количество копий вектор, экспрессирующего рецептор, например CAR, на микрограмм геномной ДНК составляет по меньшей мере 100, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, или по меньшей мере 10000, или по меньшей мере 15000, или по меньшей мере 20000 в момент времени, составляющий приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, или по меньшей мере приблизительно через 4 недели после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток или ингибитор гамма-секретазы, или по меньшей мере через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или по меньшей мере 2 или 3 года после такого введения.

В некоторых аспектах рецептор, например CAR, экспрессируемый клетками, выявляется количественной ПЦР (кПЦР) или проточной цитометрией у индивидуума, в плазме, сыворотке, крови, ткани и/или пораженной заболеванием области, например, области опухоли, в момент времени, который составляет по меньшей мере приблизительно 3 месяца, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 1 год, по меньшей мере приблизительно 2 года, по меньшей мере приблизительно 3 года или более 3 лет после введения клеток, например, после начала введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления площадь под кривой (AUC) концентрации экспрессирующих рецептор (например, CAR) клеток в жидкости, плазме, сыворотке, крови, ткани, органе и/или пораженной заболеванием области, например, области опухоли, индивидуума с течением времени после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или ингибитора гамма-секретазы, является большей, чем достигается посредством альтернативного режима дозирования, где индивидууму вводят Т-клетки, например, CAR-экспрессирующие Т-клетки, в отсутствие введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых аспектах способ приводит к высокой пролиферации *in vivo* введенных клеток, напри-

мер, при определении посредством проточной цитометрии. В некоторых аспектах определяют высокие максимальные доли клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления при пиковом или максимальном уровне после введения Т-клеток, например, CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или ингибитора гамма-секретазы, в крови, плазме, сыворотке, ткани или пораженной заболеванием области индивидуума, или его лейкоцитарной фракции, например, фракции РВМС или фракции Т-клеток, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90% клеток экспрессируют рекомбинантный рецептор, например, CAR.

В некоторых аспектах увеличенная или длительная экспансия и/или персистенция дозы клеток у индивидуума, которому вводили ингибитор гамма-секретазы, ассоциирована с пользой в отношении связанных с опухолью исходов у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления связанный с опухолью исход включает уменьшение опухолевой нагрузки или уменьшение количества blastov в костном мозге индивидуума. В некоторых вариантах осуществления опухолевая нагрузка уменьшается на или по меньшей мере на или приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов после проведения способа. В некоторых вариантах осуществления нагрузка заболеванием, размер опухоли, объем опухоли, масса опухолевая и/или опухолевая нагрузка или опухолевая масса уменьшаются после введения дозы клеток по меньшей мере на или приблизительно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с индивидуумом, которого лечили способом, который не вовлекает введение ингибитора гамма-секретазы.

В. Функциональная активность Т-клеток

В некоторых вариантах осуществления параметры, ассоциированные с терапией или исходом лечения, которые включают параметры, которые можно оценивать для стадий скрининга, и/или оценки исходов лечения, и/или мониторинга исходов лечения, включают одно или несколько из активности, фенотипа, пролиферации или функции Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой из известных в данной области способов анализа для оценки активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии Т-клетками. До и/или после введения клеток и/или ингибитора гамма-секретазы в некоторых вариантах осуществления определяют биологическую активность модифицированных клеточных популяций, например, любым из ряда известных способов. Параметры оценки включают специфическое связывание модифицированной или натуральной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например, посредством визуализации, или *ex vivo*, например, посредством ELISA или проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления способность модифицированных клеток разрушать клетки-мишени можно определять с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, такого как анализ цитотоксичности, описанный, 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 определенных вариантах осуществления биологическую активность клеток определяют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2, GM-CSF и TNF α , и/или путем анализа цитолитической активности.

В некоторых вариантах осуществления способы анализа активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии Т-клетками, включают, но не ограничиваются ими, ELISPOT, ELISA, анализ пролиферации клеток, анализ цитотоксических лимфоцитов (CTL), анализ связывания с Т-клеточным эпитопом, антигеном или лигандом, или внутриклеточное окрашивание на цитокины, анализы пролиферации, анализы секреции лимфокинов, анализы прямой цитотоксичности и анализы лимитирующих разведений. В некоторых вариантах осуществления можно определять пролиферативные ответы Т-клеток, например, по включению ^3H -тимидина, BrdU (5-бром-2'-дезоксинуридина) или 2'-дезоксидезокси-5-этинилуридина (EdU) в их ДНК, или с использованием анализов разведения красителя с использованием красителей, таких как сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина диацетата (CFSE), CellTrace Violet или мембранный краситель PKH26.

В некоторых вариантах осуществления оценка активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии Т-клетками, включает измерение продуцирования цитокинов из Т-клеток и/или измерение продуцирования цитокинов в биологическом образце от индивидуума, например, в образцах плазмы, сыворотки, крови и/или ткани, например, в образцах опухоли. В некоторых случаях такие определяемые цитокины могут включать, но не ограничиваться ими, интерлейкин-2 (IL-2), интерферон-гамма (IFN γ), интерлейкин-4 (IL-4), TNF-альфа (TNF α), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-12 (IL-12), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), CD107a, и/или TGF-бета (TGF β). Способы анализа для определения цитокинов хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, ELISA, внутриклеточное окрашивание цитокинов, цитометрическая матрица гранул, ОТ-ПЦР, ELISPOT, проточную цитометрию и способы биоанализа, в которых клетки, отвечающие на соответствующий цитокин, тестируют в отношении способности к ответу (например, пролиферации) в присутствии тестируемого образца.

В некоторых вариантах осуществления оценка активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например, Т-клеток, введенных для терапии Т-клетками, включает оценку клеточных фенотипов, например, экспрессии конкретных маркеров клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки, например, Т-клетки, введенные для терапии Т-клетками, оценивают в отношении экспрессии маркеров активации Т-клеток, маркеров истощения Т-клеток и/или маркеров дифференцировки Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточный фенотип оценивают до введения. В некоторых вариантах осуществления клеточный фенотип оценивают после введения. Маркеры активации Т-клеток, маркеры истощения Т-клеток и/или маркеры дифференцировки Т-клеток для оценки включают любые маркеры, известные в данной области для конкретных подгрупп Т-клеток, например, CD25, CD38, лейкоцитарный антиген человека DR (HLA-DR), CD69, CD44, CD137, KLRG1, CD62L^{low}, CCR7^{low}, CD71, CD2, CD54, CD58, CD244, CD160, белок запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), белок гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3), Т-клеточный домен иммуноглобулина и белок 3 с доменом муцина (TIM-3), антиген 4 цитотоксических Т лимфоцитов (CTLA-4), В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA) и/или Т-клеточный иммуноглобулин и домен с ингибиторным мотивом иммунорецептора на основе тирозина (TIGIT) (см., например, Liu et al., Cell Death and Disease (2015) 6, e1792). В некоторых вариантах осуществления оцениваемый маркер клеточной поверхности представляет собой CD25, PD-1 и/или TIM-3. В некоторых вариантах осуществления оцениваемый маркер клеточной поверхности представляет собой CD25.

В некоторых аспектах детекция уровней экспрессии включает проведение анализа *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления анализ *in vitro* представляет собой иммуноанализ, анализ на основе аптамеров, гистологический или цитологический анализ, или анализ уровней экспрессии мРНК. В некоторых вариантах осуществления параметр или параметры для одного или нескольких из факторов, эффекторов, ферментов и/или поверхностных маркеров, определяют посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноблоттинга, иммунопреципитации, радиоиммунного анализа (RIA), иммунного окрашивания, проточно-цитометрического анализа, поверхностного плазмонного резонанса (SPR), хемилюминесцентного анализа, иммуноанализа в латеральном потоке, анализа ингибирования или анализа avidности. В некоторых вариантах осуществления детекцию цитокинов и/или поверхностных маркеров проводят с использованием связывающего реагента, который специфически связывается по меньшей мере с одним биомаркером. В некоторых случаях связывающий реагент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, аптамер или зонд нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора гамма-секретазы повышает уровень циркулирующих CAR Т-клеток.

С. Нагрузка заболеванием

В некоторых вариантах осуществления параметры, ассоциированные с терапией или исходом лечения, которые включают параметры, которые можно оценивать для стадий скрининга, и/или оценки исходов лечения, и/или мониторинга исходов лечения, включают опухолевую нагрузку или нагрузку заболеванием. Проведение иммунотерапии, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), и/или ингибитором гамма-секретазы, может снижать или предотвращать распространение или нагрузку заболеванием или состоянием у индивидуума. Например, когда заболевание или состояние представляет собой опухоль, способы, главным образом, снижают размер опухоли, объем, метастазирование, процент бластов в костном мозге или молекулярно выявляемые показатели злокачественной опухоли и/или улучшают прогноз, или выживаемость, или другой симптом, ассоциированный с опухолевой нагрузкой.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы приводят к снижению опухолевой нагрузки у подвергаемых лечению индивидуумов по сравнению с альтернативными способами, в которых иммунотерапию, такую как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), проводят без введения ингибитора гамма-секретазы. В действительности, не является необходимым, чтобы опухолевая нагрузка снижалась у всех индивидуумов, которым проводят комбинированную терапию, но чтобы опухолевая нагрузка снижалась в среднем у индивидуумов, подвергаемых лечению, например, на основе клинических данных, где большинство индивидуумов, которых лечат такой комбинированной терапией, демонстрирует снижение опухолевой нагрузки, например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более индивидуумов, которых лечат посредством комбинированной терапии, демонстрируют снижение опухолевой нагрузки.

Нагрузка заболеванием может охватывать общее количество клеток, связанных с заболеванием, у индивидуума или в органе, ткани или жидкости организма индивидуума, таких как орган или ткань опухоли или из другой области, например, что может указывать на метастазирование. Например, опухолевые клетки можно выявлять и/или количественно определять в крови, лимфе или костном мозге в контексте определенных гематологических злокачественных опухолей. В некоторых вариантах осуществления нагрузка заболеванием может включать массу опухоли, количество или степень метастазов и/или процент бластных клеток, присутствующих в костном мозге.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет миелому, лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфобла-

стный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) или миелому, например, множественную миелому (ММ). В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ММ или DBCBL.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет солидную опухоль.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет ММ. В некоторых случаях ММ представляет собой рецидивирующую и/или рефрактерную ММ. В случае ММ, иллюстративные параметры для оценки степени нагрузки заболеванием включают такие параметры, как количество клональных плазмацитов (например, >10% в биоптате костного мозга или в любом количестве в биоптате других тканей; плазмацитома), присутствие моноклонального белка (парапротеин) либо в сыворотке, либо в моче, признаки ишемического поражения органов, предположительно связанного с плазмацитарным нарушением (например, гиперкальцемию (кальций с поправкой на альбумин >2,75 ммоль/л); почечная недостаточность, характерная для миеломы; анемия (гемоглобин <10 г/дл); и/или очаги повреждения в костях (литические очаги повреждения или остеопороз с компрессионными переломами)).

В случае DLBCL иллюстративные параметры для оценки степени нагрузки заболеванием включают такие параметры, как морфология клеток (например, центробластные, иммунобластные и анапластические клетки), экспрессия генов, экспрессия мкРНК и экспрессия белка (например, экспрессия BCL2, BCL6, MUM1, LMO2, MYC и p21).

В случае лейкоза степень нагрузки заболеванием можно определять путем оценки остаточного лейкоза в крови или костном мозге. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет морфологическое заболевание, если в костном мозге присутствует более или ровно 5% бластов, например, при определении с использованием световой микроскопии. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет полную или клиническую ремиссию, если в костном мозге присутствует менее 5% бластов.

В некоторых вариантах осуществления для лейкоза индивидуум может иметь полную ремиссию, однако присутствует небольшая доля морфологически неопределяемых (способами световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Индивидуума считают имеющим минимальное остаточное заболевание (MRD), если индивидуум имеет менее 5% бластов в костном мозге и имеет молекулярно определяемую злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления молекулярно определяемую злокачественную опухоль можно оценивать с использованием любого из множества молекулярных способов, которые позволяют чувствительную детекцию небольшого количества клеток. В некоторых аспектах такие способы включают анализ с использованием ПЦР, который может определять уникальные реарранжировки Ig/T-клеточного рецептора или слитые транскрипты, образовавшиеся в результате хромосомных транслокаций. В некоторых вариантах осуществления проточную цитометрию можно использовать для идентификации злокачественных клеток на основе лейкоз-специфических иммунофенотипов. В некоторых вариантах осуществления молекулярная детекция злокачественной опухоли может определять всего 1 лейкозную клетку на 100000 нормальных клеток. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет MRD которая молекулярно определяется при выявлении по меньшей мере или более 1 лейкозной клетки на 100000 клеток, например, посредством ПЦР или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления нагрузка заболеванием у индивидуума является молекулярно неопределимой или MRD, так что в некоторых случаях у индивидуума нельзя выявить лейкозные клетки с использованием ПЦР или проточной цитометрии.

В некоторых вариантах осуществления способы и/или проведение иммунотерапии, такой как терапия Т-клетками (например, CAR-экспрессирующими Т-клетками), и/или введение ингибитора гамма-секретазы снижают нагрузку заболеванием по сравнению с нагрузкой заболеванием непосредственно перед проведением иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и/или введением ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых аспектах проведение иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и/или введение ингибитора гамма-секретазы может препятствовать увеличению нагрузки заболеванием, и об этом может свидетельствовать отсутствие изменения нагрузки заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления способ снижает нагрузку заболеванием или состоянием, например, количество опухолевых клеток, размер опухоли, длительность выживания пациента или бессобытийного выживания, в большей степени и/или в течение большего периода времени по сравнению со снижением, которое наблюдалось бы в случае сравнимого способа с использованием альтернативной терапии, такой как терапия, где индивидууму проводят иммунотерапию, например, терапию только Т-клетками, в отсутствие введения ингибитора гамма-секретазы. В некоторых вариантах осуществления нагрузка заболеванием снижается в большей степени или на больший период времени после комбинированной терапии из проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и введения ингибитора гамма-секретазы, по сравнению со снижением, которое было бы достигнуто путем введения каждого из этих средств отдельно, например, введения ингибитора гамма-секретазы индивидууму, которому не проводили иммунотерапию, например, терапию Т-клетками; или проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, у индивидуума, которому не вводили ингибитор гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления определяют, оценивают или измеряют нагрузку заболеванием или состояние у индивидуума. В некоторых аспектах определение нагрузки заболеванием можно про-

водить путем определения общего количества клеток, пораженных или ассоциированных с заболеванием, например, опухолевых клеток, у индивидуума, или в органе, ткани или жидкости организма индивидуума, такой как кровь или сыворотка. В некоторых вариантах осуществления заболевание на нагрузку, например, опухолевую нагрузку, оценивают путем определения массы солидной опухоли и/или количества или степени метастазов. В некоторых аспектах оценивают выживание индивидуума, выживание в течение определенного периода времени, степень выживания, присутствие или длительность бессобытийного или бессимптомного выживания, или выживание без рецидива. В некоторых вариантах осуществления оценивают любой симптом заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления определяют показатель нагрузки заболеванием или состоянием. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные параметры для определения включают конкретные клинические исходы, указывающие на смягчение или улучшение заболевания или состояния, например, опухоли. Такие параметры включают: длительность контроля заболевания, включая полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабильное заболевание (SD) (см., например, руководства в соответствии с критериями оценки ответа солидных опухолей (RECIST)), частоту объективных ответов (ORR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и общую выживаемость (OS). Конкретные пороговые значения для параметров могут быть выбраны для определения эффективности способа окомбинированной терапии, описанного в настоящем описании.

В некоторых аспектах заболевание на нагрузку определяют или измеряют до проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, после проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, но до введения ингибитора гамма-секретазы, после введения ингибитора гамма-секретазы, но до проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и/или после как проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, так и введения ингибитора гамма-секретазы. В контексте многократного проведения одной или нескольких стадий комбинированной терапии, в некоторых вариантах осуществления можно определять нагрузку заболеванием до или после проведения любой из стадий, введения доз и/или курсов введения, или в момент времени между проведением любых из стадий, доз и/или курсов введения.

В некоторых вариантах осуществления нагрузка снижается на или по меньшей мере на ровно или приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов посредством предусматриваемых способов по сравнению с моментом времени непосредственно перед введением ингибитора гамма-секретазы и проведением иммунотерапии, например, терапии Т-клетками. В некоторых вариантах осуществления нагрузка заболеванием, размер опухоли, объем опухоли, вес опухоли и/или опухолевая нагрузка или масса снижаются после проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и введения ингибитора гамма-секретазы, по меньшей мере ровно или приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с моментом времени непосредственно до проведения иммунотерапии, например, терапии Т-клетками, и/или введения ингибитора гамма-секретазы.

В некоторых вариантах осуществления снижение нагрузки заболеванием способом включает индукцию морфологической полной ремиссии, например, при оценке через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца или более 3 месяцев после проведения, например начала, комбинированной терапии.

В некоторых аспектах анализ в отношении минимальной резидуальной болезни, например, при определении посредством мультипараметрической проточной цитометрии, является отрицательным, или уровень минимальной резидуальной болезни составляет менее чем приблизительно 0,3%, менее чем приблизительно 0,2%, менее чем приблизительно 0,1% или менее чем приблизительно 0,05%.

В некоторых вариантах осуществления уровень бессобытийной выживаемости или общий показатель выживаемости у индивидуума улучшаются посредством способов по сравнению с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления уровень или вероятность бессобытийной выживаемости для индивидуумов, которых лечили способами, через 6 месяцев после способа комбинированной терапии, описанной в настоящем описании, составляет более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 90% или более чем приблизительно 95%. В некоторых аспектах общий показатель выживаемости составляет более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 90% или более чем приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, которого лечили способами, демонстрирует бессобытийную выживаемость, свободную от рецидива выживаемость, или выживаемость в течение по меньшей мере 6 месяцев или в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления время до прогрессирования увеличивается, например, время до прогрессирования составляет более чем ровно или приблизительно 6 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

В некоторых вариантах осуществления после способа лечения вероятность рецидива снижается по сравнению с другими способами. Например, в некоторых вариантах осуществления вероятность рецидива через 6 месяцев после способа комбинированной терапии составляет менее чем приблизительно 80%, менее чем приблизительно 70%, менее чем приблизительно 60%, менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20% или менее чем приблизительно 10%.

IV. Изделия и наборы

Также предусматриваются изделия, содержащие ингибитор гамма-секретазы и компоненты для иммунотерапии, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или терапии Т-клетками, например, модифицированными клетками, и/или их композиции. Изделия могут включать контейнер и ярылок или вкладыш в упаковку, на контейнере или прилагаемые к контейнеру. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, мешки для в/в растворов и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностики состояния. В некоторых вариантах осуществления контейнер имеет отверстие для стерильного доступа. Иллюстративные контейнеры включают мешки для внутривенных растворов, флаконы, включая флаконы с пробками, проницаемыми для иглы для инъекций, или бутылки или флаконы для перорального введения средств. На ярылке или вкладыше в упаковку может быть указано, что композицию используют для лечения заболевания или состояния.

Изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция включает антитело или модифицированные клетки, используемые для иммунотерапии, например, терапии Т-клетками; и (b) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция включает второе средство, такое как ингибитор гамма-секретазы. Изделие, кроме того, может включать вкладыш в упаковку, на котором указано, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, изделие, кроме того, может включать другой или тот же контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. Кроме того, он может включать другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и/или шприцы.

V. Определения

Если не определено иначе, все термины данной области, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно подразумевает специалист в области, к которой относится заявленное изобретение. В некоторых случаях термины с широко известным значением определены в настоящем описании для ясности и/или простоты отсылки, и включение таких определений в настоящее описание не следует обязательно истолковывать как существенное отличие от того, что хорошо известно в данной области.

Как используют в рамках изобретения, "индивидуумом" является млекопитающее, такое как человек или другое животное и, как правило, им является человек. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, например, пациент, которому вводят иммуномодулирующие полипептиды, модифицированные способами инженерии клетки или композиции, такие как содержащие соединение, например, ингибитор гамма-секретазы, представляет собой млекопитающее, как правило, примата, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления приматом является мартышка или человекообразная обезьяна. Индивидуумом может быть мужчина или женщина, и он может иметь любой подходящий возраст, в том числе, младенческий, детский, подростковый, взрослый и пожилой. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является не являющееся приматом млекопитающее, такое как грызун. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

Как используют в рамках изобретения, "лечение" (и его грамматические варианты, такие как "лечить" или "лечащий"), относится к полному или частичному смягчению или уменьшению заболевания, или состояния, или нарушения, или симптома, или неблагоприятного эффекта или исхода, или фенотипа, ассоциированного с ним. Желаемые эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предупреждение возникновения или рецидива заболевания, смягчение симптомов, уменьшение каких-либо прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предупреждение метастазов, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение болезненного состояния, и ремиссию или улучшение прогноза. Термины не подразумевают полное излечение от заболевания или полное устранение какого-либо симптома или эффекта(ов) в отношении всех симптомов или исходов.

Как используют в рамках изобретения, "замедление развития заболевания" означает отсрочивание, препятствование, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или задерживание развития заболевания (такого как злокачественная опухоль). Это отсрочивание может иметь различную длительность в зависимости от анамнеза заболевания и/или подвергаемого лечению индивидуума. Как очевидно специалисту в данной области, достаточное или значительное отсрочивание может, в сущности, охватывать предупреждение, так что у индивидуума не развивается заболевание. Например, может отсрочиваться поздняя стадия злокачественной опухоли, такая как развитие метастазов.

"Предупреждение", как используют в рамках изобретения, включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у индивидуума, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые и композиции используют для замедления развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

Как используют в рамках изобретения, "подавлять" функцию или активность означает снижать функцию или активность по сравнению с в остальном теми же условиями, за исключением представ-

ляющего интерес состояния или параметра или альтернативно по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, которые подавляют рост опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

"Эффективное количество" средства, например, фармацевтического состава, клеток или композиции в контексте введения относится к количеству, эффективному, в дозировках/количествах и на протяжении периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

"Терапевтически эффективное количество" средства, например, фармацевтического состава или модифицированных способами инженерии клеток, относится к количеству, эффективному, в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или нарушения, и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, вводимые иммуномодулирующие полипептиды или модифицированные способами инженерии клетки. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые способы вовлекают введение иммуномодулирующих полипептидов, модифицированных способами инженерии клеток 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 профилактическую дозу используют у индивидуума до или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество является меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который имеет такую форму, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому вводят состав.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Как используют в рамках изобретения, указание на то, что положения нуклеотидов или аминокислот "соответствуют" положениям нуклеотидов или аминокислот в описанной последовательности, такой как указана в списке последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированным при выравнивании с описанной последовательностью для максимизации идентичности с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Посредством выравнивания последовательностей специалист в данной области может идентифицировать соответствующие остатки, например, с использованием консервативных и идентичных аминокислотных остатков в качестве ориентиров. Как правило, для идентификации соответствующих положений последовательности аминокислот выравнивают так, чтобы достигалось наибольшее совпадение (см., например: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) *SIAM J Applied Math* 48: 1073).

Термин "вектор", как используют в рамках изобретения, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к увеличению в количестве другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор в качестве самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, встраивающийся в геном клетки-хозяина, в которую его вводят. Определенные векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем описании "экспрессирующими векторами". К векторам относятся вирусные векторы, такие как ретровирусные, например, гамма-ретровирусные и лентивирусные векторы.

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используют взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые вводят экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомков таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки и их потомство, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным исходной клетке в отношении содержания нуклеиновых кислот, а может содержать мутации. Этот термин включает мутантные потомки, которые имеют ту же функцию или биологическую активность при скрининге или селекции, что и первоначально трансформированная клетка.

Как используют в рамках изобретения, указание на то, что клетка или популяция клеток является "положительной" по конкретному маркеру, относится к поддающемуся обнаружению присутствию на или в клетке конкретного маркера, как правило, маркера клеточной поверхности. При указании на мар-

кер клеточной поверхности, термин относится к наличию поверхностной экспрессии, выявляемой посредством проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения такого антитела, где окрашивание поддается обнаружению посредством проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем окрашивание, выявляемое при выполнении той же методики с контролем того же изотипа в условиях, в остальном идентичных, и/или на уровне, по существу сходном с уровнем для клетки, о которой известно, что она является положительной в отношении маркера, и/или на уровне, существенно превышающем уровень для клетки, о которой известно, что она является отрицательной в отношении маркера.

Как используют в рамках изобретения, указание на то, что клетка или популяция клеток является "отрицательной" в отношении конкретного маркера, к отсутствию существенного поддающегося обнаружению присутствия на или в клетке конкретного маркера, как правило, маркера поверхности. При указании на маркер клеточной поверхности, термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, выявляемой посредством проточной цитометрии, например, посредством окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание не выявляется посредством проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем окрашивание, выявляемое при выполнении той же методики с контролем того же изотипа в условиях, в остальном идентичных, и/или на уровне, существенно более низком, чем уровень для клетки, о которой известно, что она является положительной по маркеру, и/или на уровне, по существу сходном с уровнем для клетки, о которой известно, что она является отрицательной по маркеру.

Как используют в рамках изобретения, "процентную идентичность (%)" аминокислотных последовательностей" и "процентную идентичность", когда их используют в отношении аминокислотной последовательности (эталонная полипептидная последовательность), определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (например, рассматриваемом антителе или фрагменте), которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве части идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе какие-либо алгоритмы, необходимые для обеспечения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых последовательностей.

Как используют в рамках изобретения, форма единственного числа включает множественное число упоминаемых объектов, если контекст явно не указывает на иное. Например, форма единственного числа означает "по меньшей мере один" или "один или несколько". Понятно, что аспекты и варианты, описанные в настоящем описании, включают "состоящий" и/или "по существу состоящий из" аспектов и вариантов.

На протяжении настоящего описания различные аспекты заявленного изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предоставлено только для удобства и краткости, и его не следует истолковывать как строгое ограничение объема заявленного изобретения. Таким образом, описание диапазона следует понимать как конкретное описание всех возможных поддиапазонов, а также отдельных числовых величин в этом диапазоне. Например, когда предоставлен диапазон величин, понятно, что каждая входящая в него величина между верхней и нижней границами этого диапазона и любая другая указанная или входящая в этот указанный диапазон величина охватывается заявленным изобретением. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, и также охватываются заявленным изобретением за исключением какого-либо конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба из пределов, заявленное изобретение также включает любой или оба из этих включенных пределов. Это применимо независимо от ширины диапазона.

Термин "приблизительно", как используют в рамках изобретения, относится к обычному диапазону погрешности для соответствующей величины, хорошо известному специалисту в данной области техники. Указание "приблизительно" величины или параметра в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к самой этой величине или параметру. Например, описание с упоминанием "приблизительно X" включает описание "X".

Как используют в рамках изобретения, композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водную композицию, неводную композицию или любую их комбинацию.

VI. Иллюстративные варианты осуществления

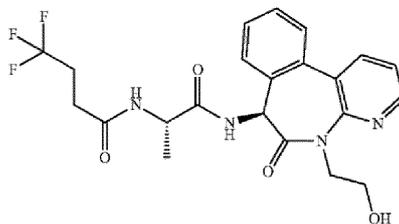
Предусматриваемыми вариантами осуществления являются следующие:

1. Способ лечения, причем способ включает:

(а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и

(b) введение индивидууму LY3039478 или соединения структуры:

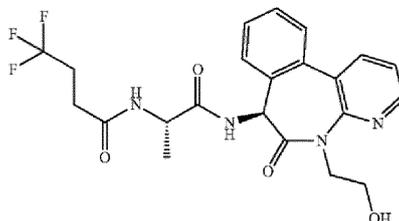
Соединение I



или стереоизомера или фармацевтически приемлемой соли или гидрата любого из вышеуказанных.

2. Способ лечения, причем способ включает проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где на момент начала проведения клеточной терапии индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение LY3039478 или соединением структуры:

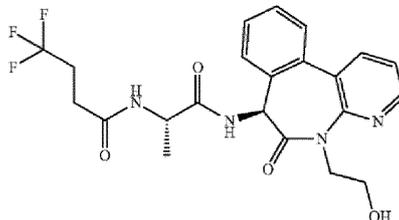
Соединение I



или стереоизомером или фармацевтически приемлемой солью или гидратом любого из вышеуказанных.

3. Способ лечения, причем способ включает введение индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, LY3039478 или соединения структуры:

Соединение I



или стереоизомера или фармацевтически приемлемой соли или гидрата любого из вышеуказанных, где на момент начала введения индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

4. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

5. Способ согласно варианту осуществления 4, где антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ERHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрина avb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной

меткой.

6. Способ согласно варианту осуществления 4 или вариант осуществления 5, где антиген-мишень представляет собой Muc1.

7. Способ согласно варианту осуществления 4 или варианту осуществления 5, где антиген-мишень представляет собой ВСМА.

8. Способ согласно варианту осуществления 7, где ВСМА представляет собой поверхностный ВСМА.

9. Способ согласно варианту осуществления 8, где связывание рекомбинантного рецептора с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА.

10. Способ согласно варианту осуществления 9, где концентрация или количество растворимой или высвобождаемой формы ВСМА соответствует концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или крови, или плазме пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный рекомбинантный рецептор против ВСМА, необязательно эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

11. Способ лечения, причем способ включает:

(а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена (CAR), который содержит антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА); и

(b) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы,

где связывание CAR с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность CAR-экспрессирующих клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА,

необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

12. Способ лечения, причем способ включает проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена, который специфически связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА), где:

связывание CAR с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность CAR-экспрессирующих клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе; и

на момент начала проведения клеточной терапии индивидууму ранее водили и/или проводят лечение ингибитором гамма-секретазы.

13. Способ лечения, причем способ включает введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, где на момент начала введения ингибитора индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих химерный рецептор антигена, который специфически связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (ВСМА),

где связывание CAR с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность CAR-экспрессирующих клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА,

необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА,

соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

14. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где способ включает выбор индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, где клетки злокачественной опухоли индивидуума (i) экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматиков или происходят из плазматиков, и (ii) имеют низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня.

15. Способ согласно варианту осуществления 14, где клеточную терапию и/или введение ингибитора гамма-секретазы проводят у выбранного индивидуума.

16. Способ согласно варианту осуществления 14 или варианту осуществления 15, где пороговый уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже, чем средняя или срединная экспрессия или уровень поверхностного ВСМА на плазматиках у множества контрольных индивидуумов, необязательно где контрольные индивидуумы представляют собой группу здоровых или нормальных индивидуумов.

17. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-16, где:

низкая экспрессия поверхностного ВСМА присутствует, когда менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазматиков, или клеток с маркером плазматиков или фенотипом, или злокачественных клеток, у индивидуума экспрессируют поверхностный ВСМА; или

пороговый уровень поверхностного ВСМА представляет собой величину, соответствующую менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазматиков, или клеток с маркером плазматиков или фенотипом, или злокачественных клеток, у индивидуума, которые экспрессируют поверхностный ВСМА.

18. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-17, где экспрессию поверхностного ВСМА определяют посредством проточной цитометрии и/или иммуноанализа.

19. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-18, где связывание рекомбинантного рецептора с поверхностным ВСМА или показатель, указывающий на функцию или активность экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА.

20. Способ согласно варианту осуществления 19, где концентрация или количество растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующие концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный рекомбинантный рецептор против ВСМА, необязательно эталонный CAR против ВСМА, в том же анализе.

21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-20, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление ВСМА.

22. Способ согласно варианту осуществления 21, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление ВСМА с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,35 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,35 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ, от до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,35 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,25 нМ до 0,35 нМ, от 0,35 нМ до 10 нМ, от 0,35 нМ до 5 нМ, от 0,35 нМ до 1 нМ, от 0,35 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ или от 5 нМ до 10 нМ.

23. Способ согласно варианту осуществления 21 или вариант осуществления 22, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление ВСМА с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) менее чем или приблизительно менее чем 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ, или менее.

24. Способ лечения, причем способ включает:

(а) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем

указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA); и

(b) введение ингибитора гамма-секретазы.

25. Способ лечения, причем способ включает проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA), где на момент начала проведения клеточной терапии индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение ингибитором гамма-секретазы.

26. Способ лечения, причем способ включает введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, где на момент начала введения ингибитора индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA).

27. Способ согласно любому из вариантов осуществления 24-26, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

28. Способ согласно варианту осуществления 27, где антиген-мишень выбран из карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

29. Способ модулирования активности клеточной терапии, причем способ включает

(a) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего заболевание или нарушение, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор; и

(b) после проведения (a) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы.

30. Способ модулирования активности клеточной терапии, причем способ включает введение ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, где на момент начала введения ингибитора индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

31. Способ согласно варианту осуществления 29 или варианту осуществления 30, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

32. Способ согласно варианту осуществления 31, где антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионально-

го антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

33. Способ согласно варианту осуществления 27, 28, 31 или 32, где антиген-мишень представляет собой Muc1.

34. Способ согласно варианту осуществления 31 или варианту осуществления 32, где антиген-мишень представляет собой ВСМА.

35. Способ согласно варианту осуществления 34, где ВСМА представляет собой поверхностный ВСМА.

36. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-35, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует или снижает, или способен ингибировать или снижать расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из ВСМА, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFR3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, Е-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α 2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP).

37. Способ согласно варианту осуществления 36, где одна или несколько мишеней ингибитора гамма-секретазы включает Muc1.

38. Способ согласно варианту осуществления 36, где одна или несколько мишеней ингибитора гамма-секретазы включает ВСМА.

39. Способ согласно любому из вариантов осуществления 36-38, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) от 0,01 нМ до 1 мкМ, от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 1 мкМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 1 мкМ, от 0,25 нМ до 100 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 1 мкМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 мкМ, от 10 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 1 мкМ.

40. Способ согласно любому из вариантов осуществления 36-39, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) менее чем или приблизительно менее чем 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 11-40, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор.

42. Способ согласно варианту осуществления 41, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор, и пептидный ингибитор выбран из альдегидных производных пептидов, дифторкетонных производных, изостерных производных гидроксиэтилендипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов.

43. Способ согласно варианту осуществления 41, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, и непептидный ингибитор представляет собой производное бензодиазепинов или производное сульфонамидов

44. Способ согласно любому из вариантов осуществления 41-43, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния и ингибитор не переходного состояния.

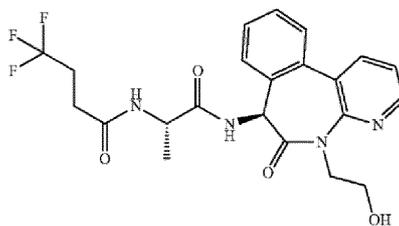
45. Способ согласно любому из вариантов осуществления 41-44, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.

46. Способ согласно любому из вариантов осуществления 41-45, где ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналя, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бен-

зо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Пе-лейциналя; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; МК-0752; MRK-003 (Merck); семагестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (добензазепин), соединения E ((2S)-2-{{(3,5-дифторфенил)ацетил}амино}-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодiazепин-3-ил]пропанамид], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-{{(4-хлорфенил)сульфонил}-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

47. Способ согласно любому из вариантов осуществления 11-46, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой LY3039478 или соединение структуры:

Соединение I



или стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль или гидрат любого из вышеуказанных.

48. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-47, где индивидуум имеет плазматциты, или злокачественные клетки, или клетки миеломы, или клетки, экспрессирующие маркеры плазматцитов, экспрессирующие поверхностный ВСМА.

49. Способ согласно любому из вариантов осуществления 21-48, где:

индивидуум имеет злокачественную опухоль, в которой клетки злокачественной опухоли у индивидуума (i) экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматцитов, или происходят из плазматцитов, и (ii) имеют низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня; и/или

способ дополнительно включает выбор индивидуума, который имеет злокачественную опухоль, в которой клетки злокачественной опухоли индивидуума (i) экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматцитов, или происходят из плазматцитов, и (ii) имеют низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня.

50. Способ согласно любому из вариантов осуществления 4-8, 27-29 и 31-49, где мишень ингибитора гамма-секретазы представляет собой антиген-мишень и ингибитор гамма-секретазы ингибирует расщепление антигенна-мишени.

51. Способ согласно любому из вариантов осуществления 7-23 и 34-50, где введение ингибитора:

снижает отщепление или освобождение ВСМА из клеток, необязательно плазматцитов, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем отщеплением или освобождением ВСМА из клеток индивидуума перед введением ингибитора;

снижает уровень или количество ВСМА, обнаруженного в сыворотке индивидуума, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем или количеством ВСМА в сыворотке индивидуума до введения ингибитора; и/или

увеличивает экспрессию поверхностного ВСМА на клетках, необязательно на плазматитах, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем поверхностного ВСМА на клетках индивидуума до введения ингибитора.

52. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-51, где введение ингибитора:

снижает уровень отщепления или высвобождения мишени или антигена-мишени, необязательно ВСМА или Muc1, из клеток, необязательно плазматцитов, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем отщепления или высвобождения мишени или антигена-мишени из клеток у индивидуума до введения ингибитора;

снижает уровень или количество мишени или антигена-мишени, необязательно ВСМА или Muc1, обнаруживаемого в сыворотке индивидуума, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем или количеством мишени или антигена-мишени в сыворотке индивидуума до введения ингибитора; и/или

увеличивает экспрессию поверхностной мишени или антигена-мишени, необязательно ВСМА или Muc1, на клетках, необязательно плазматитах, более чем или приблизительно более чем на 5%, 10%,

20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с уровнем поверхностной мишени или антигена-мишени на клетках индивидуума до введения ингибитора.

53. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-52, где заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль.

54. Способ согласно варианту осуществления 53, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль.

55. Способ согласно варианту осуществления 53 или варианту осуществления 54, где злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому, плазмацитому, злокачественную опухоль, происходящую из плазмцитов, и/или злокачественную опухоль, происходящую из В-клеток.

56. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-55, где ингибитор вводят перорально, подкожно или внутривенно.

57. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-56, где ингибитор вводят перорально.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-57, где ингибитор вводят по меньшей мере или вводят ровно шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, три раза в неделю, по меньшей мере один раз в неделю или только один раз.

59. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-58, где ингибитор вводят три раза в неделю.

60. Способ согласно варианту осуществления 58 или варианту осуществления 59, где введение ингибитора проводят в ходе курса лечения, который составляет по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 14 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 21 сутки, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 28 суток.

61. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-60, где ингибитор вводят, или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве от 0,5 мг до 500 мг, от 0,5 мг до 250 мг, от 0,5 мг до 100 мг, от 0,5 мг до 50 мг, от 0,5 мг до 25 мг, от 0,5 мг до 10 мг, от 0,5 мг до 5,0 мг, от 0,5 мг до 2,5 мг, от 0,5 мг до 1,0 мг, от 1,0 мг до 500 мг, от 1,0 мг до 250 мг, от 1,0 мг до 100 мг, от 1,0 мг до 50 мг, от 1,0 мг до 25 мг, от 1,0 мг до 10 мг, от 1,0 мг до 5,0 мг, от 1,0 мг до 2,5 мг, от 2,5 мг до 500 мг, от 2,5 мг до 250 мг, от 2,5 мг до 100 мг, от 2,5 мг до 50 мг, от 2,5 мг до 25 мг, от 2,5 мг до 10 мг, от 2,5 мг до 5,0 мг, от 5,0 мг до 500 мг, от 5,0 мг до 250 мг, от 5,0 мг до 100 мг, от 5,0 мг до 50 мг, от 5,0 мг до 25 мг, от 5,0 мг до 10 мг, от 10 мг до 500 мг, от 10 мг до 250 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 50 мг, от 10 мг до 25 мг, от 25 мг до 500 мг, от 25 мг до 250 мг, от 25 мг до 100 мг, от 25 мг до 50 мг, от 50 мг до 500 мг, от 50 мг до 250 мг, от 50 мг до 100 мг, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 250 мг или от 250 мг до 500 мг.

62. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-61, где ингибитор вводят, или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве, которое по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно составляет или приблизительно составляет 0,5 мг, 1,0 мг, 2,5 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, 25 мг, 50 мг, 100 мг, 250 мг или 500 мг.

63. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-62, где рекомбинантный рецептор представляет собой трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

64. Способ согласно любому из вариантов осуществления 14-63, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор, который необязательно представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

65. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-13 и 64, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

66. Способ согласно варианту осуществления 65, где внутриклеточный сигнальный домен содержит цепь CD3-зета (CD3ζ).

67. Способ согласно варианту осуществления 65 или варианту осуществления 66, где химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

68. Способ согласно варианту осуществления 67, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен, происходящий из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

69. Способ согласно варианту осуществления 67 или варианту осуществления 68, где костимулирующая сигнальная область представляет собой домен, происходящий из 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

70. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-69, где индивидуумом является человек.

71. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-70, где ВСМА представляет собой ВСМА человека или антиген-мишень представляет собой антиген человека.

72. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-72, где генетически модифицированные клетки включают Т-клетки или NK-клетки.

73. Способ согласно варианту осуществления 72, где клеточная терапия представляет собой тера-

пию Т-клетками, и доза генетически модифицированных клеток включает Т-клетки.

74. Способ согласно варианту осуществления 72 или варианту осуществления 73, где Т-клетки являются CD4+ и/или CD8+.

75. Способ согласно любому из вариантов осуществления 72-74, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от индивидуума.

76. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-75, где клеточная терапия включает клетки, которые являются аутологичными для индивидуума.

77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-76, где клеточная терапия включает клетки, которые являются аллогенными для индивидуума.

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-77, где клеточная терапия включает введение от или приблизительно от 1×10^5 до 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), причем клеточная терапия включает введение от или приблизительно от 1×10^5 до 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), от или приблизительно от 5×10^5 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) или от или приблизительно от 1×10^6 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), в каждом случае включительно.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-78, где клеточная терапия включает введение не более 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более $2,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более $0,5 \times 10^7$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более 1×10^6 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более $0,5 \times 10^6$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС).

80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1, 4, 5, 14 и 38, где начало введения ингибитора происходит до, одновременно или после начала проведения клеточной терапии.

81. Способ согласно варианту осуществления 80, где ингибитор вводят до начала проведения клеточной терапии.

82. Способ согласно 1, 2, 4, 5, 14, 15, 38, 39 и 81, где начало введения ингибитора происходит в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч или 1 недели до начала проведения клеточной терапии.

83. Способ согласно варианту осуществления 80, где ингибитор вводят после начала проведения клеточной терапии.

84. Способ согласно 1, 3, 4, 5, 14, 16, 19, 20, 38, 40 и 83, где начало введения ингибитора происходит в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 недели, 14 суток, 21 суток, 28 суток или более после начала проведения клеточной терапии.

85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1, 3, 4, 5, 14, 16, 19, 20, 38, 40, 83 и 84, где ингибитор вводят в момент времени, когда:

число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума, снижается по сравнению с числом этих клеток у этого индивидуума в предыдущий момент времени после начала введения клеток;

число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови, менее чем или приблизительно менее чем в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз или в 100 раз или менее меньше пикового или максимального числа клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума после начала введения клеток; и/или

в момент времени после обнаружения пикового или максимального уровня клеток клеточной терапии в крови индивидуума число клеток или клеток, происходящих из этих клеток, обнаруживаемых в крови индивидуума составляет менее 10%, менее 5%, менее 1% или менее 0,1% от общих моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) в крови индивидуума.

86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1, 3, 4, 5, 14, 16, 19, 20, 38, 40, 83-854, где ингибитор вводят через вплоть до 7 суток, 14 суток, 21 суток, 28 суток или более после начала введения клеток.

87. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-86, где способ дополнительно включает проведение химиотерапии с лимфодеплецией до проведения клеточной терапии и/или проведение инди-

видууму химиотерапии с лимфодеплецией до введения клеток.

88. Способ согласно варианту осуществления 87, где химиотерапия с лимфодеплецией включает введение индивидууму флударабина и/или циклофосфида.

89. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-88, где способ дополнительно включает введение стероида, необязательно где стероид вводят до, одновременно и/или после начала введения ингибитора, необязательно где стероид вводят в ходе курса лечения ингибитором.

90. Способ согласно варианту осуществления 89, где стероид представляет собой или содержит дексаметазон.

91. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-90, где клеточная терапия демонстрирует увеличенную или пролонгированную экспансию и/или персистенцию у индивидуума по сравнению со способом, в котором клеточную терапию проводят у индивидуума в отсутствие ингибитора гамма-секретазы.

92. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-91, где способ, таким образом, предотвращает, снижает или смягчает один или несколько симптомов или исходов заболевания или нарушения.

93. Способ лечения, причем способ включает:

(a) введение индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, терапевтического средства или проведение терапии, которые нацелены или являются специфичными к антигену созревания В-клеток (BCMA); и

(b) введение индивидууму ингибитора гамма-секретазы.

94. Способ согласно варианту осуществления 93, где терапевтическое средство или терапия представляет собой или включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, необязательно биспецифическое антитело.

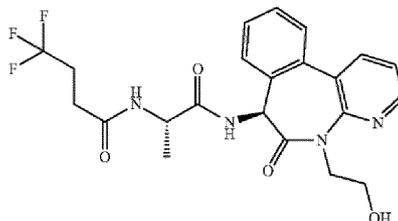
95. Способ согласно варианту осуществления 93 или вариант осуществления 94, где терапевтическое средство или терапия представляет собой биспецифическое антитело, которое дополнительно нацелено на или специфически связывает Т-клеточный антиген, необязательно CD2 или CD3.

96. Способ согласно варианту осуществления 93 или варианту осуществления 94, где терапевтическое средство или терапия представляет собой биспецифическое антитело, которое дополнительно нацелено на второй антиген, необязательно где второй антиген выбран из CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CS1, ROR1, GPC3, CD123, IL-13R, CD138, c-Met, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1, MAGE A3 и гликолипида F77.

97. Способ согласно любому из вариантов осуществления 93-96, где ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейцина, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланина; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланина; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Ile-лейцина; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; MK-0752; MRK-003 (Merck); семагестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (добензазепин), соединения E ([{(2S)-2-[[{(3,5-дифторфенил)ацетил]амино}-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамида], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[[{(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

98. Способ согласно любому из вариантов осуществления 93-97, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой LY3039478 или соединение структуры:

Соединение I



или стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль или гидрат любого из вышеуказанных.

99. Комбинация, содержащая:

(а) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA); и

(b) ингибитор гамма-секретазы,

где связывание CAR с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность CAR-экспрессирующих клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA,

необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося BCMA, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный CAR против BCMA, в том же анализе.

100. Комбинация согласно варианту осуществления 99, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует, или снижает, или способен ингибировать или снижать внутримембранное расщепление BCMA.

101. Комбинация согласно варианту осуществления 100, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление BCMA с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,35 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,35 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ, от до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,35 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,25 нМ до 0,35 нМ, от 0,35 нМ до 10 нМ, от 0,35 нМ до 5 нМ, от 0,35 нМ до 1 нМ, от 0,35 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ или от 5 нМ до 10 нМ.

102. Комбинация согласно варианту осуществления 100 или варианту осуществления 101, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует внутримембранное расщепление BCMA с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) менее чем или приблизительно менее чем 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

103. Комбинация, содержащая:

(а) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор не связывается специфически с поверхностным антигеном созревания В-клеток (BCMA); и

(b) ингибитор гамма-секретазы.

104. Способ согласно варианту осуществления 103, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

105. Комбинация согласно варианту осуществления 104, где антиген-мишень выбран из карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, SEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ERHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE AI, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онко-

фетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, O-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патогенспецифического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

106. Комбинация согласно варианту осуществления 104 или варианту осуществления 105, где антиген-мишень представляет собой Muc1.

107. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-106, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует, или снижает, или способен ингибировать или снижать расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из BCMA, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, E-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α R2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP).

108. Комбинация согласно варианту осуществления 107, где одна или несколько мишеней ингибитора гамма-секретазы включает Muc1.

109. Комбинация согласно варианту осуществления 107, где одна или несколько мишеней ингибитора гамма-секретазы включает BCMA.

110. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 103-109, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) от 0,01 нМ до 1 мкМ, от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 1 мкМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 1 мкМ, от 0,25 нМ до 100 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 1 мкМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 мкМ, от 10 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 1 мкМ.

111. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 103-110, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC₅₀) менее чем или приблизительно менее чем 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ или менее.

112. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-111, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор.

113. Комбинация согласно варианту осуществления 112, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор, и пептидный ингибитор выбран из альдегидных производных пептидов, дифторкетонных производных, изостерных производных гидроксипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов.

114. Комбинация согласно варианту осуществления 113, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, и непептидный ингибитор представляет собой производное бензодиазепинов или производное сульфонамидов.

115. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-114, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния или ингибитор не переходного состояния.

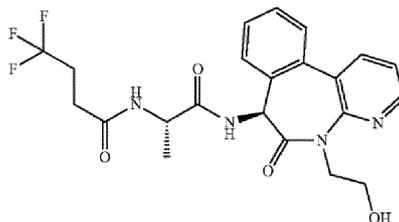
116. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-115, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.

117. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-116, где ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu-норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналя, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSIXVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazepин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-дибензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-

фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Пe-лейциналя; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; МК-0752; MRK-003 (Merck); семагестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (дибензазепин), соединения E ([[(2S)-2-{{(3,5-дифторфенил)ацетил}амино}-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамида], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-{{(4-хлорфенил)сульфонил}-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

118. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-117, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой LY3039478 или соединение структуры:

Соединение I

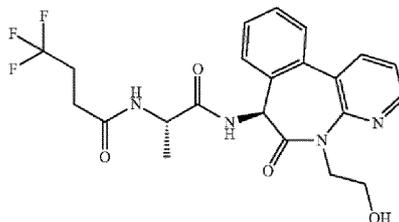


или стереоизомер, или фармацевтически приемлемый соль или гидрат любого из вышеуказанных.

119. Комбинация, содержащая:

- (a) генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор; и
 (b) LY3039478 или соединение структуры:

Соединение I



или стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль или гидрат любого из вышеуказанных.

120. Комбинация согласно варианту осуществления 119, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

121. Комбинация согласно варианту осуществления 120, где антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (BCMA), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, CEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), ERHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, с-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

122. Комбинация согласно варианту осуществления 120 или вариант осуществления 121, где антиген-мишень представляет собой Muc1.

123. Комбинация согласно варианту осуществления 120 или вариант осуществления 121, где антиген-мишень представляет собой BCMA.

124. Комбинация согласно варианту осуществления 123, где BCMA представляет собой поверхностный BCMA.

125. Комбинация согласно варианту осуществления 124, где связывание рекомбинантного рецептора, необязательно CAR, с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, необязательно CAR-экспрессирующих кле-

ток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный ВСМА, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы ВСМА, необязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы ВСМА, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося ВСМА, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный рекомбинантный рецептор против ВСМА, необязательно, CAR против ВСМА, в том же анализе.

126. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 103-125, где рекомбинантный рецептор представляет собой трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

127. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 103-126, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор, который необязательно представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

128. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-102 и 127, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

129. Комбинация согласно варианту осуществления 128, где внутриклеточный сигнальный домен содержит цепь CD3-зета (CD3 ζ).

130. Комбинация согласно варианту осуществления 128 или варианту осуществления 129, где химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

131. Комбинация согласно варианту осуществления 130, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен, происходящий из CD28 или 4-1BB, необязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

132. Комбинация согласно варианту осуществления 130 или варианту осуществления 131, где костимулирующая сигнальная область представляет собой домен, происходящий из 4-1BB, необязательно 4-1BB человека.

133. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-132, где ВСМА представляет собой ВСМА человека, или антиген-мишень представляет собой антиген человека.

134. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-134, где генетически модифицированные клетки включают Т-клетки или НК-клетки.

135. Комбинация согласно варианту осуществления 134, где генетически модифицированные клетки включают Т-клетки.

136. Комбинация согласно варианту осуществления 134 или варианту осуществления 135, где Т-клетки являются CD4⁺ и/или CD8⁺.

137. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 134-136, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от индивидуума.

138. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-137, где генетически модифицированные клетки составлены в качестве фармацевтической композиции для введения индивидууму, необязательно где клетки составлены для введения в одной или нескольких единичных дозах для лечения заболевания или состояния.

139. Комбинация согласно любому из вариантов осуществления 99-138, где ингибитор гамма-секретазы составлен в качестве фармацевтической композиции для введения индивидууму, необязательно где ингибитор гамма-секретазы составлен для введения в одной или нескольких единичных дозах.

140. Набор, содержащий комбинацию согласно любому из вариантов осуществления 99-139 и инструкции по введению генетически модифицированных клеток и/или ингибитора гамма-секретазы индивидууму, имеющему заболевание или нарушение.

141. Набор согласно варианту осуществления 140, дополнительно содержащий реагент для обнаружения экспрессии антигена созревания В-клеток (BCMA) на поверхности клетки и инструкции по введению ингибитора индивидууму, исходя из результатов применения реагента для обнаружения ВСМА на поверхности клеток злокачественной опухоли у индивидуума, необязательно где клетки злокачественной опухоли экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазматитов, или происходят из плазматитов.

142. Набор согласно варианту осуществления 141, где в инструкциях описано введение ингибитора индивидууму, если клетки имеют низкую экспрессию поверхностного ВСМА и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня.

143. Набор согласно варианту осуществления 142, где пороговый уровень экспрессии поверхностного ВСМА является более низким, чем средняя или срединная экспрессия или уровень поверхностного ВСМА на плазматитах у множества контрольных индивидуумов, необязательно где контрольные индивидуумы представляют собой группу здоровых или нормальных индивидуумов.

144. Набор согласно варианту осуществления 142 или вариант осуществления 143, где:

низкая экспрессия поверхностного ВСМА существует, когда менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазматитов, или клеток с маркером плазматитов или фенотипом, или злокачественных клеток, у индивидуума экспрессируют поверхностный ВСМА; или

пороговый уровень поверхностного ВСМА представляет собой величину, соответствующую менее чем или приблизительно менее чем 60%, менее чем или приблизительно менее чем 50%, менее чем или приблизительно менее чем 40%, менее чем или приблизительно менее чем 30%, менее чем или приблизительно менее чем 20% или менее чем или приблизительно менее чем 10% плазматитов, или клеток с маркером плазматитов или фенотипом, или злокачественных клеток, у индивидуума, которые экспрессируют поверхностный ВСМА.

145. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-144, дополнительно содержащий генетически модифицированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, необязательно где генетически модифицированные клетки составлены для введения одной или нескольких единичных доз индивидууму, имеющему заболевание или состояние.

146. Набор согласно варианту осуществления 145, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или состоянием.

147. Набор согласно любому из вариантов осуществления 140, 145 и 146, где в инструкциях описано введение ингибитора гамма-секретазы, или одной или нескольких его единичных доз, индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, до, одновременно или после начала введения дозы генетически модифицированных клеток индивидууму.

148. Набор согласно варианту осуществления 147, где в инструкциях описано введение ингибитора гамма-секретазы, или одной или нескольких его доз, индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, до начала введения дозы генетически модифицированных клеток индивидууму.

149. Набор согласно варианту осуществления 148, где в инструкциях описано введение ингибитора в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч или 1 недели до начала проведения клеточной терапии.

150. Набор согласно варианту осуществления 147, где в инструкциях описано введение ингибитора гамма-секретазы, или одной или нескольких его единичных доз, индивидууму, имеющему заболевание или нарушение, после начала введения дозы генетически модифицированных клеток индивидууму.

151. Набор, содержащий:

(а) ингибитор гамма-секретазы, необязательно где ингибитор гамма-секретазы составлен в виде одной или нескольких единичных доз; и

(б) инструкции по введению ингибитора гамма-секретазы индивидууму после начала проведения клеточной терапии у индивидуума, причем клеточная терапия включает дозу генетически модифицированных клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор.

152. Набор согласно варианту осуществления 150 или варианту осуществления 151, где начало введения ингибитора происходит в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 недели, 14 недель, 21 суток, 28 суток или более после начала введения дозы генетически модифицированных клеток.

153. Набор согласно любому из вариантов осуществления 150-152, где в инструкциях описано, что ингибитор предназначен для введения, когда:

число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума, снижается по сравнению с числом этих клеток у этого индивидуума в предыдущий момент времени после начала введения клеток;

число клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови, менее чем или приблизительно менее чем в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз или в 100 раз или менее меньше пикового или максимального числа клеток клеточной терапии, обнаруживаемых в крови индивидуума после начала введения клеток; и/или

в момент времени после обнаружения пикового или максимального уровня клеток клеточной терапии в крови индивидуума число клеток или клеток, происходящих из этих клеток, обнаруживаемых в крови индивидуума составляет менее 10%, менее 5%, менее 1% или менее 0,1% от общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) в крови индивидуума.

154. Набор согласно любому из вариантов осуществления 150-153, где в инструкциях описано, что ингибитор предназначен для введения через вплоть до 7 суток, 14 суток, 21 сутки, 28 суток или более после начала введения клеток.

155. Набор согласно любому из вариантов осуществления 150-154, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или нарушением.

156. Набор согласно варианту осуществления 146 или варианту осуществления 155, где антиген-мишень выбран из антигена созревания В-клеток (ВСМА), карбоангидразы 9 (CAIX), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелина, SEA и поверхностного антигена гепатита В, рецептора фолатов, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, эпителиального гликопротеина 2 (EPG-2), эпителиального гликопротеина 40 (EPG-40), EPHa2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, димеров

erbB, EGFR vIII, связывающего фолаты белка (FBP), FCRL5, FCRH5, фетального рецептора ацетилхолина, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, рецептора с доменом вставки киназы (kdr), легкой цепи каппа, Lewis Y, L1-клеточной молекулы адгезии, (L1-CAM), меланома-ассоциированного антигена (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, предпочтительно экспрессируемого антигена меланомы (PRAME), сурвивина, TAG72, B7-H6, рецептора IL-13 альфа 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, рецептора фолатов а, CD44v6, CD44v7/8, интегрин авb6, 8H9, NCAM, рецепторов VEGF, 5T4, фетального AchR, лигандов NKG2D, CD44v6, двойного антигена, антигена злокачественной опухоли-семенников, мезотелина, CMV мыши, муцина 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкофетального антигена, ROR1, TAG72, VEGF-R2, карциноэмбрионального антигена (CEA), Her2/neu, рецептора эстрогенов, рецептора прогестерона, эфрина B2, CD123, c-Met, GD-2, О-ацетилированного GD2 (OGD2), CE7, антигена опухоли Вильмса 1 (WT-1), циклина, циклина A2, CCL-1, CD138, патоген-специфического антигена и антигена, ассоциированного с универсальной меткой.

157. Набор согласно варианту осуществления 156, где антиген-мишень представляет собой Muc1, обязательно Muc1 человека.

158. Набор согласно варианту осуществления 156, где антиген-мишень представляет собой BCMA, обязательно BCMA человека.

159. Набор согласно варианту осуществления 158, где связывание рекомбинантного рецептора, обязательно CAR, с поверхностным BCMA или показатель, указывающий на функцию или активность экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, обязательно CAR-экспрессирующих клеток, после воздействия клеток, экспрессирующих поверхностный BCMA, не снижается или не блокируется, или по существу не снижается или не блокируется в присутствии растворимой или высвободившейся формы BCMA, обязательно в концентрации или в количестве растворимой или высвободившейся формы BCMA, соответствующих концентрации или количеству, присутствующим в сыворотке, или в крови, или в плазме индивидуума или пациента с множественной миеломой, или в среднем в популяции пациентов для данного заболевания или нарушения, или в концентрации или в количестве растворимого или высвободившегося BCMA, при которых связывание или показатель снижаются или блокируются, или по существу снижаются или блокируются, для клеток, экспрессирующих эталонный рекомбинантный рецептор против BCMA, обязательно, CAR против BCMA, в том же анализе.

160. Набор согласно любому из вариантов осуществления 146-159, где рекомбинантный рецептор представляет собой трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR) или функциональный не Т-клеточный рецептор.

161. Набор согласно любому из вариантов осуществления 146-160, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор, который обязательно представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

162. Набор согласно варианту осуществления 161, где химерный рецептор антигена (CAR) содержит внеклеточный антиген-распознающий домен, который специфически связывается с антигеном, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

163. Набор согласно варианту осуществления 162, где внутриклеточный сигнальный домен содержит цепь CD3-зета (CD3 ζ).

164. Набор согласно любому из вариантов осуществления 161-163, где химерный рецептор антигена (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

165. Набор согласно варианту осуществления 164, где костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен, происходящий из CD28 или 4-1BB, обязательно CD28 человека или 4-1BB человека.

166. Набор согласно варианту осуществления 164 или варианту осуществления 165, где костимулирующая сигнальная область представляет собой домен, происходящий из 4-1BB, обязательно 4-1BB человека.

167. Набор согласно любому из вариантов осуществления 146-166, где генетически модифицированные клетки включают Т-клетки или NK-клетки.

168. Набор согласно варианту осуществления 167, где генетически модифицированные клетки включают Т-клетки.

169. Набор согласно варианту осуществления 167 или варианту осуществления 168, где Т-клетки являются CD4⁺ и/или CD8⁺.

170. Набор согласно любому из вариантов осуществления 167-169, где Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от индивидуума.

171. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-170, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует расщепление одной или нескольких мишеней, выбранных из BCMA, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Muc1, эфрина B2, бета-гликана (TGFB3), CD43, CD44, CSF1R, CXCR1, CXCL16, Delta1, Е-кадгерина, N-кадгерина, HLA-A2, IFN α 2, IL1R1, IL1R2, IL6R или белка-предшественника амилоида (APP).

172. Набор согласно варианту осуществления 171, где одна или несколько мишеней ингибитора

гамма-секретазы включает Mus1.

173. Набор согласно варианту осуществления 171, где одна или несколько мишеней ингибитора гамма-секретазы включает ВСМА.

174. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-173, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) от 0,01 нМ до 1 мкМ, от 0,01 нМ до 100 нМ, от 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 нМ до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,25 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 1 мкМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 нМ до 0,5 нМ, от 0,05 нМ до 0,25 нМ, от 0,05 нМ до 0,1 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 нМ до 0,5 нМ, от 0,1 нМ до 0,25 нМ, от 0,25 нМ до 1 мкМ, от 0,25 нМ до 100 нМ, от 0,25 нМ до 10 нМ, от 0,25 нМ до 5 нМ, от 0,25 нМ до 1 нМ, от 0,25 нМ до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 1 мкМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 1 мкМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 1 мкМ, от 10 нМ до 100 нМ или 100 нМ до 1 мкМ.

175. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-174, где ингибитор гамма-секретазы ингибирует мишень с полумаксимальной ингибиторной концентрацией (IC_{50}) менее чем или приблизительно менее чем 1 мкМ, 100 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 1 нМ, 0,5 нМ, 0,35 нМ, 0,25 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ, или менее.

176. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-175, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор или непептидный ингибитор.

177. Набор согласно варианту осуществления 176, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой пептидный ингибитор, и пептидный ингибитор выбран из альдегидных производных пептидов, дифторкетонных производных, изостерных производных гидроксипептидов, альфа-спиральных производных пептидов и аналогов дипептидов.

178. Набор согласно варианту осуществления 177, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой непептидный ингибитор, и непептидный ингибитор представляет собой производное бензодиазепинов или производное сульфонамидов.

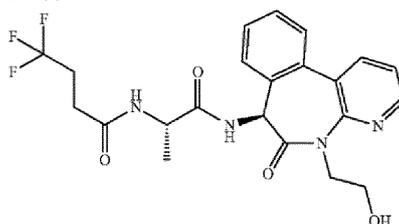
179. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-178, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой ингибитор переходного состояния или ингибитор не переходного состояния.

180. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-179, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство.

181. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-180, где ингибитор гамма-секретазы выбран из LY3039478, ингибитора I секретазы (GSI I) Z-Leu-Leu -норлейцина; ингибитора II γ -секретазы (GSI II); ингибитора III γ -секретазы (GSI III), N-бензилоксикарбонил-Leu-лейциналя, N-(2-нафтоил)-Val-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI IV); ингибитора III γ -секретазы (GSI V), N-бензилоксикарбонил-Leu-фенилаланиналя; ингибитора III γ -секретазы (GSI VI), 1-(S)-эндо-N-(1,3,3)-триметилбицикло[2.2.1]гепт-2-ил)-4-фторфенилсульфонамида; ингибитора III γ -секретазы (GSI VII), метилоксикарбонил-LL-CHO; ингибитора III γ -секретазы (GSI IX), (DAPT), трет-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил-L-аланил)]-S-фенилглицина; ингибитора X γ -секретазы (GSI X), трет-бутилового эфира {1S-бензил-4R-[1-(1S-карбамоил-2-фенэтилкарбамоил)-1S-3-метилбутилкарбамоил]-2R-гидрокси-5-фенилпентил}карбаминовой кислоты; ингибитора XI γ -секретазы (GSI XI), 7-амино-4-хлор-3-метоксиизокумарина; ингибитора XII γ -секретазы (GSI XII), Z-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIII γ -секретазы (GSI XIII), Z-Tyr-Ile-Leu-CHO; ингибитора XIV γ -секретазы (GSI XIV), Z-Cys(t-Bu)-Ile-Leu-CHO; ингибитора XVI γ -секретазы (GSI XVI), метилового эфира N-[N-3,5-дифторфенацетил]-L-аланил-S-фенилглицина; ингибитора XVII γ -секретазы (GSI XVII); ингибитора XIX γ -секретазы (GSI XIX), бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-бутирамида; ингибитора XX γ -секретазы (GSI XX), (S,S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(5-метил-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,d]азепин-7-ил)пропионамида; ингибитора XXI γ -секретазы (GSI XXI), (S, S)-2-[2-(3,5-дифторфенил)ацетиламино]-N-(1-метил-2-оксо-5-фенил-2-,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-пропионамида; ингибитора I секретазы Gamma40, N-транс-3,5-диметоксициннамоил-Ile-лейциналя; ингибитора II секретазы Gamma40, N-трет-бутилоксикарбонил-Gly-Val-валиналь изовалерил-V V-Sta-A-Sta-OCH₃; MK-0752; MRK-003 (Merck); семагестата/LY450139; RO4929097; PF-03084,014; BMS-708163; MPC-7869 (модификатор γ -секретазы), YO-01027 (добензазепин), соединения E ([{(2S)-2-[[{(3,5-дифторфенил)ацетил}амино]-N-[(3S)-1-метил-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-3-ил]пропанамида], LY411575, L-685.458, BMS-289948 (4-хлор-N-(2,5-дифторфенил)-N-((1R)-{4-фтор-2-[3-(1H-имидазол-1-ил)пропил]фенил}этил)бензолсульфонамида гидрохлорид) и BMS-299897 (4-[2-((1R)-1-[[{(4-хлорфенил)сульфонил]-2,5-дифторанилино}этил)-5-фторфенил]бутановая кислота).

182. Набор согласно любому из вариантов осуществления 141-181, где ингибитор гамма-секретазы представляет собой LY3039478 или соединение структуры:

Соединение I



или стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль или гидрат любого из вышеуказанных.

183. Набор согласно любому из вариантов осуществления 99-182, где в инструкциях описано введение дозы генетически модифицированных клеток индивидууму, имеющему заболевание или нарушение.

184. Набор согласно варианту осуществления 183, где заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль.

185. Набор согласно варианту осуществления 184, где злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную злокачественную опухоль.

186. Набор согласно варианту осуществления 184 или варианту осуществления 185, где злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

187. Набор согласно любому из вариантов осуществления 183-186, где доза включает от или приблизительно от 1×10^5 до 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), причем клеточная терапия включает введение от или приблизительно от 1×10^5 до 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), от или приблизительно от 5×10^5 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) или от или приблизительно от 1×10^6 до 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), в каждом случае включительно, необязательно где в инструкциях описано введение одной или множества единичных доз, включающих данную дозу клеток и/или объем, соответствующий такой одной или множеству единичных доз, включающих данную дозу клеток.

188. Набор согласно любому из вариантов осуществления 183-186, где доза включает не более 5×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более $2,5 \times 10^8$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более 1×10^8 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более 1×10^7 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более $0,5 \times 10^7$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более 1×10^6 общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), не более $0,5 \times 10^6$ общих экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, общих Т-клеток или общих мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), необязательно где в инструкциях описано введение одной или множества единичных доз, включающих данную дозу клеток и/или объем, соответствующий такой одной или множеству единичных доз, включающих данную дозу клеток.

189. Набор согласно любому из вариантов осуществления 99-188, где в инструкциях описано введение ингибитора перорально, подкожно или внутривенно.

190. Набор согласно варианту осуществления 189, где в инструкциях описано введение ингибитора перорально.

191. Набор согласно любому из вариантов осуществления 99-190, где в инструкциях описано, что ингибитор подлежит введению по меньшей мере шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, три раза в неделю, по меньшей мере один раз в неделю или только один раз.

192. Набор согласно любому из вариантов осуществления 99-191, где в инструкциях описано, что ингибитор вводят три раза в неделю.

193. Набор согласно варианту осуществления 191 или варианту осуществления 192, где в инструкциях описано, что введение ингибитора проводят в ходе курса лечения, который составляет по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 14 суток, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 21 суток, или по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или ровно 28 суток.

194. Набор согласно любому из вариантов осуществления 99-193, где в инструкциях описано, что

ингибитор вводят, или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве от 0,5 мг до 500 мг, от 0,5 мг до 250 мг, от 0,5 мг до 100 мг, от 0,5 мг до 50 мг, от 0,5 мг до 25 мг, от 0,5 мг до 10 мг, от 0,5 мг до 5,0 мг, от 0,5 мг до 2,5 мг, от 0,5 мг до 1,0 мг, от 1,0 мг до 500 мг, от 1,0 мг до 250 мг, от 1,0 мг до 100 мг, от 1,0 мг до 50 мг, от 1,0 мг до 25 мг, от 1,0 мг до 10 мг, от 1,0 мг до 5,0 мг, от 1,0 мг до 2,5 мг, от 2,5 мг до 500 мг, от 2,5 мг до 250 мг, от 2,5 мг до 100 мг, от 2,5 мг до 50 мг, от 2,5 мг до 25 мг, от 2,5 мг до 10 мг, от 2,5 мг до 5,0 мг, от 5,0 мг до 500 мг, от 5,0 мг до 250 мг, от 5,0 мг до 100 мг, от 5,0 мг до 50 мг, от 5,0 мг до 25 мг, от 5,0 мг до 10 мг, от 10 мг до 500 мг, от 10 мг до 250 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 50 мг, от 10 мг до 25 мг, от 25 мг до 500 мг, от 25 мг до 250 мг, от 25 мг до 100 мг, от 25 мг до 50 мг, от 50 мг до 500 мг, от 50 мг до 250 мг, от 50 мг до 100 мг, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 250 мг или от 250 мг до 500 мг.

195. Набор согласно любому из вариантов осуществления 99-194, где в инструкциях описано, что ингибитор вводят, или каждое введение ингибитора независимо проводят, в количестве, которое по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или составляет, или приблизительно составляет 0,5 мг, 1,0 мг, 2,5 мг, 5,0 мг, 10,0 мг, 25 мг, 50 мг, 100 мг, 250 мг или 500 мг.

196. Изделие, содержащее комбинацию или набор согласно любому из вариантов осуществления 99-195.

VII. Примеры

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Оценка поверхностной экспрессии ВСМА на клеточных линиях множественной миеломы (ММ) в присутствии ингибитора гамма-секретазы

Оценивали эффекты иллюстративного ингибитора гамма-секретазы (GSI), LY3039478, на поверхностные уровни антигена созревания В-клеток (ВСМА) на клеточных линиях множественной миеломы (ММ). Различные концентрации LY3039478, включая концентрации в пределах оцененного значения Стах/Стiп для ингибитора, инкубировали с клетками RPMI 8226 (клеточная линия множественной миеломы человека ВСМА^{low}), клетками MM1.S (клеточная линия множественной миеломы человека ВСМА^{med}) и клетками OPM2 (клеточная линия множественной миеломы человека ВСМА^{med}) в течение 24 ч при 37°C. Клеточные линии также инкубировали в отсутствие ингибитора (контроль в виде носителя). Поверхностную экспрессию ВСМА на каждой клеточной линии оценивали посредством проточной цитометрии с использованием антитела против ВСМА. Как показано на фиг. 1, LY3039478 обеспечивал мощное ингибирование отщепления ВСМА с поверхности оцениваемых клеточных линий с IC₅₀ от 0,01 нМ до 0,35 нМ.

Пример 2: Оценка функция Т-клеток с CAR против ВСМА в присутствии ингибитора гамма-секретазы

Определенную функциональную активность Т-клеток с CAR против ВСМА в отношении экспрессирующих ВСМА клеток-мишеней оценивали в присутствии или в отсутствие иллюстративного GSI LY3039478.

В этом исследовании для получения Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, CD4+ и CD8+ Т-клетки выделяли посредством иммуноаффинного обогащения из полученных путем лейкофереза образцов от двух здоровых донорных индивидуумов и одного пациента с миеломой. Выделенные Т-клетки активировали и трансдуцировали вирусным вектором, кодирующим CAR против ВСМА. CAR содержал антигенсвязывающий домен scFv, специфичный в отношении ВСМА, имеющего домен VH и домен VL с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 24 и 25, соответственно, спейсер, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, трансмембранную область CD28, костимулирующую сигнальную область 4-1BB и происходящий из CD3-зета внутриклеточный сигнальный домен. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, также включала последовательность укороченного рецептора для применения в качестве маркера трансдукции, отделенную от последовательности CAR саморасщепляющейся последовательностью T2A.

1. Цитолитическая активность

Т-клетки с CAR против ВСМА, полученные, как описано в этом примере выше, культивировали при 37°C с клетками-мишенями либо OPM2, либо RPMI-8226, в соотношении эффектора и мишени (Е:Т) 0,3:1. Клетки-мишени метили NuclLight Red (NLR), чтобы иметь возможность отслеживания клеток-мишеней посредством микроскопии. Культуры инкубировали в отсутствие LY3039478 или в присутствии LY3039478 в концентрациях 0,1 нМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1000 нМ, 10000 нМ или 100000 нМ (диапазон, охватывающий оцененный фармакокинетический диапазон человека, представлен в рамках на фиг. 3А-3D). В качестве контроля клетки-мишени инкубировали с LY3039478, но без культивирования с CAR-Т-клетками. Цитолитическую активность оценивали путем определения потери жизнеспособных клеток-мишеней приблизительно через 150 ч при определении по красному флуоресцентному сигналу (с использованием системы IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Определяли площадь под кривой для уничтожения, наблюдаемого в ходе периода культивирования (~150 ч). Процентный лизис (% уничтожение) определяли путем нормализации AUC для уничтожения к культурам, инкубированным без ингибитора.

Оценка CAR-T-клеток от донора, являющегося пациентом с миеломой, представлена на фиг. 2А (OPM2) и 2В (RPMI-8226). Как показано, LY3039478 увеличивал цитолитическую активность Т-клеток с CAR против BCMA при всех протестированных концентрациях в обеих клеточных линиях, хотя величина эффекта при протестированных концентрациях ингибитора зависела от клеточной линии. Не наблюдали неблагоприятных эффектов на функцию CAR Т-клеток в этом анализе для 100 мкМ LY3039478, что в 300 раз выше вычисленной St_{max} , наблюдаемой у пациентов. Не наблюдали отличий в выживаемости мишени в присутствии LY3039478 отдельно без CAR-T-клеток. Сходные результаты наблюдали при соотношении E:T 1:1. CAR-T-клетки, полученные от других доноров, которые инкубировали с LY3039478, также продемонстрировали увеличение функции CAR-T-клеток, хотя наблюдали некоторую вариабельность от донора к донору. Эти результаты указывают на то, что лечение в присутствии ингибитора гамма-секретазы может повышать экспрессию поверхностного BCMA и цитолитическую функцию Т-клеток с CAR против BCMA.

Сходное исследование проводили для дальнейшей оценки эффектов различных концентраций LY3039478, включая концентрации в пределах оцененного значения C_{max}/C_{min} для ингибитора, на цитолитическую функцию Т-клеток с CAR против BCMA против клеток-мишеней OPM2. Результаты, приведенные на фиг. 2С для одного иллюстративного донора, показали, что LY3039478 был способен повышать уничтожение Т-клетками с CAR против BCMA клеток-мишеней, экспрессирующих BCMA, с IC_{50} 0,1-0,25 нМ.

2. Продуцирование цитокинов

Продуцирование цитокинов Т-клетками с CAR против BCMA в присутствии или в отсутствие LY3039478 оценивали посредством мониторинга уровней цитокинов в супернатантах сокультур CAR-T-клеток с экспрессирующими BCMA клетками-мишенями. CAR-T-клетки, полученные, как описано в этом примере, культивировали с клетками-мишенями либо OPM2, либо RPMI-8226, в отсутствие LY3039478 или в присутствии LY3039478 в концентрациях 0,1 нМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1000 нМ, 10000 нМ или 100000 нМ (диапазон, охватывающий оцененное фармакокинетическое изменение у человека, представлен в рамках на фиг. 3А-3D). Культуральные супернатанты собирали через 24 часа и IFN γ и IL-2 количественно определяли в культуральных супернатантах.

Присутствие LY3039478 увеличивало продуцирование IFN-гамма (фиг. 3А и фиг. 3В) и IL-2 (фиг. 3С и 3D) в супернатанте Т-клеток с CAR против BCMA, сокультивированных с экспрессирующими BCMA клетками-мишенями, по сравнению с сокультурами, инкубированными в отсутствие LY3039478. Величина эффекта различалась между клеточными линиями и в некоторых случаях между концентрациями ингибитора. Аналогично эффектам на цитолитическую функцию, результаты показали, что комбинация с ингибитором гамма-секретазы увеличивает доступность антигена BCMA для Т-клеток с CAR против BCMA, что приводит к усилению эффекта CAR-T-клеток, включая продуцирование цитокинов.

Сходное исследование проводили для дальнейшей оценки эффектов различных концентраций LY3039478, включая концентрации в пределах оцененного значения C_{max}/C_{min} для ингибитора, на способность Т-клеток с CAR против BCMA, полученных, как описано в примере 2, выше, продуцировать цитокины после сокультивирования с клетками-мишенями OPM2. Результаты на фиг. 3Е для одного иллюстративного донора согласовывались с интерпретацией, что LY3039478 был способен увеличивать продуцирование цитокинов (с IC_{50} 0,1-0,25 нМ) Т-клетками с CAR против BCMA, культивированными с экспрессирующими BCMA клетками-мишенями.

Пример 3: Эффект ингибитора гамма-секретазы на экспансию CAR-T-клеток и продуцирование цитокинов после последовательной рестимуляции

Способность CAR Т-клеток к экспансии *ex vivo* после повторяющихся раундов стимуляции антигеном может коррелировать с функцией *in vivo* и/или способность клеток к персистенции *in vivo* (например, после введения и первоначальной активации в ответ на встречу с антигеном) (Zhao et al. (2015) Cancer Cell, 28:415-28). Для оценки эффекта иллюстративного ингибитора гамма-секретазы на активность CAR-T-клеток после последовательностей рестимуляции Т-клетки с CAR против BCMA получали, как описано выше в примере 2, и добавляли облученные экспрессирующие BCMA клетки-мишени (клетки MM1S) в соотношении эффектор-мишень (E:T) 1:2 в присутствии LY3039478 в двух различных концентрациях, либо при 0,001 мкМ (концентрация, приблизительно равная IC_{50}), либо при более высокой концентрации 1,0 мкМ (приблизительно в 3 раза выше St_{max}), или с контролем в виде только носителя. Анализ проводили для композиции Т-клеток с CAR против BCMA, полученных из Т-клеток, полученных от здорового донора или от донора с множественной миеломой. Каждые 3-4 суток CAR-экспрессирующие Т-клетки собирали, подсчитывали и повторно высевали при первоначальной плотности посева со свежей средой, содержащей новые облученные клетки-мишени с тем же соотношением E:T в присутствии или в отсутствие той же концентрации LY3039478. Проводили всего 3-5 раундов стимуляции в ходе периода культивирования, составляющего 10-14 суток. Эффекты ингибитора на функцию Т-клеток оценивали путем мониторинга количества клеток (фиг. 4А и 4В) или продуцирования цитокинов в собранном супернатанте (фиг. 5А и фиг. 5В) при каждом раунде стимуляции.

Количество CAR-T-клеток определяли на каждом раунде перед повторным посевом Т-клеток с CAR против BCMA, полученных из клеток от здорового донора (фиг. 4А), или из клеток пациента (фиг. 4В).

Для Т-клеток с CAR против ВСМА, происходящих от обоих доноров, наблюдали увеличенную экспансию Т-клеток с CAR против ВСМА в течение периода 10-14 суток, когда CAR-Т-клетки инкубировали в присутствии обеих концентраций LY3039478 (0,001 мкМ и 1,0 мкМ). Результаты показали, что LY3039478 не демонстрировал каких-либо вредоносных эффектов на функцию CAR-Т-клеток, даже несмотря на то, что он является известным ингибитором каскада передачи сигнала Notch, который вовлечен в дифференцировку Т-клеток. Результаты согласовывались с заключением, что иллюстративный ингибитор гамма-секретазы LY3039478 может стимулировать длительную экспансию и/или выживаемость CAR+ Т-клеток после повторной встречи с распознаваемым ими антигеном.

Продукцию цитокинов Т-клетками с CAR против ВСМА при рестимуляции клетками, экспрессирующими антиген, в присутствии или в отсутствии LY3039478, оценивали после первого раунда повторного посева на 4 сутки. Культуральные супернатанты собирали через 24 ч после повторного посева и определяли уровни IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа в культуральных супернатантах. Увеличенные уровни IFN-гамма, IL-2 и TNF-альфа наблюдали для обеих концентраций LY3039478 (0,001 мкМ и 1,0 мкМ) в Т-клетках с CAR против ВСМА, полученных из клеток здорового донора (фиг. 5А), или из донорных клеток пациента (фиг. 5В).

Пример 4: Оценка средств в отношении блокирования активности CAR против ВСМА

Получали полинуклеотиды, кодирующие иллюстративные химерные рецепторы антигенов (CAR), каждый из которых содержал антигенсвязывающий домен scFv человека против ВСМА. Среди CAR были те, которые содержали scFv против ВСМА, содержавшие VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 22 и 23, соответственно (обозначаемый в данном примере как CAR против ВСМА.3), VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 24 и 25, соответственно (обозначаемый в данном примере как CAR против ВСМА.4), и VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 18 и 19, соответственно (обозначаемый в этом примере как CAR против ВСМА.1). Также получали кодируемые CAR, которые содержали иллюстративный спейсер, указанный в SEQ ID NO: 31, трансмембранный домен CD28 человека, происходящую из 4-1BB человека внутриклеточную косигнальную последовательность, и происходящий из CD3-зета внутриклеточный сигнальный домен.

Клоны кДНК, кодирующие такие CAR, связывали с нижерасположенным элементом рибосомального пропускания (таким как T2A), за которым следовала кодирующая укороченный рецептор последовательность, и клонировали в лентивирусный экспрессирующий вектор.

Для получения Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, Т-клетки выделяли посредством иммуноаффинного обогащения из полученных путем лейкофереза образцов от доноров-людей. Выделенные Т-клетки активировали и трансдуцировали лентивирусными векторами, содержащими соответствующие полинуклеотиды, кодирующие CAR против ВСМА, и увеличивали в количестве; CD4+ и CD8+ Т-клетки окрашивали и анализировали посредством проточной цитометрии для подтверждения трансдукции и экспрессии CAR против ВСМА. Различные функции экспрессирующих CAR против ВСМА клеток оценивали после инкубации с клетками-мишенями, экспрессирующими ВСМА, и растворимым ВСМА.

Для оценки цитолитической активности Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА, инкубировали с клетками-мишенями OPM2 в соотношении Е:Т 5:1 в присутствии растворимого ВСМА-Fc в концентрации 0, 0,3, 3, 30 или 300 нг/мл. Клетки-мишени метили NucLight Red (NLR), чтобы иметь возможность отслеживания клеток-мишеней посредством микроскопии. Цитолитическую активность оценивали путем определения потери жизнеспособных клеток-мишеней на протяжении периода от 24 до 72 ч при определении по красному флуоресцентному сигналу (с использованием системы IncuCyte® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience). Процентный лизис (% лизис) приводили к лизису, который происходил в клетках-мишенях, инкубированных с имитирующими Т-клетками. Цитолитическая активность Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА.1 или CAR против ВСМА.3, существенно снижалась в присутствии 3 нг/мл или более ВСМА-Fc, однако цитолитическая активность клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА.4, не блокировалась посредством присутствия вплоть до 300 нг/мл ВСМА-Fc.

Для оценки продуцирования цитокинов Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА, инкубировали с клетками-мишенями OPM2 в соотношении Е:Т 5:1 в присутствии растворимого ВСМА-Fc в концентрации 0, 111, 333 и 1000 нг/мл. Также оценивали Т-клетки, не экспрессирующие CAR (имитация). Оценивали накопление цитокинов IFN- γ , TNF- α и IL-2 в супернатанте. Накопление цитокинов в культурах, содержащих Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА.1 или CAR против ВСМА.3, значительно снижалось в присутствии 111 нг/мл или более ВСМА-Fc, однако меньшее снижение накопления цитокинов наблюдали в культурах, содержащих Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА.4, в присутствии растворимого ВСМА-Fc при всех протестированных концентрациях.

В другом эксперименте оценивали активность Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА.4, в присутствии против отсутствия растворимого ВСМА. Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА.4, культивировали с опухолевые клетки RPMI-8226 с рекомбинантным ВСМА-Fc, или с клеточным культуральным супернатантом, полученных от клеток множественной миеломы NCI-H929 (ВСМА-секретирующая клеточная линия, супернатант, содержащий растворимый ВСМА). Ни одна из концен-

траций происходящего из NCI-H929 растворимого ВСМА (вплоть до 1000 нг/мл) не влияла ни на лизис опухолевых клеток, ни на продуцирование цитокинов. Как лизис опухолевых клеток, так и продуцирование цитокинов, только минимально снижались при аналогично высоких физиологических уровнях рекомбинантного ВСМА.

Пример 5: Введение соединения ингибитора гамма-секретазы LY3039478 и Т-клеток с CAR против ВСМА *in vivo* в модели опухоли на животных

Исследование фармакокинетики и фармакодинамики проводили после перорального введения пероральной дозы LY3039478 (3 мг/кг) в модели с ксенотрансплантатом множественной миеломы человека. В частности, мышам NOD.Cg.PrkdcscidIL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) инъецировали подкожно (п/к) $1E+07$ клеток RPMI-8226, модифицированных для экспрессии GFP и люциферазы светлячка (RPMI-8226 ffluc), и опухолям позволяли расти. Через тридцать два (32) дня после инъекции RPMI-8226 (сутки 0 испытания), перорально вводили однократную дозу 3 мг/кг LY3039478.

На фиг. 6 представлен анализ образцов крови, взятых через 0, 0,5, 2, 6, 18, 24, 36 и 48 ч после введения, в отношении уровней в плазме лекарственного средства. На фиг. 7 представлены уровни ВСМА в плазме с течением времени в образцах плазмы, полученных через 0, 0,5, 2, 6, 18, 24, 36 и 48 ч после проведения введения мышам, которым вводили однократную пероральную дозу LY3039478 (3 г/кг) или носителя в этом испытании. Опухолевые клетки через 2 ч, 24 ч или 48 ч после введения LY3039478 или контроля в виде носителя в испытании оценивали в отношении поверхностной экспрессии ВСМА. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) поверхностного ВСМА при оценке посредством проточной цитометрии представлена на фиг. 8. Увеличенная экспрессия ВСМА на опухолях была подтверждена для схемы дозирования 0,1 мг/кг или 1 мг/кг, вводимых посредством двух пероральных введений LY3039478 в альтернативной модели с опухолевыми клетками множественной миеломы.

Противоопухолевые эффекты после введения Т-клеток с CAR против ВСМА и соединения ингибитора гамма-секретазы, LY3039478, каждого индивидуально и в комбинации, оценивали в модели на мышах с ксенотрансплантатом клеток множественной миеломы человека RPMI-8226. Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА, получали, как описано в примере 2.

Мышам NOD.Cg.PrkdcscidIL2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) инъецировали подкожно (п/к) $1E+07$ RPMI-8226 клеток, модифицированных для экспрессии GFP и люциферазы светлячка (RPMI-8226 ffluc), и объему опухоли позволяли увеличиваться в течение 25 суток, причем 25-е сутки обозначали как "сутки 0" в этом испытании. Животных подразделяли на 8 групп и в каждой группе проводили одно из следующих введений: (1) только носитель, (2) только LY3039478 (3 мг/кг), (3) имитирующие Т-клетки (не экспрессирующие CAR) ($3,00E+06$ Т-клеток на мышь) и носитель, (4) имитирующие Т-клетки ($3,00E+06$ Т-клеток на мышь) и LY3039478 (3 мг/кг), (5) Т-клетки с CAR против ВСМА ($1,00E+06$ CAR+ клеток на мышь) и носитель, (6) Т-клетки с CAR против ВСМА ($1,00E+06$ CAR+ клеток на мышь) и LY3039478 (3 мг/кг), (7) Т-клетки с CAR против ВСМА ($3,00E+06$ CAR+ клеток на мышь) и носитель, или (8) Т-клетки с CAR против ВСМА ($3,00E+06$ CAR+ клеток на мышь) и LY3039478 (3 мг/кг). В каждой группе LY3039478 или носитель доставляли через рот (п/о) на сутки -1 и на нулевые сутки (0) и раз в двое суток (e.o.d.) вплоть до суток 21. Когда это было применимо, Т-клетки вводили посредством однократной внутривенной (в/в) инъекции на сутки 0.

Объем опухоли оценивали два раза в неделю в ходе испытания; результаты для различных групп представлены на фиг. 9А. CAR+ Т-клетки в крови и в опухоли оценивали на 7, 15, 21 и 28 суток посредством проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к маркерам клеточной поверхности, и реагента, специфичного к CAR против ВСМА. В ходе исследования проводили мониторинг выживаемости животных.

Как показано на фиг. 9А, опухоли продолжали расти в ходе исследования после адоптивного переноса клеток отрицательного контроля (имитация) или у мышей, которым не проводили лечение. У мышей, которым вводили более высокую дозу Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, полную регрессию роста опухоли наблюдали приблизительно через 20 суток после переноса Т-клеток, и она сохранялась на протяжении остальной части исследования; некоторое снижение роста опухоли наблюдали у животных, которым вводили более низкую дозу Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, и носитель. У животных, которым проводили введение LY3039478 в комбинации с более низкой дозой клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, наблюдали значительное снижение роста опухоли по сравнению с мышами, которым вводили более низкую дозу клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, и носитель. Введение LY3039478 хорошо переносилось на протяжении испытания, на что указывала масса тела и показатель оценки состояния.

Процентная выживаемость животных в ходе исследования представлена на фиг. 9В. Наблюдали, что введение Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, приводит к повышению выживаемости. Следующую пользу для выживаемости наблюдали у мышей, которым вводили комбинацию более низкой дозы Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, и GSI, LY3039478, по сравнению с группой, в которой вводили более низкую дозу CAR-Т-клеток и носитель.

Таблица E1
Выживаемость среди групп

Группа	Срединная выживаемость (сутки)	Количество смертей	Выживаемость на 65 сутки, %	Выживаемость без опухоли на 65 сутки
Носитель	22,5	10	0	NA
LY3039478	22,5	10	0	NA
Имитация+носитель	21	10	0	NA
Имитация+LY3039478	22,5	7	30	2/3
Т-клетки, экспрессирующие CAR против BCMA, 1e6+носитель	60,5	5	50	5/5
Т-клетки, экспрессирующие CAR против BCMA, 1e6+LY3039478	Не определена	2	80	8/8
Т-клетки, экспрессирующие CAR против BCMA, 3e6+носитель	Не определена	0	100	10/10
Т-клетки, экспрессирующие CAR против BCMA, 3e6+LY3039478	Не определена	0	100	10/10

В ходе исследования проводили мониторинг присутствия CAR+ Т-клеток в крови (в крови, взятой на 7, 14, 21 и 28 сутки после введения CAR-Т-клеток). Лейкоциты из образцов крови окрашивали различными реагентами для детекции различных маркеров на поверхности иммунных клеток, включая Т-клетки, и экспрессии CAR (включая реагент, специфичный в отношении CAR, и реагент, специфичный в отношении маркера трансдукции, кодируемого вектором с CAR). Результаты представлены на фиг. 10A и 10B.

Как показано, увеличение количеств CD4+ Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA (фиг. 10A), и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA (фиг. 10B) наблюдали в периферической крови на 15, 21 и 28 сутки после введения либо более высокой, либо более низкой дозы CAR-экспрессирующих Т-клеток в комбинации с LY3039478 по сравнению с его отсутствием. В присутствии LY3039478 максимальная экспансия происходила приблизительно через 15 суток после введения более высокой дозы клеток, экспрессирующих CAR против BCMA, и приблизительно через 21 сутки после введения низкой дозы Т-клеток, экспрессирующих CAR против BCMA. Не наблюдали изменений количеств в периферической крови для CD4+ или CD8+ Т-клеток, которые не экспрессировали CAR против BCMA, при введении с LY3039478 или без него.

Лизаты опухолей также анализировали для определения количества CD4+ и CD8+ CAR+ Т-клеток в опухолях после различных условий введения. На 7 и 15 сутки, лизаты сателлитных опухолей от мышей, которым вводили более низкую дозу Т-клеток с CAR против BCMA и LY3039478, продемонстрировали более высокое количество CD4+ и CD8+ CAR+ Т-клеток на 1×10^6 клеток по сравнению с мышами, которым вводили более низкую дозу Т-клеток с CAR против BCMA и носитель (фиг. 11). Анализ клеток из лизатов опухолей в отношении экспрессии поверхностного BCMA посредством проточной цитометрии при определении по средней интенсивности флуоресценции (MFI), продемонстрировал, что присутствие LY3039478 увеличивало MFI поверхностного BCMA на опухолевых клетках RPMI-8226 (фиг. 12B). Сывороточный BCMA также оценивали в зависимости от условий лечения. На фиг. 12A представлены сы-

вороточные уровни ВСМА на 7 и 15 сутки для каждого условия лечения. Эти результаты согласуются со способностью LY3039478 снижать или предупреждать отщепление поверхностного ВСМА.

Эти результаты согласуются с данными, что введение LY3039478 в комбинации с более низкой дозой Т-клеток с CAR против ВСМА приводило к усилению противоопухолевых эффектов по сравнению с введением более низкой дозы Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, в комбинации с носителем отдельно.

Пример 6: Оценка Т-клеток с CAR против ВСМА после длительной стимуляции и повторной нагрузки в присутствии соединения ингибитора гамма-секретазы, LY3039478

Оценивали эффект соединения ингибитора гамма-секретазы, LY3039478, на цитотоксичность Т-клеток с CAR против ВСМА после длительной CAR-специфической стимуляции. Композиции Т-клеток с CAR против ВСМА, полученные, как описано в примере 2, содержавшие CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА, инкубировали с 50 мкг/мл конъюгированных с ВСМА-Fc гранул в течение 7 суток в условиях, предназначенных для функционального истощения CAR Т-клеток.

Затем CAR-Т-клетки повторно нагружали экспрессирующими антиген клетками-мишенями в присутствии или в отсутствие LY3039478. В частности, Т-клетки, экспрессирующие CAR против ВСМА, сокультивировали с клеточными линиями множественной миеломы RPMI-8226, OPM2 или MM1.S в присутствии 1 мкМ LY3039478 или контроля в виде носителя DMSO в соотношении эффектора и мишени 0,3:1. Для оценки цитолитической активности клетки-мишени метили NucLight Red (NLR), чтобы иметь возможность отслеживания посредством флуоресцентной микроскопии. Активность уничтожения оценивали путем измерения потери жизнеспособных клеток-мишеней с течением времени, которую определяли по снижению флуоресцентного сигнала с течением времени с использованием кинетической флуоресцентной микроскопии (с использованием системы INCUCYTE® Live Cell Analysis System, Essen Bioscience).

Мониторинг флуоресценции мишени проводили с течением времени и нормализовывали к количеству клеток-мишеней.

Результаты, показанные на фиг. 13А, продемонстрировали, что присутствие LY3039478 повышало цитолитическую активность Т-клеток CAR против ВСМА, подвергнутых длительной стимуляции. Индекс уничтожения определяли как обратную величину площади под кривой (AUC) для флуоресценции мишени с течением времени, и нормализовывали относительно контроля в виде носителя DMSO. Как показано на фиг. 13В, степень улучшения уничтожения клеток коррелировала с плотностью антигена ВСМА на клетках-мишенях (плотность антигена: RPMI-8226 < OPM2 < MM1.S).

Супернатант клеточной культуры собирали из сокультур через 24 ч после начала культивирования Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, и клеток-мишеней согласно эксперименту выше, или в сходном эксперименте, но в котором Т-клетки с CAR против ВСМА и клетки-мишени сокультивировали в соотношении Е:Т 1:1. Продуцирование TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2 в полученном супернатанте определяли с использованием анализа Luminex Multiplex Assay. При обоих соотношениях Е:Т присутствие GSI LY3039478 улучшало функцию длительно стимулированных Т-клеток, экспрессирующих CAR против ВСМА, в отношении продуцирования цитокинов (фиг. 13С). Степень улучшения продуцирования цитокинов также коррелировала с плотностью антигена ВСМА на клетках-мишенях.

Пример 7: Оценка продуцирования цитокинов Т-клетками с CAR против ВСМА в присутствии или в отсутствие ингибитора гамма-секретазы

Различные параметры, указывающие на функцию Т-клеток, оценивали после инкубации Т-клеток с CAR против ВСМА с использованием ВСМА-содержавших гранул в присутствии различных концентраций ингибитора гамма-секретазы, LY3039478, или носителя (DMSO). Супернатант собирали через 24 ч и продуцирование TNF-альфа, IFN-гамма и IL-2 определяли с использованием анализа Luminex Multiplex Assay. Результаты представлены на фиг. 14. Результаты согласовывались с заключением, что присутствие этого соединения GSI не влияло на продуцирование цитокинов, количество или жизнеспособность CAR⁺ Т-клеток.

Пример 8: Оценка поверхностной экспрессии ВСМА в клетках множественной миеломы у пациентов, которых лечили ингибитором гамма-секретазы

Трем людям, имеющим множественную миелому, вводили три дозы по 25 мг ингибитора гамма-секретазы (GSI) LY3039478 через рот. Абсолютную связывающую способность антитела (ABC) в отношении антигена созревающих В-клеток (ВСМА) на поверхности клеток множественной миеломы количественно определяли посредством проточной цитометрии, которую проводили на образцах аспиратов, полученных от каждого из пациентов до введения GSI и сразу после третьей пероральной дозы GSI. Наблюдалось в среднем 66-кратное повышение ABC ВСМА после введения GSI (фиг. 15А). Наблюдалось, что процент плазматитов в образцах пациентов, для которых было определено, что они имеют поддающуюся определению экспрессию поверхностного ВСМА, возрастал от 35% (среднее значение) до GSI до 98,4% (среднее значение) после трех пероральных доз (фиг. 15В).

Подразумевается, что объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описа-

ния и идей, приведенных в настоящем описании. Такие изменения можно применять на практике без отклонения от истинной сущности и объема изобретения, и предполагается, что они входят в объем настоящего изобретения.

Последовательности

SEQ ID NO.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	ОПИСАНИЕ
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнирная область IgG4) (а.к.) Homo sapiens
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGC CCT	спейсер (шарнирная область IgG4) (нт) Homo sapiens
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLK	Спейсер шарнирная область-CH3 Homo sapiens
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	Спейсер шарнирная область-CH2 Homo sapiens
5	RWPESPQAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATT RNTGRGGEEKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQ PLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKD AHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHNSGSQSQHS RLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALRE	IgD-шарнирная область- Fc Homo sapiens

	PAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSP PNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFW AWSVLRVPAPSPQATYTCVVSHEDSRLLNAS RSLEVS YVTDH	
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A, искусственная последовательность
7	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDL HILPVAFRGDSFHTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAV VSLNITSLGLRSLKEISDGDVHISGNKNLCYANTIN WKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALC SPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYAD AGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIA TGMV GALLLLLVVALGIGLFM	Искусственная последовательность tEGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 последовательности с номером доступа № P10747), Homo sapiens
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 последовательности с номером доступа № P10747), Homo sapiens
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 P10747) Homo sapiens
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAYRS	CD28 (LL на GG) Homo sapiens
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 Q07011.1)

		Homo sapiens
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	CD3-зета Homo sapiens
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	CD3-зета Homo sapiens
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	CD3-зета Homo sapiens
16	PGGG-(SGGG)5-P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин	Линкер
17	GSADDAKKDAKKDGKS	Линкер
18	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGR FAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
19	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLI HWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRITPRTFGGGT KLEIK	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
20	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGM NWVKQAPGKGFKMAWINTYTGESYFADDFKG RFAFSVETSATAYLQINNLKTEDTATYFCARGEI YYGYDGGFAYWGQGLTVSA	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
21	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVS WYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSG ADFTLTISSVAEDLAVYYCQHYSTPWFSGGT KLDIK	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
22	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIG	Варибельная область

	WVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGHV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARYSGS FDNWGQGLTVTVSS	тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
23	SYELTQPPSASGTPGQRVTM SCSTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADY YCAAWDGLNGLVFGG GTKLTVLG	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
24	EVQLVQSGAEMKKPGASLKL SCKASGYTFIDYYV YWMRQAPGQGLESMGWINPNSGGTNYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAMYYCARSQ RDGYMDYWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
25	QSALTQPASVSASPGQSI AISCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLM IYEDSKRPSGVS NRFGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADY YCSSNTRS TLVFGGGTKLTVLG	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
26	GGGGS	Linker
27	GGGS	Linker
28	GGGGSGGGSGGGGS	Linker
29	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Linker
30	SRGGGGSGGGSGGGGSLEMA	Linker
31	ESKYGPCPPCPAPPVAGPSV LFPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFQSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRLWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGK	Hinge-CH2-CH3 спейсер Homo sapiens
32	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGR IIPILGIANYAQKFQGRV TMTEDTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCARS GYS KSIVSYMDYWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
33	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTV SCSSSNIGSNVVF WYQQLPGTAPKLV IYRNNQRPSGVPDRFSVSKSG TSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGT GTKVTVLG	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА

34	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS GSYRWEDSWGQGLVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
35	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVF WYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLASVYVFG TGTKVTVLG	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
36	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDYY MHWVRQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQ DRITVTRDTSSNTGYMELRLRSDDTAVYYCARS PYSGVLDK WGQGLVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
37	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSNIGAGFDV HWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAITGLQA EADYYCQSYDSSLSGYVFG TGTKVTVLG	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
38	ASGGGGSGGRASGGGGG	Linker
39	MALPVTALLLPLALLHAARP	CD8a signal peptide
40	METDTLLLWVLLWVPGSTG	signal peptide
41	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAE MGA VFDI WGQGMVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
42	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELPEDFAVYYCQQRISWPFTFGGGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
43	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG TYLGGLWYFDLWGRGTLVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
44	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGLGLPLTFG	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA

	GGTKVEIK	
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSY MHWVRQAPGQGLEWMGIINPGGGSTSYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARES WPMDVWGQGTITVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
46	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYAAYPFTGGGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
47	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGISSSSY WGWIRQPPGKLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRT ISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGRGYA TSLAFDIWGQGTITVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
48	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRHVPPTFTGGGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
49	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSM NHWVRQAPGKLEWVSTISSSSSTIYYADSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSQE HLIFDYWGQGTITVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
50	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRFYYPWFTGGGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
51	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTD FWSGSPGLDYWGQGTITVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
52	DIQLTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQIYTFPFTFTGGGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
53	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI	Варибельная область

	SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARTPEY SSSIWHYYYGMDVWGQTTVTVSS	тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
54	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNN KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQAHTPPTF GGGKVEIK	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
55	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGP LQEPYDYGMDVWGQTTVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
56	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYASSTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQHHVWPLTFGGGTVK EIK	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
57	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRV TITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYY SHDMWSEDWGQGLTVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
58	LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRSSNIGSNVSN WYRQLPGAAPKLLIYSNNQRPPGVPVRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEATYYCATWDDNLNVHYVFG TGTKVTVLG	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
59	QVQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTDYSI NWVRQAPGQGLEWMGWINTETREPAYAYDFRG RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYS YAMDYWGQGLTVTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
60	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVGAHL IHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDAIIYYCLQSRIFPRTFGQGTK LEIK	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGM SWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRF TISRDNRSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGES	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА

	DVWVGQTTVTVSS	
62	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
63	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAM SWVRQAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPA HYYGGMDVWVGQTTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
64	DIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSFLAW YQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQGTKL EIK	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
65	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHG MSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGR FTISRDNRNNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGE SDVWVGQTTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
66	DIRLTQSPSPLSASVGDRVTITCQASEDINKFLNW YHQTPGKAPKLLIYDASTLQTGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDIGTYYCQYQYESLPLTFGGGTKVEI K	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGM SWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRF TISRDNRNNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGES DVWVGQTTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
68	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAW YQQKPGQAPRLLMYGASSRASGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSPPTFGQGTK VEIK	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
69	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSM NWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGR FAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLY SLDFWVGQGTALT VSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
70	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLI	Варибельная область

	YWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTPRTFGGGT KLEIK	легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
71	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYSMN WVKQAPGKGLKWMGRINTETGEPLYADDFKGRF AFSLETSASTAYLVINNLKNEDTATFFCSNDYLYS CDYWGQGTTLTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
72	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRASESVSVIGAH LIHWYQQKPGQPPELLIY LASNLETGVPARFSGSG SGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGT KLEIK	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
73	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSPDYI NWVRQAPGQGLEWMGWIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSINTAYMELSSLTSED TAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGTMTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
74	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGN TYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGV PDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFG QGKLEIK	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
75	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSPDYI NWVRQAPGQGLEWMGWIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGTMTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи (VH) антитела против ВСМА
76	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNGNT YLHWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSGV PDRFSGS GSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWTFG QGKLEIK	Вариабельная область легкой цепи (VL) антитела против ВСМА
77	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTLDYYAI GWFRQAPGKEREGVICISRSDGSTYYADSVKGRF TISRDN AKKTVY LQMISLKPEDTAA YYCAAGADC SGYLRDYEFRGQGTQVTVSS	sdAb против ВСМА
78	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGP SKP	спейсер CD28
79	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCN	TM CD8a

80	LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP	спейсер CD28 (укороченный)
81	PTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	Шарнирная область CD8a
82	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACD	Шарнирная область CD8a
83	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACD	Шарнирная область CD8a
84	DTGLYICKVELMYPYPYLGIGNGTQIYVIDPEPC PDS	Шарнирная область CTLA4
85	FLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVS	TM CTLA4
86	QIKESLRAELRVTERRAEVPHTAHPSPSPRPAGQFQ TLV	Шарнирная область PD- 1
87	VGVVGGLLGSLVLLVWLAVI	TM PD-1
88	GLAVSTISSFFPPGYQ	Шарнирная область Fc(гамма)RIIIa
89	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	Шарнирная область IgG1
90	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAE MGAVFEDIWGQGMVTVSSGSTSGSGKPGSGEGST KGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRISWPFTFGGGT KVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPG PSKPFVWLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR	CAR против BCMA

	EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	
91	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRISWPFTFGGGTKVEI KRGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARAEMGAVFDIWGQGMV TVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS KPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
92	QVQI.VFSGGGVVQPGRS.I.RI.SCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG TYLGGWLWYFDLWGRGTLVTVSSGSTSGSGKPGS GEGSTKGDIVMTQSPLSLPVTGP EPASISCRSSQSL LHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGL GLPLTFGGGKVEIKRAALDNEKSNGTIIHVKGK HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
93	DIVMTQSPLSLPVTGP EPASISCRSSQSLLSNGYN YLDWYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGV PDRFSGS SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGLGLPLTFG GGTKVEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVES	CAR против ВСМА

	GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGTYLGGL WYFDLWGRGTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSY MHWVRQAPGQGLEWMGIINPGGGSTSYAQKFQG RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARES WPMDVWGQGTITVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTK GEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGGT EFTLTISSLQSEDFAVYYCQYAAIPTFGGGTKVE IKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSR LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CAR против ВСМА
95	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQYAAIPTFGGGTKVEI KRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLE WMGIINPGGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDVAVYYCARESWPMDVWGQGTITV VSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK PFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE	CAR против ВСМА

	YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR	
96	QLLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYY WGWRQPPGKLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGRGYA TSLAFDIWGQTMVTVSSGSTSGSGKPGSGEGST KGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG TDFTLTISSEPEDFAVYYCQQRHVWPPTFGGGTK VEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGP SKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
97	FIVL.TQSPATI.SI.SPGERATI.SCRASQSVSSYLA.W YQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSEPEDFAVYYCQQRHVWPPTFGGGTKVE IKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLLQESGPGPLVKP SETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGKLEW IGSISYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLS VTAADTAVYYCARGRGYATSLAFDIWGQTMVTV VSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK PFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSR LLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKLEWVSTISSSSTIYYADSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSQE HLIFDYWGQGLTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTK	CAR против ВСМА

	<p>GEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLE WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGG TDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRFYYPWTFGGGK VEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQUALPPR</p>	
99	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRFYYPWTFGGGKVE IKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSTISSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGSQEHLIFDYWGQGTL VTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR SRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQUALPPR</p>	CAR против ВСМА
100	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTD FWSGSPGLDYWGQGTLLTVSSGSTSGSGKPGSG EGSTKGDILQTSPPSVSASVGDRTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQIYTFPFTFGG GKVEIKRAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPF PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG</p>	CAR против ВСМА

	RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR	
101	DIQLTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQIYTFPFTFGGGTKVEI KRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVESGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW VAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARTDFWGSPPGLDYWG QGTLVTVSSAAALDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
102	QVQI.VQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARTPEY SSSIWHYYYGMDVWQGTTVTVSSGSTSGSGKP GSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQFAHTPFTFGGGTKVEIKRAALDNEKSNGTIIH VKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLLVVGGLACYSL LVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
103	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNN KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS GSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQFAHTPFTF GGGKVEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQ	CAR против ВСМА

	SGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSY AISWVRQA PGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARTPEYSSSIWHY YYGMDVWGQGT TTVTVSSAAALDNEK SNGTIIHV KKGHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
104	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKGP LQEPYDYGMDVWGQGT TTVTVSSGSTSGSGKPG SGEGSTKGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ SVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAS TRATGIPARF SGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQHHVWPLT FGGGTKVEIKRAAALDNEK SNGTIIHVKKGHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW VR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
105	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYAS TRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISLQSEDFAVYYCQHHVWPLTFGGGTKV EIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVESGGGVV QPGRSLRLS CAASGTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVKGPLQEPYDYGMDV WGQGT TTVTVSSAAALDNEK SNGTIIHVKKGHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF WVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYA PPRDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL	CAR против ВСМА

	NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
106	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLMYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG SRGGGGSGGGGGGGGSSLEMAEVQLVQSGAEM KKPGASLKLCKASGYTFIDYYVYWMRQAPGQG LESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRRLSDDTAMYQCARSQRDGYMDYWGQ GTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKG KHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVGGVLACYLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
107	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGFDV HWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGYVFG TGTKVTVLGSRRGGGGGGGGSSLEMAQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTDYMH WVRQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQDR ITVTRDTSSNTGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPY SGVLDKWWGQTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNE KSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVGG VLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CAR против ВСМА
108	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSNLGLVFGG	CAR против ВСМА

	<p>GTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIPGSDTRYSPSFQGHVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGSFDN WGQGTTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTII HVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>	
109	<p>LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRSSNIGSNVSN WYRQLPGAAPKLLIYSNNQRPPGVPVRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEATYYCATWDDNLNVHYVFG TGTKVTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWV RQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYSHD MWSEDWGQGTTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMA LPPR</p>	CAR против ВСМА
110	<p>QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNYVF WYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDLSASYVFG TGTKVTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWV RQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGSYR WEDSWGQGTTLVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVL</p>	CAR против ВСМА

	ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP PR	
111	LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRSSNIGSNSVN WYRQLPGAAPKLLIYSNNQRPPGVPVRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEATYYCATWDDNLNVHYVFG TGTKVTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYSHD MWSEDWGQGLTVTVSSAAAPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS AEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QUALPPR	CAR против ВСМА
112	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGSNLGLVFGG GTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIYPGSDTRYSPSFQGHVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYARYSGSFDN WGQGLTVTVSSAAAPTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAG TCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAEPPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP	CAR против ВСМА

	R	
113	QAVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNYVF WYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLASVYVFG TGTKVTVLGSRRGGGGGGGGGGSSLEMAQVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSYGSYR WEDSWGQGTLVTVSSAAAPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRS AEPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	CAR против ВСМА
114	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGFDV HWYQQLPGTAPKLIJYGNNSNRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGYVFG TGTKVTVLGSRRGGGGGGGGGGSSLEMAQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMH WVRQAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQDR ITVTRDTSSNTGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPY SGVLDKWGQGTLVTVSSAAAPTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSAEPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDA LHMALPPR	CAR против ВСМА
115	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLMIEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGKLTVLG SRGGGGGGGGGGGGSSLEMAEVQLVQSGAEM	CAR против ВСМА

	KKP GASLKL SCKASGYTFIDYVYVW MRQAPGQG LESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQ GTLVTVSSAAAPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAEPPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
116	DIVLTQSPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLI HWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTPRTFGGGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELK KPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLK WMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAY LQINNLYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQTSV TVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
117	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIG AHL IHWYQQKPGQP KLLIYLASNLETGVPARFSGSGS GTDFTLTISLQAEDAIIYYCLQSRIFPRTFGQGTK LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKK PGASVKV SCKASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLE WMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFLDTSVSTAY LQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQTLV TVSSAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY	CAR против ВСМА

	NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
118	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIG AHL IHWYQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGS GTDFTLTISLQAEDAIIYYCLQSRIFPRTFGQGTK LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKK PGASVKVSCASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLE WMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFLDTSVSTAY LQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQGLV TVSSAAADTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIY VIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
119	DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESVSVIG AHL IHWYQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGS GTDFTLTISLQAEDAIIYYCLQSRIFPRTFGQGTK LEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVQSGSELKK PGASVKVSCASGYTFTDYSINWVRQAPGQGLE WMGWINTETREPAYAYDFRGRFVFLDTSVSTAY LQISSLKAEDTAVYYCARDYSYAMDYWGQGLV TVSSAAAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSP RPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVICS KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
120	EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFSYYM SWIRQAPGKLEWVSYISSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGD YTEDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQS	CAR против ВСМА

	<p>ALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVS YQPPGKAPKLIYDVNKRPSGVSNRFSKSGNT ATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGRSYVFGTGTK VTVLESKYGPPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKMFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPR</p>	
121	<p>EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAM SWFKQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVK GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAW SAPTDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGGGGSD IQMTQSPAFLSASVGDRVTVTCRASQGISNYLAW YQQKPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYGTE FSLTIDSLQPEDFATYYCQSYTSRQTFGPGTRLDI KESKYGPPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKMFVWLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ</p>	CAR против BCMA

	ALPPR	
122	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGP PSFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGSSY VLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHWYQ QKPGQAPMLVVYDDDDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRDHVYVFGTGTK LTVLESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGLKMFVWL VVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPSEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQUALPPR</p>	CAR против ВСМА
123	<p>SYELTQPPSASGTPGQRVTMCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDGLNGLVFGG GTKLTVLGSRRGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLMAEVQL VQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIYPGDS DTRYSPSFQGHVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYSGSFDN WGQGLVTVSSESKYPPCPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGL</p>	CAR против ВСМА

	GVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKMF WVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQUALPPR	
126	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALS NHGM SWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRF TISRDNRSNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGES DVWGQGT TVTVSSASGGGGSGGRASGGGSDIQ LTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIKT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
127	QVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFSNYAM SWVRQAPGKGLGWVSGISRSGENTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARSPA HYYGGMDVWGQGT TVTVSSASGGGGSGGRASG GGGSDIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSISS FLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGS GSGTDFLTISRLEPEDSAVYYCQYHSSPSWTFG QGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACP AAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS	CAR против ВСМА

	CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
128	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHG MSWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGR FTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGE SDVWQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDI RLTQSPSPLSASVGDRVTITCQASEDINKFLNWYH QTPGKAPKLLIYDASTLQTVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLQPEDIGTYCQYQYESLPLTFGGGTKVEIKT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
129	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGM SWVRRAPGKGLEWVSGIVYSGSTYYAASVKGRF TISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCSAHGGES DVWQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIV LTQSPGTLSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQ QKPGQAPRLLMYGASSRASGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQYAGSPPFTFGQGTKVEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
130	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGM NWVKQAPGKGFKWMWAWINTYTGESYFADDFKG RFAFSVETSATTAYLQINNLTEDTATYFCARGEI	CAR против ВСМА

	YYGYDGGFAYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSG GGGSDVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDV NTAWSWYQQKPGQSPKLLIFSASYRYTGVPRFT GSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWT FGGGTGLDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
131	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGR FAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQI LVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWV KRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAF SLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSYAM DYWGQGTSTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
132	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSIN WVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGR FAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV LTQSPASLAMS LGKRATISCRASESVSVIGAHLIH WYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFSGSGSG TDFLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRTFGGGTKL EIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF	CAR против ВСМА

	EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY QGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
133	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSM NWKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGR FAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLY SLDFWQGTALTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVL TQSPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWY QQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDF TLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTPRTFGGGTKLEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPREE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
134	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYSMN WVKQAPGKGLKWMGRINTETGEPLYADDFKGRF AFSLETSASTAYLVINNLKNEDTATFFCSNDYLYS CDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVL TQSPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWY QQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDF TLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTPRTFGGGTKLEI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPREE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
135	DIVLTQSPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLI HWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTPRTFGGGT	CAR против ВСМА

	<p>KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELK KPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLK WMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAY LQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSV TVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMPR RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR</p>	
136	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFPDYI NWVRQAPGQGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNG NTYLHWYQLKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTF GQGTKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</p>	CAR против ВСМА
137	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFPDYI NWVRQAPGQGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNG NTYLHWYQLKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTF GQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLL SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG</p>	CAR против ВСМА

	CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	
138	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPDYI NWVRQAPGQGLEWMGWIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDVAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNG NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTF GQGTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMIARTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR	CAR против ВСМА
139	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPDYI NWVRQAPGQGLEWMGWIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDVAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNG NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWT FGQGTKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG	CAR против ВСМА

	GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
140	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPDYI NWVVRQAPGQGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNG NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWT FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CAR против ВСМА
141	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSPDYI NWVVRQAPGQGLEWMGWYIFASGNSEYNQKFTG RVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCASLY DYDWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSDIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLVHSNG NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGADFTLKISRVEAEDVGVYYCAETSHVPWT FGQGTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKD	CAR против ВСМА

	TYDALHMQALPPR	
142	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	CD8a TM
143	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8a TM
144	RAAA	Линкерный пептид
145	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGD YTEDYWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
146	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSSDVGKYNLVS WYQQPPGKAPKLIYDVNKRPSGVSNRFSGSKSG NTATLTISGLQGDDEADYYCSSYGGRSYVFGTG TKVTVL	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
147	EVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAM SWFRQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEYAASVK GRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCAAW SAPTDYWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
148	DIQMTQSPAFLSASVGDRTVTTCRASQGISNYLA WYQQKPGNAPRLLIYSASTLQSGVPSRFRGTGYG TEFSLTIDSLQPEDFATYYCQSYTSRQTFGPGTR LDIK	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
149	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDGP PSFDIWGQGMVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
150	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGANNIGSKSVHW YQQKPGQAPMLVYDDDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISGVEAGDEADYFCHLWDRSRDHVYVFGTG TKLTVL	Варибельная область легкой цепи (VL) антитела против BCMA
151	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRV TMTEDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCARSGYS KSIVSYMDYWGQGLTVTVSS	Варибельная область тяжелой цепи (VH) антитела против BCMA
152	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSNIGSNVVF WYQQLPGTAPKLVYRNNQRPSGVPDRFSVSKSG	Варибельная область легкой цепи (VL)

	TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGT GTKVTVLG	антитела против BCMA
153	MPLLLLLPLWAGALA	Сигнальный пептид CD33
154	MALPVTALLLPLALLHA	Сигнальный пептид CD8-альфа
155	atgcttctctggtgacaagcctctgctctgtgagttaccacaccagcattct cctgatccca	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
156	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Сигнальная последовательность альфа-цепи GMCSFR
157	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
158	X1PPX2P X1 is glycine, cysteine or arginine X2 is cysteine or threonine	Иллюстративная шарнирная область IgG
159	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
160	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
161	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	Иллюстративная шарнирная область IgG
162	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
163	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
164	1. Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
165	2. Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Иллюстративная шарнирная область IgG
166	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKD SLSINATNIKHFKNCTISISGLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH	Искусственная последовательность tEGFR

	AFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLK EISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTK IISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDC VSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQC HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCV KTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNC TYGCTGPGLEGCPNTNGPKPSIATGMVGAALLLV VALGIGLFM	
167	EGRGSLLTCGDVEENPGP	Искусственная последовательность T2A
168	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
169	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
170	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
171	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
172	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPP LTCQRYCNASVTNSVKGTVNAGGGGSPKSSDKTH TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Слитый полипептид BCMA-Fc
173	DYYVY	CDR-H1
174	WINPNSGGTNYAQKFQG	CDR-H2
175	SQRDGYMDY	CDR-H3
176	GYTFIDY	CDR-H1
177	NPNSGG	CDR-H2
178	GYTFIDYVY	CDR-H1
179	WINPNSGGTN	CDR-H2
180	GYTFIDYY	CDR-H1
181	INPNSGGT	CDR-H2
182	ARSQRDGYMDY	CDR-H3
183	TGTSSDVG	CDR-L1
184	EDSKRPS	CDR-L2
185	SSNTRSSTLV	CDR-L3
186	ISCTGTSSD	CDR-L1
187	EDS	CDR-L2
188	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQH PGKAPKLMIEDSKRPSGVSNRFGSKSGNTASLT ISGLQAEDEADYYCSSNTRSSTLVFGGGKLTVL GSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVQSGAE MKKPGASLKLKCKASGYTFIDYVYVWVRQAPGQ GLESMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWG QGTLVTVSS	scFv против BCMA

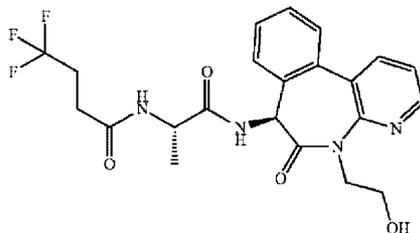
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли, причем способ включает

(a) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, экспрессирующую антиген созревания В-клеток (BCMA), причем указанная клеточная терапия представляет собой Т-клеточную терапию, включающую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с BCMA; и

(b) после проведения (a) введение индивидууму соединения, имеющего структуру:

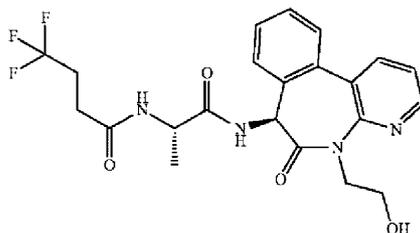
Соединение I



или его стереоизомера, или фармацевтически приемлемой соли, или гидрата любого из вышеуказанных.

2. Способ лечения злокачественной опухоли, причем способ включает введение соединения индивидууму, имеющему злокачественную опухоль, экспрессирующую антиген созревания В-клеток (BCMA), где на момент начала введения индивидууму ранее проводили лечение клеточной терапией, причем указанная клеточная терапия представляет собой Т-клеточную терапию, включающую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с BCMA, и где соединение представляет собой соединение, имеющее структуру:

Соединение I



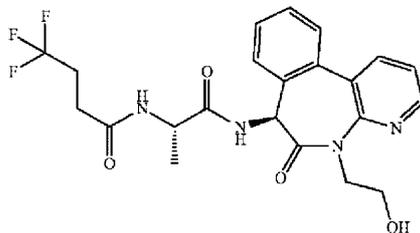
или его стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль, или гидрат любого из вышеуказанных.

3. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий:

(a) проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, экспрессирующую антиген созревания В-клеток (BCMA), причем указанная клеточная терапия представляет собой Т-клеточную терапию, включающую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с BCMA; и

(b) введение индивидууму соединения структуры:

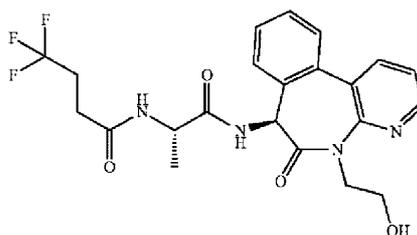
Соединение I



или его стереоизомера, или фармацевтически приемлемой соли, или гидрата любого из вышеуказанных.

4. Способ лечения злокачественной опухоли, причем способ включает проведение клеточной терапии у индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, экспрессирующую антиген созревания В-клеток (BCMA), причем указанная клеточная терапия представляет собой Т-клеточную терапию, включающую дозу Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, где рекомбинантный рецептор специфически связывается с BCMA, и где на момент начала проведения клеточной терапии индивидууму ранее проводили и/или проводят лечение соединением, имеющим структуру:

Соединение I



или его стереоизомером, или фармацевтически приемлемой солью, или гидратом любого из вышеуказанных.

5. Способ по п.3, где начало введения соединения происходит до, одновременно или после начала проведения клеточной терапии.

6. Способ по п.4 или 5, где соединение вводят до начала проведения клеточной терапии, необязательно, в пределах или приблизительно в пределах 1 ч, 2 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч или 1 недели до начала проведения клеточной терапии.

7. Способ по любому из пп.1-6, где:

рекомбинантный рецептор специфически связывается с ВСМА, ассоциированным со злокачественной опухолью, экспрессирующей ВСМА, или

рекомбинантный рецептор специфически связывается или нацелен на ВСМА, ассоциированный со злокачественной опухолью, экспрессирующей ВСМА, и соединение ингибирует расщепление ВСМА и/или ингибирует высвобождение ВСМА с поверхности клетки, или

соединение способно ингибировать или ингибирует активность или функцию гамма-секретазы.

8. Способ по любому из пп.1-7, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена.

9. Способ по любому из пп.1-8, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят перорально.

10. Способ по любому из пп.1-9, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят по меньшей мере или вводят ровно шесть раз в сутки, пять раз в сутки, четыре раза в сутки, три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, раз в двое суток, три раза в неделю, по меньшей мере один раз в неделю, два раза в неделю или только один раз.

11. Способ по любому из пп.1-10, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят один раз в двое суток.

12. Способ по любому из пп.1-11, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят не более одного раза в сутки.

13. Способ по любому из пп.1-10, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят три раза в неделю.

14. Способ по любому из пп.1-3, 5 и 7-13, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят на 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 и 18 сутки после начала введения клеточной терапии.

15. Способ по любому из пп.1-14, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят в количестве от 1,0 мг до 100 мг, от 1,0 мг до 50 мг, от 1,0 мг до 25 мг, от 1,0 мг до 10 мг, от 1,0 мг до 5,0 мг, от 5,0 мг до 100 мг, от 5,0 мг до 50 мг, от 5,0 мг до 25 мг, от 5,0 мг до 10 мг, от 10 мг до 100 мг, от 10 мг до 50 мг, от 10 мг до 25 мг, от 25 мг до 100 мг, от 2 5 мг до 50 мг.

16. Способ по любому из пп.1-15, где соединение, стереоизомер, фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят в количестве, составляющем ровно или приблизительно 25 мг, или в количестве, составляющем ровно или приблизительно 50 мг.

17. Способ по любому из пп.1-16, где злокачественная опухоль, экспрессирующая антиген созревания В-клеток (ВСМА), представляет собой множественную миелому, плазмацитому, злокачественную опухоль, происходящую из плазмацитов, и/или злокачественную опухоль, происходящую из В-клеток.

18. Способ по любому из пп.1-17, где злокачественная опухоль, экспрессирующая антиген созревания В-клеток (ВСМА), представляет собой рецидивирующую или рефрактерную злокачественную опухоль, необязательно рецидивирующую или рефрактерную к лечению множественную миелому.

19. Способ по любому из пп.1-18, где способ дополнительно включает, перед указанным проведением указанной клеточной терапии, выбор индивидуума для указанного введения, имеющего злокачественную опухоль, которая или клетки которой (i) экспрессируют CD138, поверхностный CD38 или поверхностный маркер плазмацитов или происходят из плазмацитов и, необязательно, (ii) имеют низкую экспрессию поверхностного антигена созревания В-клеток (ВСМА) и/или уровень экспрессии поверхностного ВСМА ниже порогового уровня.

20. Способ по любому из пп.1-19, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, содержащий:

область V_H, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и область V_L, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно;

область V_H, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176, 177 и 175, соответственно, и область V_L, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно;

область V_H, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, 179 и 175, соответственно, и область V_L, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно; или

область V_H, содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, 181 и 182, соответственно, и область V_L, содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 186, 187 и 185, соответственно.

21. Способ по любому из пп.1-20, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА, где антигенсвязывающий домен содержит:

- (a) V_H, представленную SEQ ID NO: 18, и V_L, представленную SEQ ID NO: 19;
- (b) V_H, представленную SEQ ID NO: 20, и V_L, представленную SEQ ID NO: 21;
- (c) V_H, представленную SEQ ID NO: 22, и V_L, представленную SEQ ID NO: 23;
- (d) V_H, представленную SEQ ID NO: 24, и V_L, представленную SEQ ID NO: 25;
- (e) V_H, представленную SEQ ID NO: 32, и V_L, представленную SEQ ID NO: 33;
- (f) V_H, представленную SEQ ID NO: 34, и V_L, представленную SEQ ID NO: 35;
- (g) V_H, представленную SEQ ID NO: 36, и V_L, представленную SEQ ID NO: 37;
- (h) V_H, представленную SEQ ID NO: 41, и V_L, представленную SEQ ID NO: 42;
- (i) V_H, представленную SEQ ID NO: 43, и V_L, представленную SEQ ID NO: 44;
- (j) V_H, представленную SEQ ID NO: 45, и V_L, представленную SEQ ID NO: 46;
- (k) V_H, представленную SEQ ID NO: 47, и V_L, представленную SEQ ID NO: 48;
- (l) V_H, представленную SEQ ID NO: 49, и V_L, представленную SEQ ID NO: 50;
- (m) V_H, представленную SEQ ID NO: 51, и V_L, представленную SEQ ID NO: 52;
- (n) V_H, представленную SEQ ID NO: 53, и V_L, представленную SEQ ID NO: 54;
- (o) V_H, представленную SEQ ID NO: 55, и V_L, представленную SEQ ID NO: 56;
- (p) V_H, представленную SEQ ID NO: 57, и V_L, представленную SEQ ID NO: 58;
- (q) V_H, представленную SEQ ID NO: 59, и V_L, представленную SEQ ID NO: 60;
- (r) V_H, представленную SEQ ID NO: 61, и V_L, представленную SEQ ID NO: 62;
- (s) V_H, представленную SEQ ID NO: 63, и V_L, представленную SEQ ID NO: 64;
- (t) V_H, представленную SEQ ID NO: 65, и V_L, представленную SEQ ID NO: 66;
- (u) V_H, представленную SEQ ID NO: 67, и V_L, представленную SEQ ID NO: 68;
- (v) V_H, представленную SEQ ID NO: 69, и V_L, представленную SEQ ID NO: 70;
- (w) V_H, представленную SEQ ID NO: 71, и V_L, представленную SEQ ID NO: 72;
- (x) V_H, представленную SEQ ID NO: 73, и V_L, представленную SEQ ID NO: 74;
- (y) V_H, представленную SEQ ID NO: 75, и V_L, представленную SEQ ID NO: 76;
- (z) V_H, представленную SEQ ID NO: 145, и V_L, представленную SEQ ID NO: 146;
- (aa) V_H, представленную SEQ ID NO: 147, и V_L, представленную SEQ ID NO: 148;
- (bb) V_H, представленную SEQ ID NO: 149, и V_L, представленную SEQ ID NO: 150; или
- (cc) V_H, представленную SEQ ID NO: 151, и V_L, представленную SEQ ID NO: 152.

22. Способ по любому из пп.1-21, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, содержащий:

область V_H, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 24; и

область V_L, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 25.

23. Способ по любому из пп.1-21, где рекомбинантный рецептор антигена содержит антигенсвязывающий домен, содержащий:

область V_H, содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или прибли-

зительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 18; и

область V_L , содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 19.

24. Способ по любому из пп.1-23, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, содержащий scFv, содержащий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 188, или последовательность аминокислот, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или приблизительно 91%, ровно или приблизительно 92%, ровно или приблизительно 93%, ровно или приблизительно 94%, ровно или приблизительно 95%, ровно или приблизительно 96%, ровно или приблизительно 97%, ровно или приблизительно 98%, или ровно или приблизительно 99% идентичностью с SEQ ID NO: 188.

25. Способ по любому из пп.1-24, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 90-141, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 90-141.

26. Способ по любому из пп.1-25, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 116, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 116.

27. Способ по любому из пп.1-25, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 124, или аминокислотную последовательность, которая проявляет, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 124.

28. Способ по любому из пп.20-27, где антигенсвязывающий домен или химерный рецептор антигена специфически связывает ВСМА, где ВСМА представляет собой ВСМА человека.

29. Способ по любому из пп.1-28, где Т-клетки являются CD4+ и/или CD8+.

30. Способ по любому из пп.1-29, где:

клеточная терапия включает ровно или приблизительно от 50×10^6 до 450×10^6 общих Т-клеток, ровно или приблизительно от 150×10^6 до 450×10^6 общих Т-клеток, ровно или приблизительно от 250×10^6 до 450×10^6 общих Т-клеток, ровно или приблизительно от 350×10^6 до 450×10^6 общих Т-клеток, в каждом случае включительно; или

клеточная терапия включает ровно или приблизительно от $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих Т-клеток до $1,2 \times 10^9$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, ровно или приблизительно от $5,0 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих Т-клеток до $4,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, ровно или приблизительно от $1,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток до $3,0 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих Т-клеток, в каждом случае включительно.

31. Способ по любому из пп.1-30, где способ дополнительно включает проведение химиотерапии с лимфодеплецией перед проведением клеточной терапии, и/или где индивидууму проводили химиотерапию с лимфодеплецией перед введением клеток.

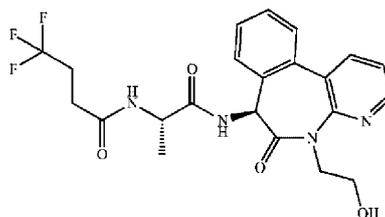
32. Способ по п.31, где химиотерапия с лимфодеплецией включает введение индивидууму флударабина и/или циклофосфида.

33. Комбинация для лечения рака, содержащая:

(а) Т-клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, причем рекомбинантный рецептор специфически связывается с ВСМА; и

(b) соединение, имеющее структуру:

Соединение I



или его стереоизомер, или фармацевтически приемлемую соль, или гидрат любого из вышеуказанных.

34. Комбинация по п.33, где соединение ингибирует или снижает или способно ингибировать или снижать внутримембранное расщепление ВСМА.

35. Комбинация по п.33 или 34, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR).

36. Комбинация по любому из пп.33-35, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, содержащий:

область V_H , содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и область V_L , содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно;

область V_H , содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176, 177 и 175, соответственно, и область V_L , содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно;

область V_H , содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 178, 179 и 175, соответственно, и область V_L , содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183, 184 и 185, соответственно.

37. Комбинация по любому из пп.33-36, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает ВСМА, где антигенсвязывающий домен содержит:

(a) V_H , представленную SEQ ID NO: 18, и V_L , представленную SEQ ID NO: 19;

(b) V_H , представленную SEQ ID NO: 20, и V_L , представленную SEQ ID NO: 21;

(c) V_H , представленную SEQ ID NO: 22, и V_L , представленную SEQ ID NO: 23;

(d) V_H , представленную SEQ ID NO: 24, и V_L , представленную SEQ ID NO: 25;

(e) V_H , представленную SEQ ID NO: 32, и V_L , представленную SEQ ID NO: 33;

(f) V_H , представленную SEQ ID NO: 34, и V_L , представленную SEQ ID NO: 35;

(g) V_H , представленную SEQ ID NO: 36, и V_L , представленную SEQ ID NO: 37;

(h) V_H , представленную SEQ ID NO: 41, и V_L , представленную SEQ ID NO: 42;

(i) V_H , представленную SEQ ID NO: 43, и V_L , представленную SEQ ID NO: 44;

(j) V_H , представленную SEQ ID NO: 45, и V_L , представленную SEQ ID NO: 46;

(k) V_H , представленную SEQ ID NO: 47, и V_L , представленную SEQ ID NO: 48;

(l) V_H , представленную SEQ ID NO: 49, и V_L , представленную SEQ ID NO: 50;

(m) V_H , представленную SEQ ID NO: 51, и V_L , представленную SEQ ID NO: 52;

(n) V_H , представленную SEQ ID NO: 53, и V_L , представленную SEQ ID NO: 54;

(o) V_H , представленную SEQ ID NO: 55, и V_L , представленную SEQ ID NO: 56;

(p) V_H , представленную SEQ ID NO: 57, и V_L , представленную SEQ ID NO: 58;

(q) V_H , представленную SEQ ID NO: 59, и V_L , представленную SEQ ID NO: 60;

(r) V_H , представленную SEQ ID NO: 61, и V_L , представленную SEQ ID NO: 62;

(s) V_H , представленную SEQ ID NO: 63, и V_L , представленную SEQ ID NO: 64;

(t) V_H , представленную SEQ ID NO: 65, и V_L , представленную SEQ ID NO: 66;

(u) V_H , представленную SEQ ID NO: 67, и V_L , представленную SEQ ID NO: 68;

(v) V_H , представленную SEQ ID NO: 69, и V_L , представленную SEQ ID NO: 70;

(w) V_H , представленную SEQ ID NO: 71, и V_L , представленную SEQ ID NO: 72;

(x) V_H , представленную SEQ ID NO: 73, и V_L , представленную SEQ ID NO: 74;

(y) V_H , представленную SEQ ID NO: 75, и V_L , представленную SEQ ID NO: 76;

(z) V_H , представленную SEQ ID NO: 145, и V_L , представленную SEQ ID NO: 146;

(aa) V_H , представленную SEQ ID NO: 147, и V_L , представленную SEQ ID NO: 148;

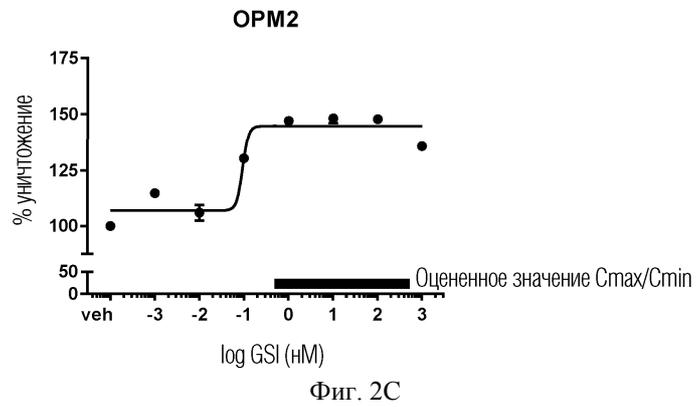
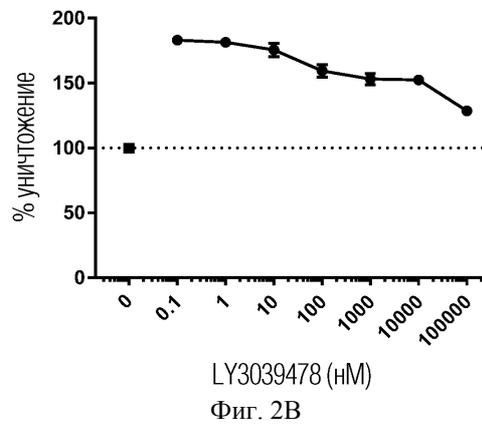
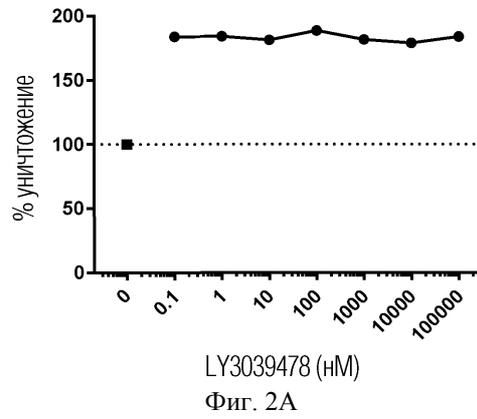
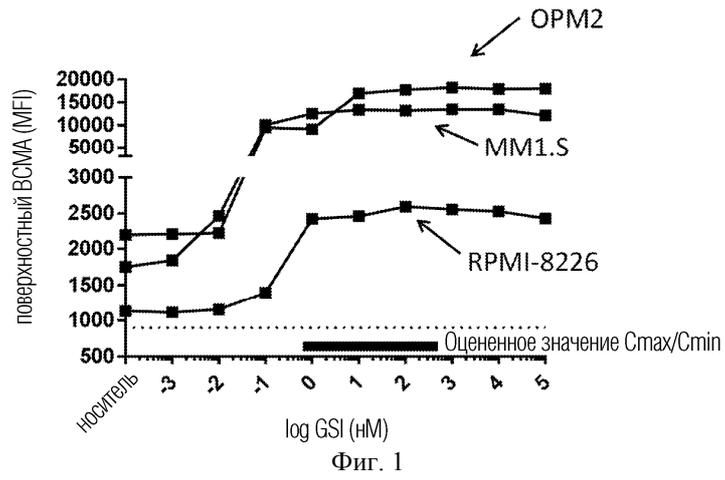
(bb) V_H , представленную SEQ ID NO: 149, и V_L , представленную SEQ ID NO: 150; или

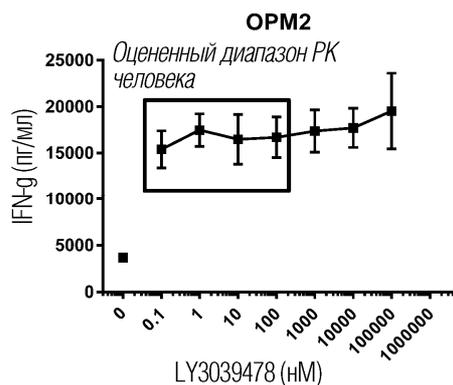
(cc) V_H , представленную SEQ ID NO: 151, и V_L , представленную SEQ ID NO: 152.

38. Комбинация по любому из пп.33-37, где рекомбинантный рецептор представляет собой химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий домен, содержащий:

область V_H , содержащую последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере ровно или приблизительно 90%, ровно или прибли-

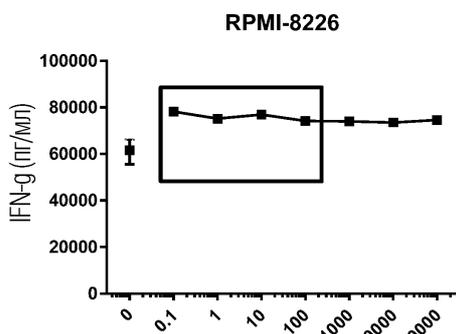
047040





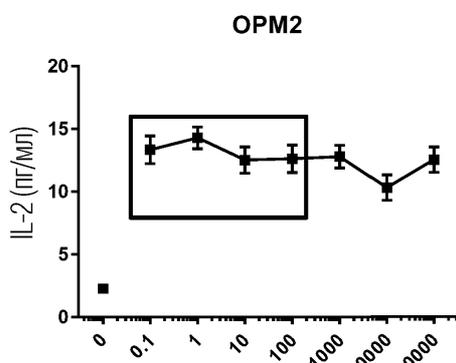
LY3039478 (нМ)

Фиг. 3А



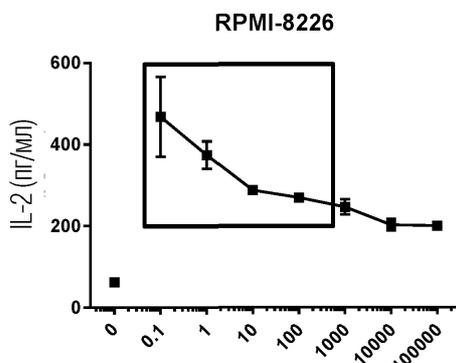
LY3039478 (нМ)

Фиг. 3В



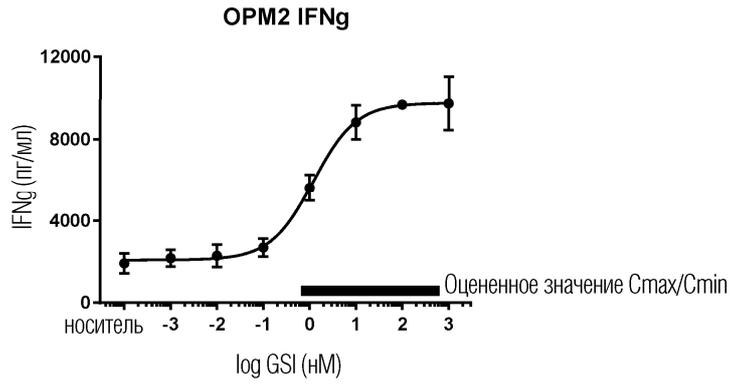
LY3039478 (нМ)

Фиг. 3С



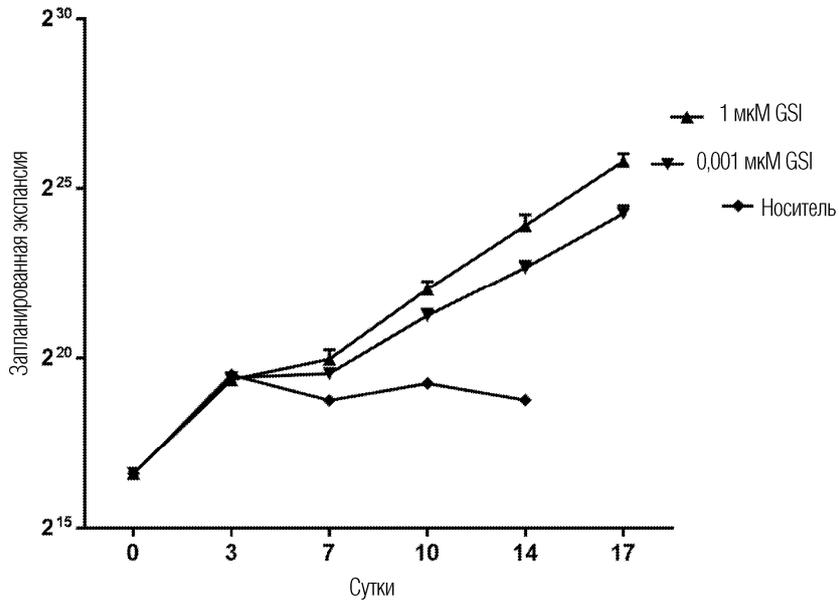
LY3039478 (нМ)

Фиг. 3D



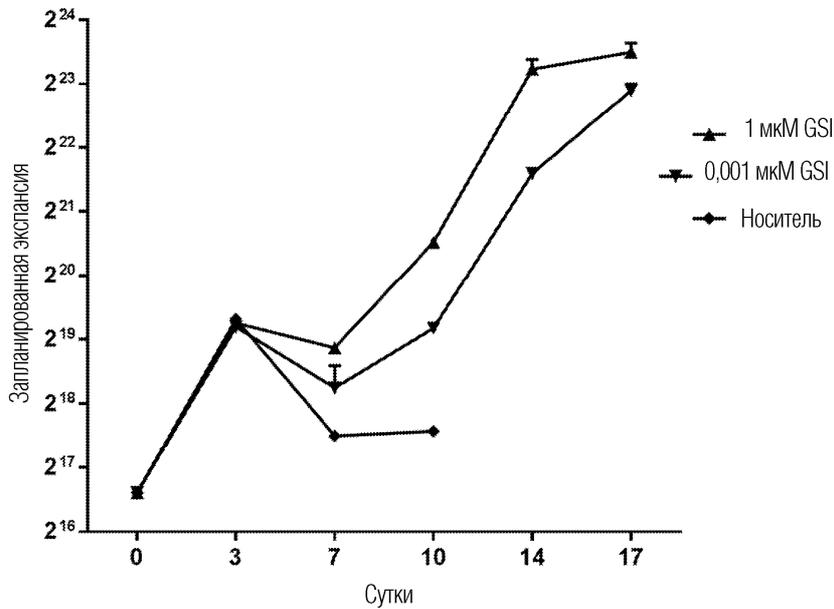
Фиг. 3Е

Здоровый донор

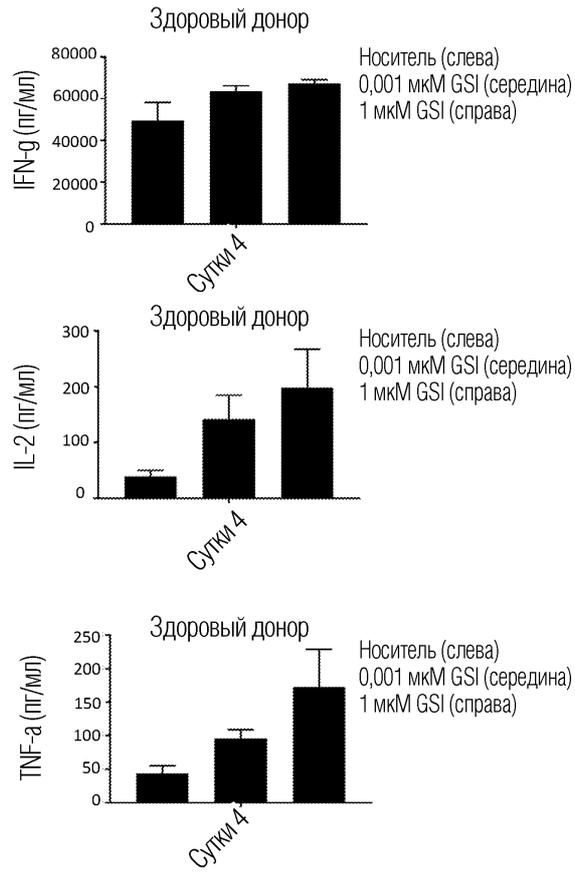


Фиг. 4А

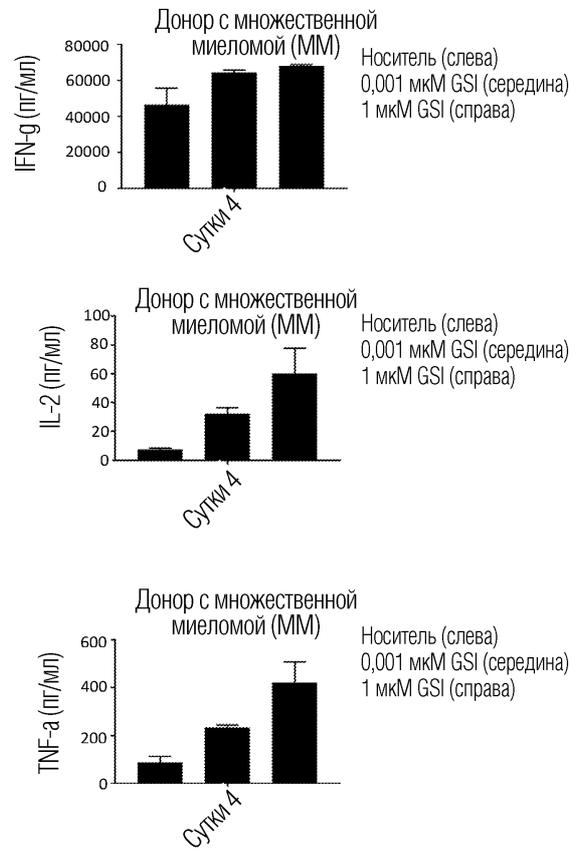
Донор с множественной миеломой (ММ)



Фиг. 4В

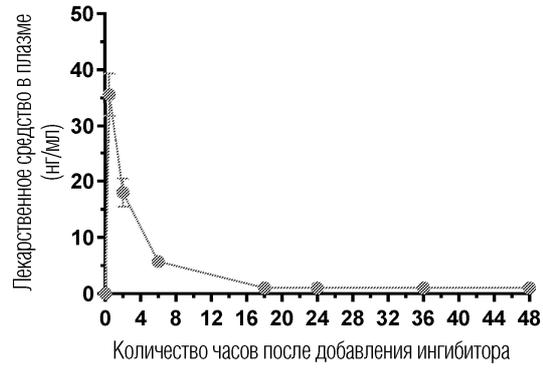


Фиг. 5А

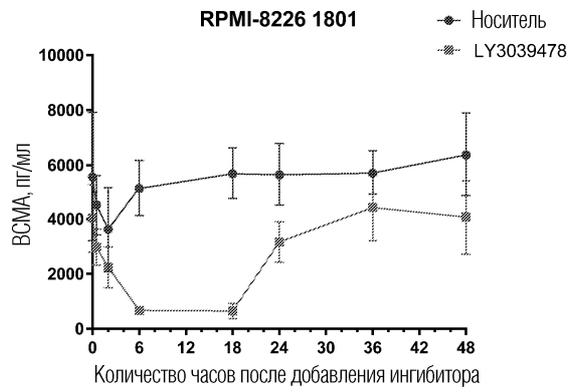


Фиг. 5В

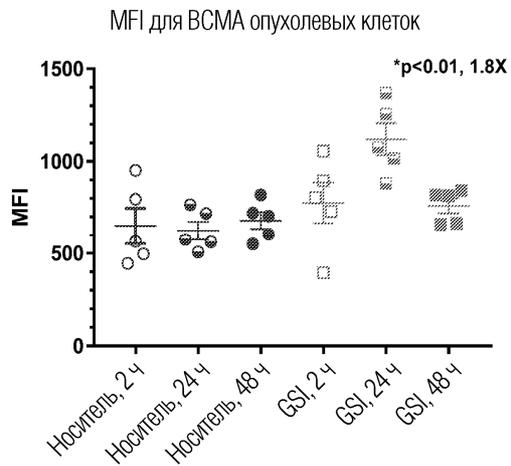
Уровень лекарственного средства LY3039478 в плазме:
Самки мышей NSG, однократная п/о доза



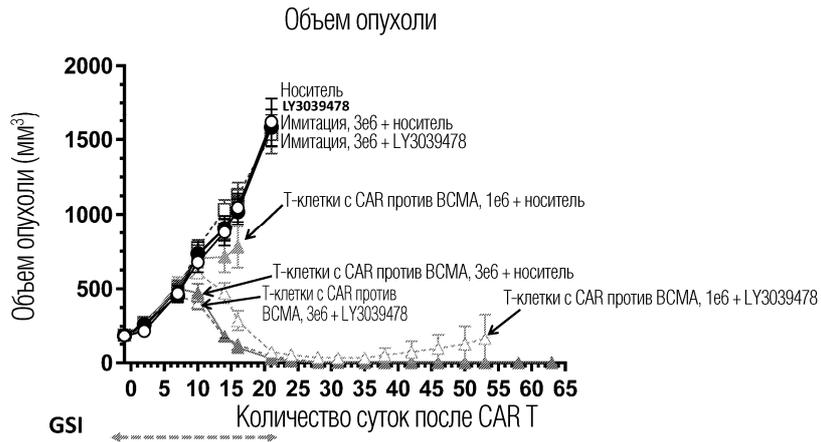
Фиг. 6



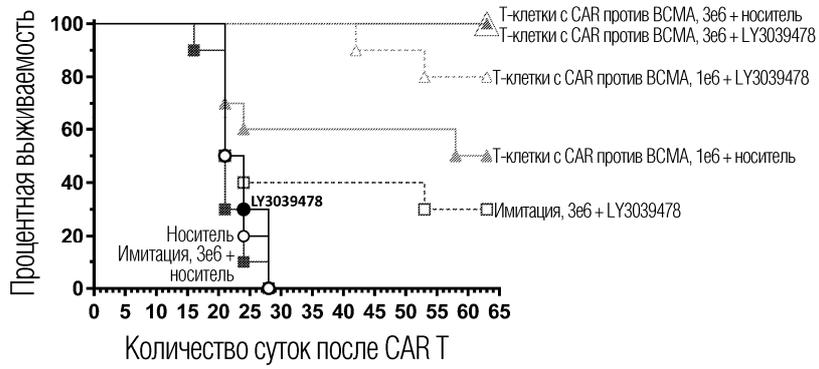
Фиг. 7



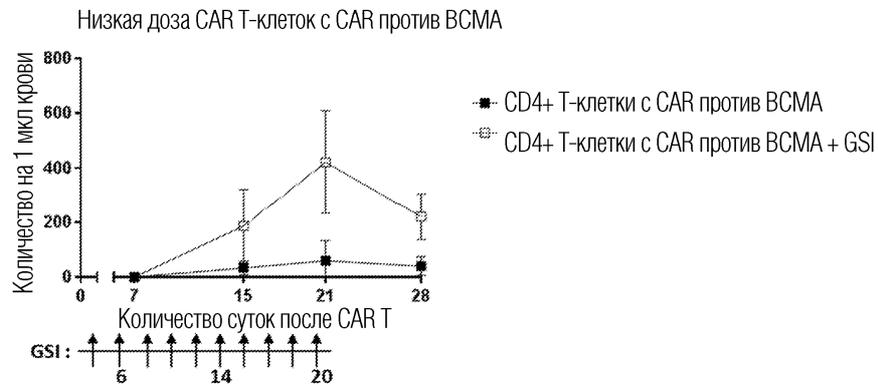
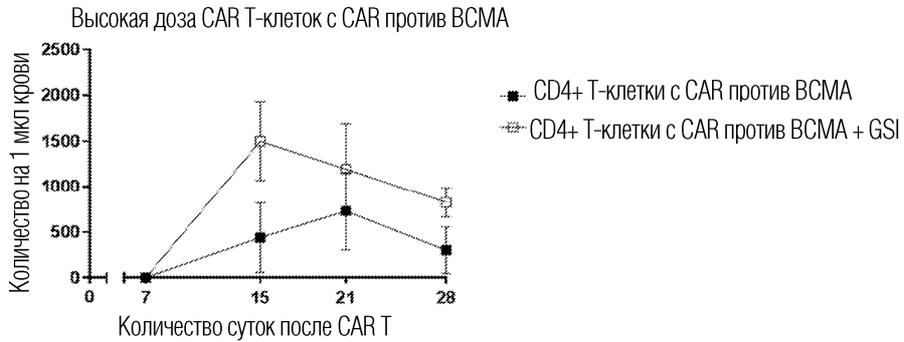
Фиг. 8



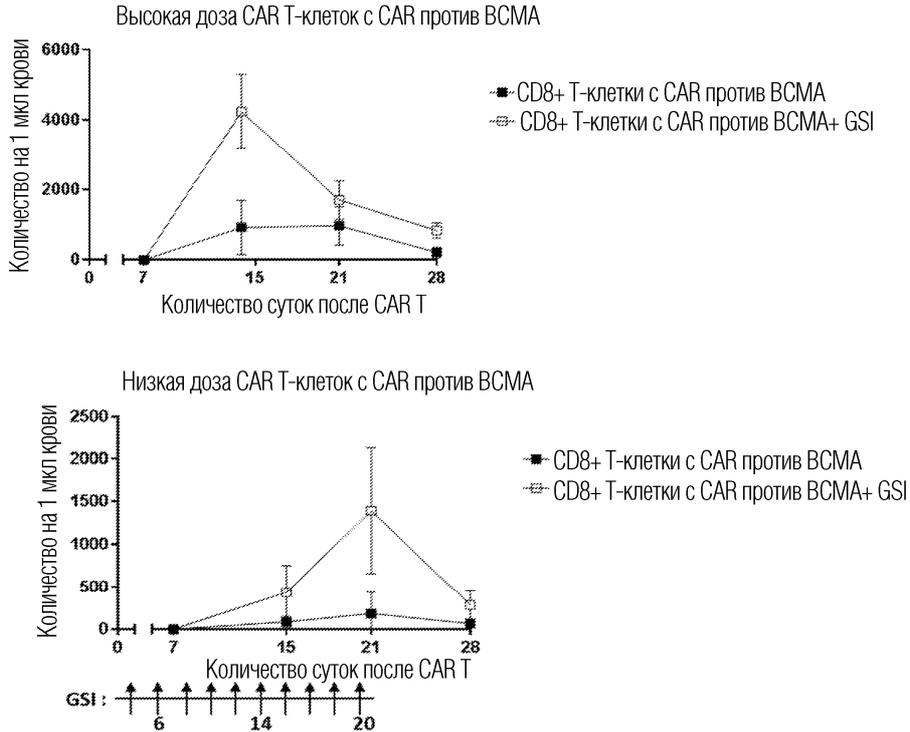
Фиг. 9А



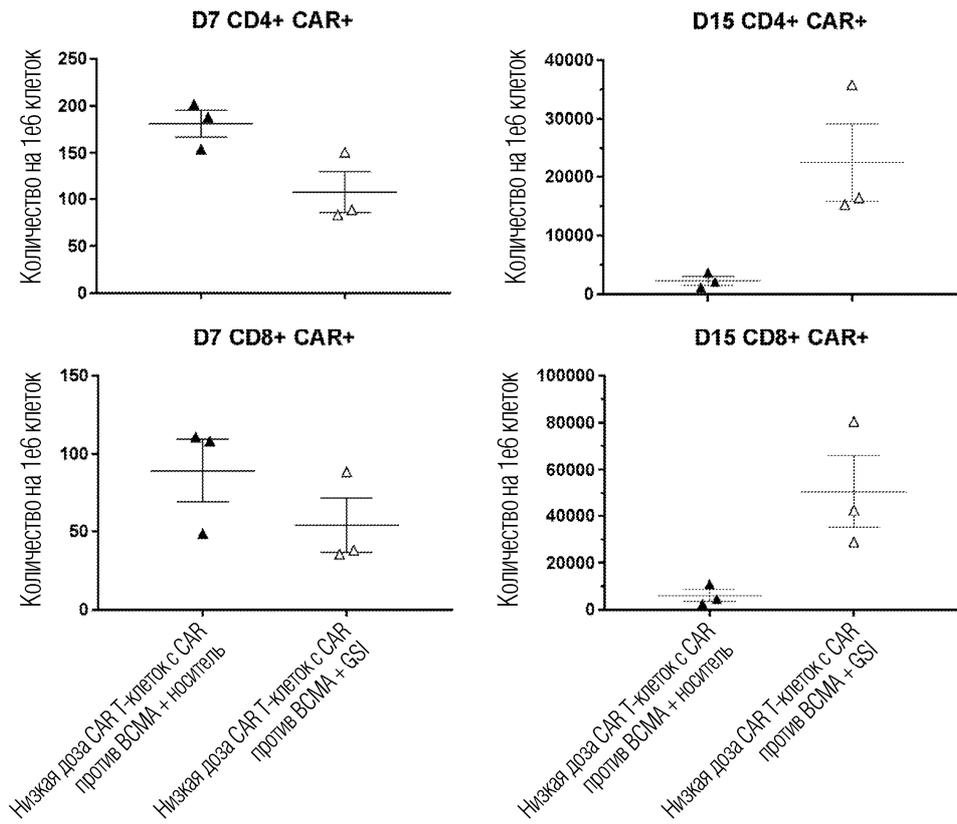
Фиг. 9В



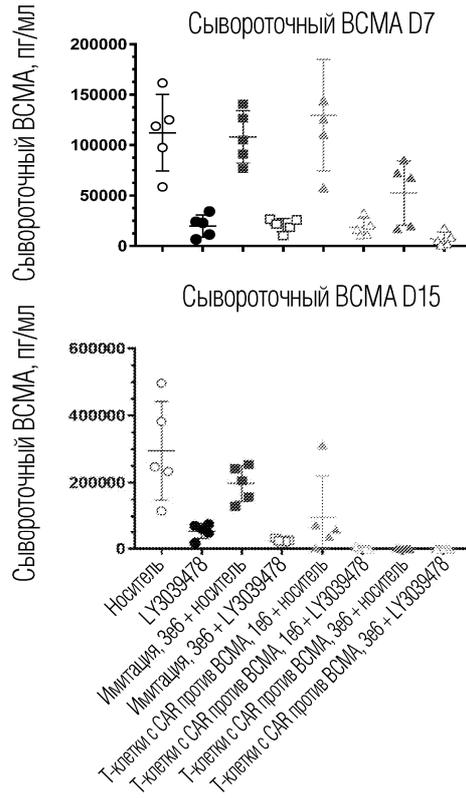
Фиг. 10А



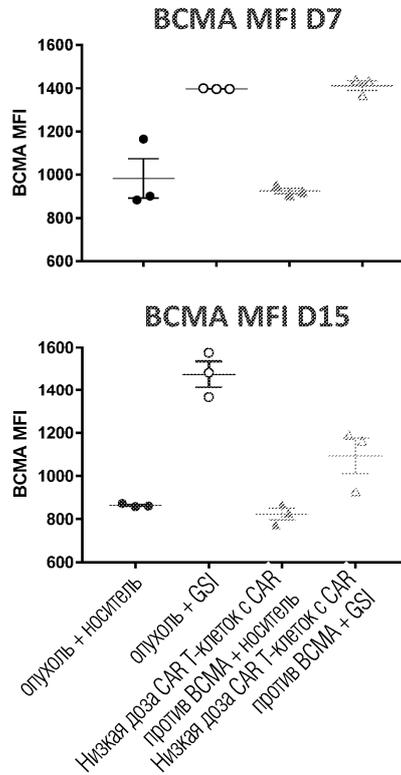
Фиг. 10В



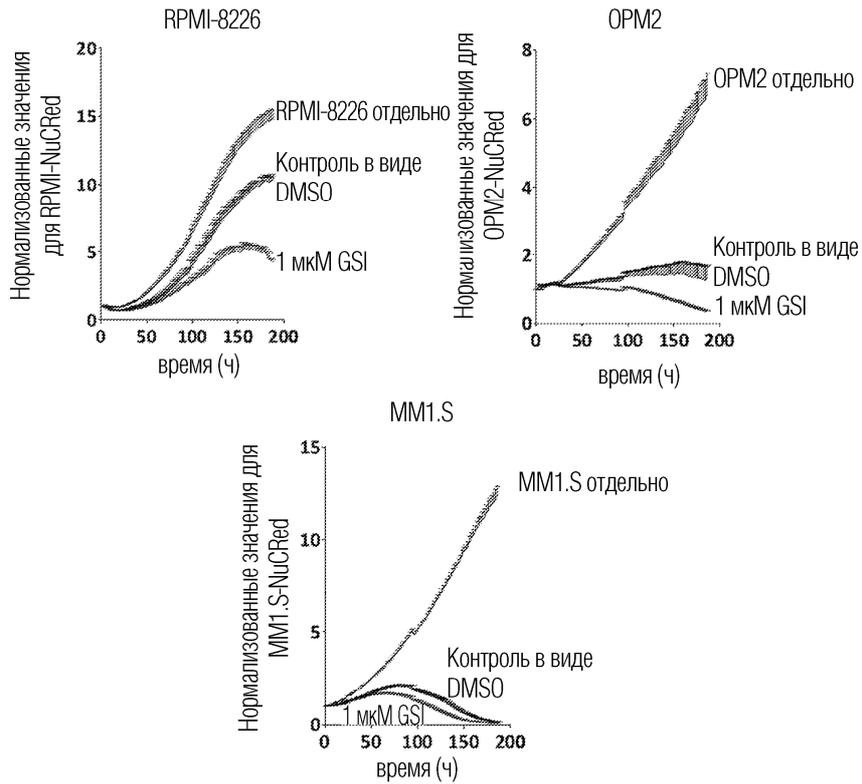
Фиг. 11



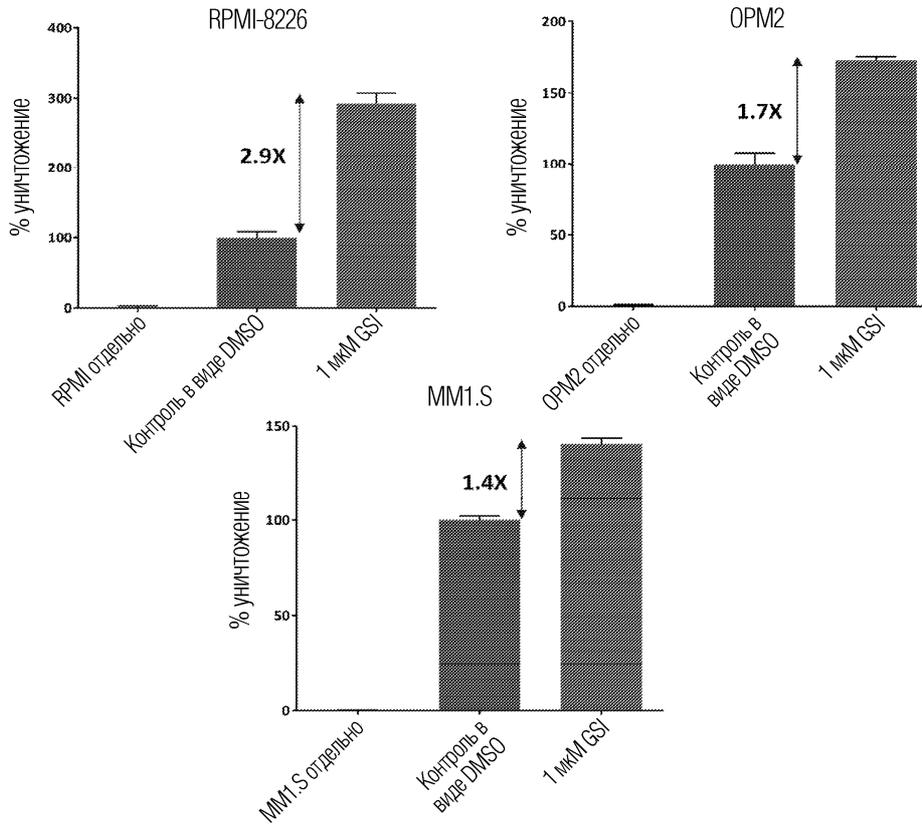
Фиг. 12А



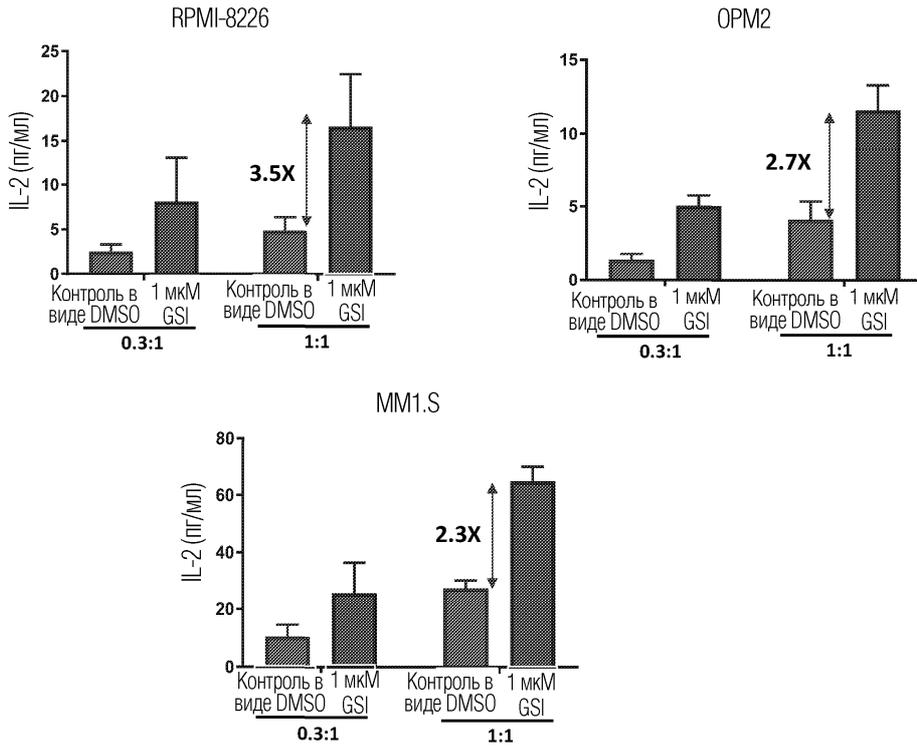
Фиг. 12В



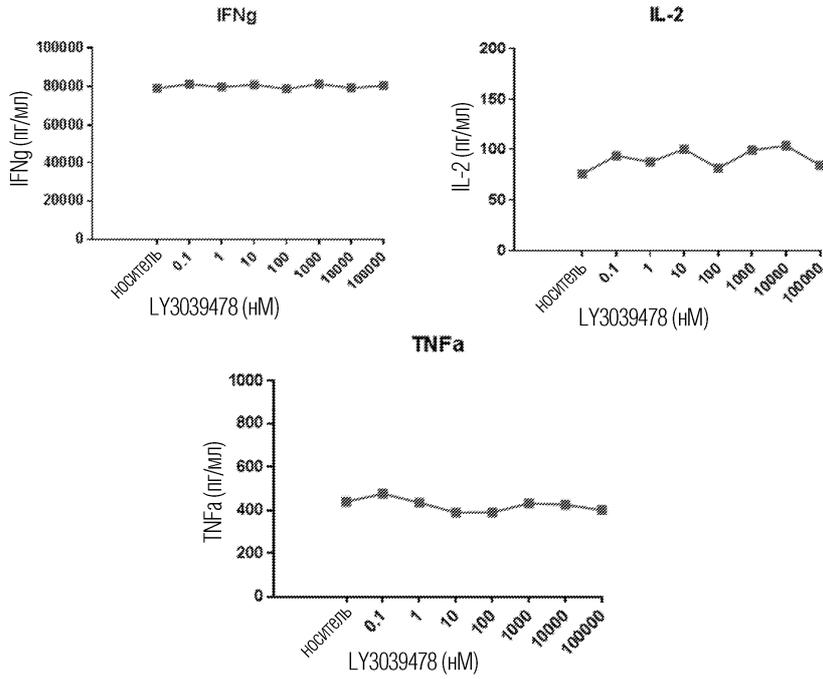
Фиг. 13А



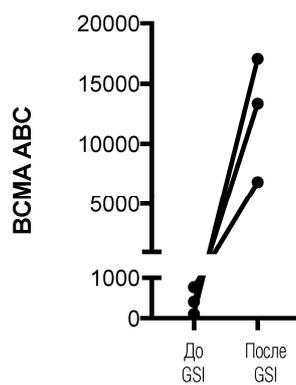
Фиг. 13В



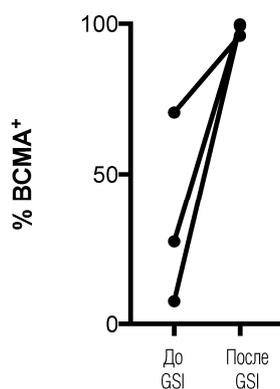
Фиг. 13С



Фиг. 14



Фиг. 15А



Фиг. 15В