

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392709 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.29(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.03.29

(54) КОМБИНАЦИЯ ТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ CAR-T-КЛЕТОК И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛИМФОМЫ

(31) 63/167,599; 63/277,134

(32) 2021.03.29; 2021.11.08

(33) US

(86) PCT/US2022/022358

(87) WO 2022/212384 2022.10.06

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

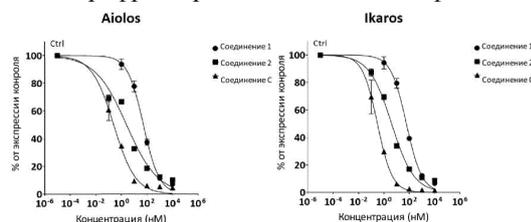
(72) Изобретатель:

Треде Николаус Себастиан (US),
Пулхэм Тим (CH), Ву Фан, Пурдехнад
Майкл, Дестефано Джозеф Эндрю,
Карранчио Антон Мария Сорайя,
Буххолц Тоня Джейн, Порте Майкл,
Кин Джим, Дубовы Роналд (US),
Брэнд Николас (CH)

(74) Представитель:

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) Предложены способы, композиции, применения и готовые изделия для комбинированной терапии, включающей в себя иммунотерапию, такую как адоптивная клеточная терапия, например Т-клеточная терапия, и применение (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона, или его энантиомера или смеси энантиомеров, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата, гидрата, сокристалла, клатрата или полиморфа, для лечения субъектов с такими заболеваниями и состояниями, как определенные В-клеточные злокачественные новообразования, и родственные способы, композиции, применения и готовые изделия. Клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL), такую как рецидивирующая или рефрактерная NHL или специфический подтип NHL.



A1

202392709

202392709

A1

КОМБИНАЦИЯ ТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ CAR-T-КЛЕТОК И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛИМФОМЫ

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 63/167599, поданной 29 марта 2021 г., и предварительной заявкой на патент США № 63/277134, поданной 8 ноября 2021 г., содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

Включение перечня последовательностей посредством ссылки

[0002] Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла с именем 735042024540SeqList.txt, созданного 27 марта 2022 г., размер которого составляет 36 килобайт. Информация в электронном формате перечня последовательностей включена посредством ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0003] Настоящее раскрытие согласно некоторым аспектам относится к способам, композициям, применениям и готовым изделиям для комбинированной терапии, включающей в себя иммунотерапию, такую как адоптивная клеточная терапия, например Т-клеточная терапия, и применение (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона, или его энантиомера или смеси энантиомеров, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата, гидрата, сокристалла, клатрата или полиморфа, для лечения субъектов с такими заболеваниями и состояниями, как определенные В-клеточные злокачественные новообразования, и родственные способы, композиции, применения и готовые изделия. Т-клеточная терапия включает в себя клетки, которые экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой неходжкинскую лимфому (non-Hodgkin lymphoma, NHL), такую как рецидивирующая или рефрактерная NHL или специфический подтип NHL.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0004] Для иммунотерапии доступны различные стратегии, например введение сконструированных Т-клеток для адоптивной терапии. Например, доступны стратегии для конструирования Т-клеток, экспрессирующих генно-инженерные антигенные рецепторы, такие как CAR, и введения композиций, содержащих такие клетки, субъектам. Для повышения эффективности клеток необходимы усовершенствованные стратегии, например улучшение персистенции, активности и/или пролиферации клеток после введения субъектам. Предложены способы, композиции, наборы и системы, которые удовлетворяют такие потребности.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0005] В настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения рака, экспрессирующего CD19, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, экспрессирующий CD19, комбинированной терапии, включающей в себя: (i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленный против данного рака; и (ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[0006] Согласно некоторым из предложенных способов рак, экспрессирующий CD19, представляет собой лимфому.

[0007] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, комбинированной терапии, включающей в себя: (i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (cluster of differentiation 19, CD19); и (ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф.

[0008] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают до введения Т-клеточной терапии.

[0009] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения рака, экспрессирующего CD19, причем данный

способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, экспрессирующий CD19, Т-клеточной терапии, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на данный рак, причем Т-клеточную терапию вводят в комбинированной терапии с соединением, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем введение соединения начинают до введения Т-клеточной терапии.

[0010] Согласно некоторым из предложенных способов рак, экспрессирующий CD19, представляет собой лимфому.

[0011] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, Т-клеточной терапии, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в комбинированной терапии с соединением, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем введение соединения начинают до введения Т-клеточной терапии.

[0012] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают после введения Т-клеточной терапии.

[0013] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения рака, экспрессирующего CD19, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, экспрессирующий CD19, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на данный рак, причем введение соединения начинают после введения Т-клеточной терапии.

[0014] Согласно некоторым из предложенных способов рак, экспрессирующий CD19, представляет собой лимфому.

[0015] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем введение соединения начинают после введения Т-клеточной терапии.

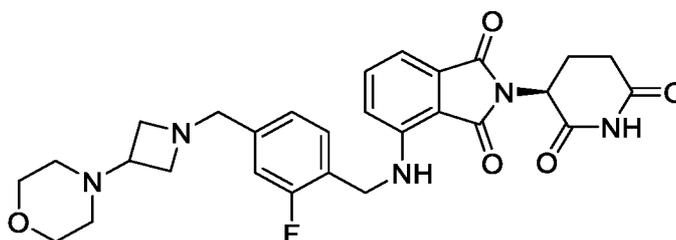
[0016] Согласно некоторым из предложенных способов Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии.

[0017] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

[0018] Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в виде нескольких доз, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно.

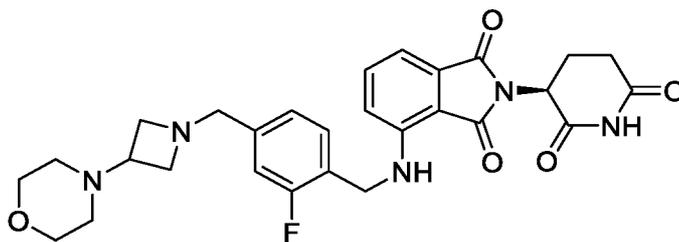
[0019] Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю.

[0020] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, комбинированной терапии, включающей в себя: (i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем данную Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и (ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем соединение вводят согласно прерывистой (то есть не ежедневной) схеме введения доз.

[0021] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии, и соединение вводят согласно прерывистой (то есть не ежедневной) схеме введения доз.

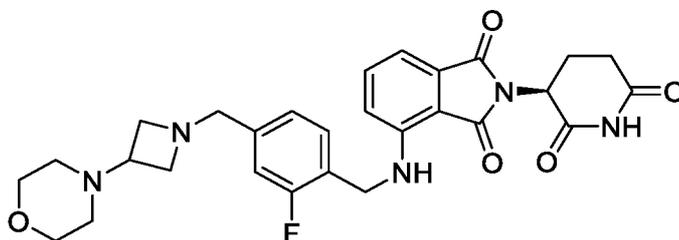
[0022] Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят не чаще чем один раз в неделю.

[0023] Согласно некоторым из предложенных способов каждая доза соединения составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно.

[0024] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

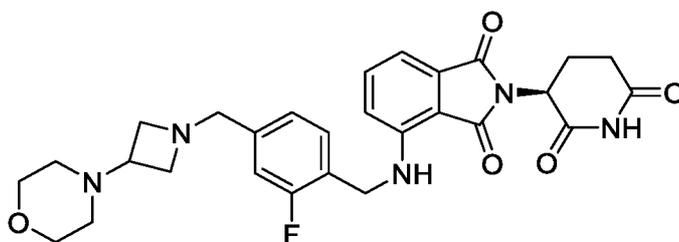
[0025] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, комбинированной терапии, включающей в себя: (i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19),

причем данную Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и (ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно, причем введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

[0026] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно, и причем введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

[0027] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают между днем 1 и днем 22 включительно. Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают между днем 1 и днем 15 включительно. Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают между днем 8 и днем 15 включительно.

[0028] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают в день 1 или приблизительно в день 1. Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают в день 8 или приблизительно в день 8. Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения начинают в день 15 или приблизительно в день 15.

[0029] Согласно некоторым из предложенных способов все дозы из нескольких прерывистых доз являются одинаковыми.

[0030] Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят один раз в неделю. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят один раз каждые 7 дней (Q7D). Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят один раз каждые две недели. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят один раз каждые 14 дней (Q14D).

[0031] Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в течение по меньшей мере 12 недель после введения Т-клеточной терапии. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в течение вплоть до 12 недель после введения Т-клеточной терапии.

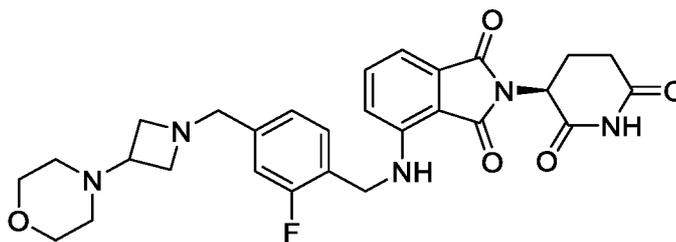
[0032] Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85. Согласно некоторым из предложенных способов соединение вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78.

[0033] Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения составляет от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения составляет 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг.

[0034] Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения составляет от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения составляет 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг. Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения

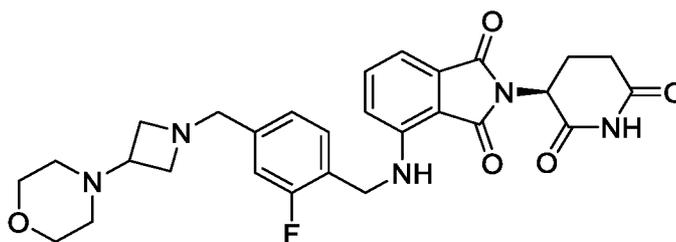
составляет менее чем 0,4 мг. Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения составляет 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг. Согласно некоторым из предложенных способов доза соединения составляет 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг.

[0035] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

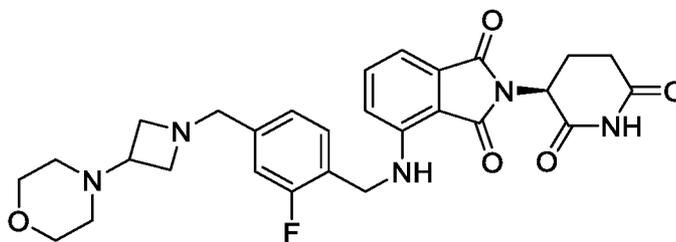
[0036] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной

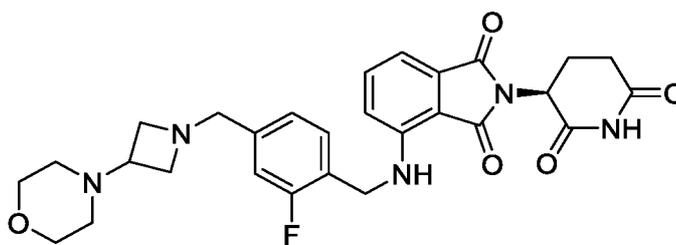
терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

[0037] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



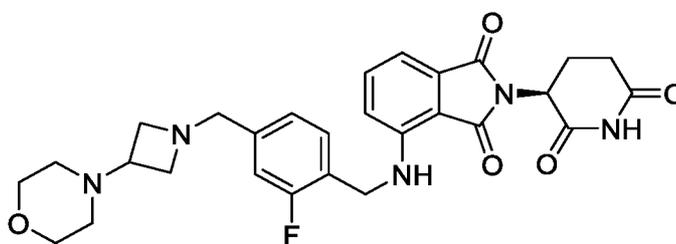
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

[0038] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,4 мг.

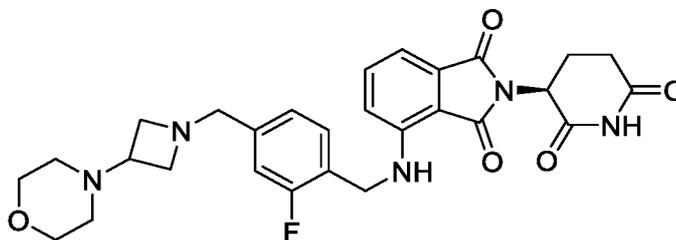
[0039] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые 14 дней (Q14D), и вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

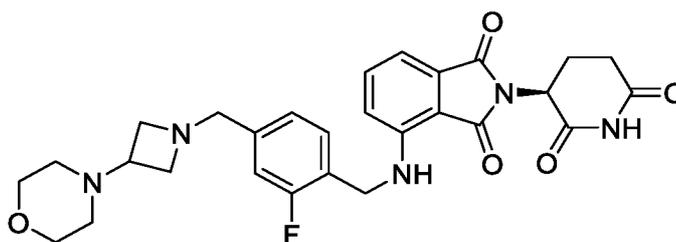
[0040] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое

представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,2 мг.

[0041] Также в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предложен способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем: соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,6 мг.

[0042] Согласно некоторым из предложенных способов соединение представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль.

[0043] Согласно некоторым из предложенных способов соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым из предложенных способов соединение представляет собой или содержит гидрат (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым из предложенных способов соединение представляет собой или содержит сольват (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым из предложенных способов соединение представляет собой или содержит (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион.

[0044] Согласно некоторым из предложенных способов во время начала введения соединения у субъекта не проявляется тяжелая токсичность после введения Т-клеточной терапии. Согласно некоторым из предложенных способов тяжелая токсичность представляет собой тяжелый синдром высвобождения цитокинов (cytokine release syndrome, CRS), необязательно CRS степени 3 или выше, продолжительный CRS степени 3 или выше, CRS степени 4 или CRS степени 5; и/или тяжелая токсичность представляет собой тяжелую нейротоксичность, необязательно нейротоксичность степени 3 или выше, продолжительную нейротоксичность степени 3 или выше, нейротоксичность степени 4 или нейротоксичность степени 5. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая токсичность представляет собой тяжелый CRS. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая токсичность представляет собой тяжелую нейротоксичность.

[0045] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения приостанавливают и/или дозу соединения модифицируют, необязательно снижают, если у субъекта проявляется токсичность после введения соединения, необязательно гематологическая токсичность. Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения приостанавливают, если у субъекта проявляется токсичность после введения соединения. Согласно некоторым из предложенных способов дозу соединения снижают, если у субъекта проявляется токсичность после введения соединения. Согласно некоторым из предложенных способов токсичность представляет собой гематологическую токсичность. Согласно некоторым из предложенных способов токсичность представляет собой тяжелую тромбоцитопению, необязательно

тромбоцитопению степени 4 или продолжительную тромбоцитопению степени 4. Согласно некоторым из предложенных способов токсичность представляет собой тяжелую нейтропению, необязательно нейтропению степени 4, продолжительную нейтропению степени 4, или фебрильную нейтропению, необязательно фебрильную нейтропению степени 3 или выше или продолжительную фебрильную нейтропению степени 3 или выше.

[0046] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения возобновляют после того, как у субъекта перестает проявляться токсичность.

[0047] Согласно некоторым из предложенных способов лимфома экспрессирует CD19.

[0048] Согласно некоторым из предложенных способов лимфома представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. Согласно некоторым из предложенных способов лимфома представляет собой рецидивирующую/рефрактерную лимфому. Согласно некоторым из предложенных способов лимфома представляет собой агрессивную лимфому. Согласно некоторым из предложенных способов лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL), причем, необязательно, NHL включает агрессивную NHL; диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL); DLBCL-NOS (not otherwise specified), необязательно трансформированную индолентную; EBV-положительную DLBCL-NOS; богатую Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому; первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому (primary mediastinal large B cell lymphoma, PMBCL); фолликулярную лимфому (follicular lymphoma, FL), необязательно фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В); и/или В-клеточную лимфому высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (с двумя/тремя генетическими изменениями).

[0049] Согласно некоторым из предложенных способов CD19 представляет собой человеческий CD19.

[0050] Согласно некоторым из предложенных способов химерный антигенный рецептор (CAR) содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с CD19, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. Согласно некоторым из предложенных способов внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), необязательно человеческой цепи CD3-дзета. Согласно некоторым из предложенных способов внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен человеческой цепи CD3-дзета (CD3 ζ). Согласно некоторым из предложенных способов химерный антигенный рецептор (CAR)

дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область. Согласно некоторым из предложенных способов костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен из CD28 или 4-1BB, необязательно человеческого CD28 или человеческого 4-1BB. Согласно некоторым из предложенных способов костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен человеческого CD28. Согласно некоторым из предложенных способов костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен человеческого 4-1BB.

[0051] Согласно некоторым из предложенных способов CAR содержит scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, которая, необязательно, представляет собой или содержит 4-1BB, необязательно человеческого 4-1BB; и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета, необязательно сигнальный домен CD3-дзета человека; и причем, необязательно, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv. Согласно некоторым из предложенных способов CAR содержит scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от человеческого 4-1BB; цитоплазматический сигнальный домен, который представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета человека; и спейсер между трансмембранным доменом и scFv.

[0052] Согласно некоторым из предложенных способов CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB, необязательно сигнальный домен 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой сигнальный домен CD3-дзета, необязательно сигнальный домен CD3-дзета человека. Согласно некоторым из предложенных способов CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, который представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, который представляет собой сигнальный домен CD3-дзета человека.

[0053] Согласно некоторым из предложенных способов CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; спейсер; трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, который,

необязательно, представляет собой сигнальный домен 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета. Согласно некоторым из предложенных способов CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; спейсер; трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, который представляет собой сигнальный домен 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета.

[0054] Согласно некоторым из предложенных способов спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир или его модифицированный вариант или состоит из него или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно шарнир IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него и/или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, такой как IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер содержит полностью или частично шарнир IgG4 или его модифицированный вариант или состоит из него. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер содержит приблизительно 15 аминокислот или менее. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер имеет длину 12 аминокислот или приблизительно 12 аминокислот. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер имеет длину 12 аминокислот или приблизительно 12 аминокислот. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1; последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34; или вариант любой из вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, или состоит из них. Согласно некоторым из предложенных способов спейсер имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или состоит из нее. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер имеет последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 2.

[0055] Согласно некоторым из предложенных способов цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, содержит последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 12, или ее вариант,

характеризующийся идентичностью последовательности с ней по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Согласно некоторым из предложенных способов цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, содержит последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 13-15 или ее вариант, характеризующийся идентичностью последовательности с ней по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0056] Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); и/или последовательность CDRH1 DYGVVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); и/или последовательность CDRH1 DYGVVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); и последовательность CDRH1 DYGVVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40). Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность CDRL1 из FMC63, последовательность CDRL2 из FMC63, последовательность CDRL3 из FMC63, и переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность CDRH1 из FMC63, последовательность CDRH2 из FMC63 и последовательность CDRH3 из FMC63. Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит переменную область тяжелой цепи из FMC63 и переменную область легкой цепи из FMC63. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 41, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 42. Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит последовательность CDRL1 из FMC63, последовательность CDRL2 из FMC63, последовательность CDRL3 из FMC63, последовательность CDRH1 из FMC63,

последовательность CDRH2 из FMC63 и последовательность CDRH3 из FMC63. Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит переменную область тяжелой цепи из FMC63 и переменную область легкой цепи из FMC63. Согласно некоторым из предложенных способов scFv содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 41, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под ID NO: 42. Согласно некоторым из предложенных способов scFv имеет последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 43.

[0057] Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 1×10^5 до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток или от 5×10^7 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, все включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 1×10^5 до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 5×10^6 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно. Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 5×10^7 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток включительно.

[0058] Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^5$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^6$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^8 CAR-

[0061] Согласно некоторым из предложенных способов дозу сконструированных клеток вводят парентерально, необязательно внутривенно. Согласно некоторым из предложенных способов дозу сконструированных клеток вводят внутривенно.

[0062] Согласно некоторым из предложенных способов Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта. Согласно некоторым из предложенных способов Т-клетки являются аутологичными для субъекта. Согласно некоторым из предложенных способов Т-клетки являются аллогенными для субъекта.

[0063] Согласно некоторым из предложенных способов доза сконструированных клеток содержит CD4+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и введение данной дозы предусматривает введение нескольких отдельных композиций, причем упомянутые несколько отдельных композиций содержат первую композицию, содержащую один тип клеток из CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другой тип клеток из CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

[0064] Согласно некоторым из предложенных способов первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов или в котором введение первой композиции и введение второй композиции осуществляют в один и тот же день, осуществляют с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 12 часов, с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 6 часов или с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 2 часов; и/или начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом от приблизительно 1 минуты до приблизительно 1 часа или с интервалом от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут. Согласно некоторым из предложенных способов первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час, не более чем 30 минут, не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут.

[0065] Согласно некоторым из предложенных способов первая композиция содержит CD4+ Т-клетки. Согласно некоторым из предложенных способов первая композиция содержит CD8+ Т-клетки.

[0066] Согласно некоторым из предложенных способов первую композицию вводят до второй композиции.

[0067] Согласно некоторым из предложенных способов перед введением Т-клеточной терапии субъекта подвергают предварительному кондиционированию с помощью лимфодеплецирующей терапии, включающей в себя введение флударабина и/или циклофосфамида. Согласно некоторым из предложенных способов способ дополнительно предусматривает непосредственно перед введением Т-клеточной терапии

введение субъекту лимфодеплецирующей терапии, включающей в себя введение флударабина и/или циклофосфамида.

[0068] Согласно некоторым из предложенных способов лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве приблизительно 200–400 мг/м² включительно, необязательно 300 мг/м² или приблизительно 300 мг/м², и/или флударабина в количестве приблизительно 20–40 мг/м², необязательно 30 мг/м², ежедневно в течение 2–4 дней, необязательно в течение 3 дней, или лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве приблизительно 500 мг/м². Согласно некоторым из предложенных способов лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве 300 мг/м² или приблизительно 300 мг/м² и флударабина в количестве приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней; и/или лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве 500 мг/м² или приблизительно 500 мг/м² и флударабина в количестве приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней.

[0069] Согласно некоторым из предложенных способов субъект является человеком.

[0070] Согласно некоторым из предложенных способов по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают полного ответа (complete response, CR), который является устойчивым или является устойчивым по меньшей мере у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR, в течение 6 месяцев или более 6 месяцев или 9 месяцев или более 9 месяцев; и/или по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR к шести месяцам, сохраняют ответ, сохраняют CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение 3 месяцев или более 3 месяцев, и/или 6 месяцев или более 6 месяцев, и/или девяти месяцев или более девяти месяцев; и/или по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают объективного ответа (objective response, OR), причем, необязательно, OR является устойчивым или является устойчивым по меньшей мере у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR, в течение 6 месяцев или более 6 месяцев или 9 месяцев или более 9 месяцев; и/или по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, сохраняют ответ или выживание в течение 3 месяцев или более 3 месяцев и/или 6 месяцев или более 6 месяцев.

[0071] Согласно некоторым из предложенных способов во время введения дозы сконструированных клеток или непосредственно перед этим у субъекта наблюдается

рецидив после ремиссии после лечения с помощью одной или нескольких предшествующих терапий NHL, необязательно одной, двух или трех предшествующих терапий, отличных от еще одной дозы сконструированных клеток, экспрессирующих CAR, или он становится рефрактерным к этим терапиям. Согласно некоторым из предложенных способов во время введения дозы сконструированных клеток или непосредственно перед этим у субъекта наблюдается рецидив после ремиссии после лечения с помощью одной предшествующей терапии NHL или он становится рефрактерным к ней. Согласно некоторым из предложенных способов во время введения дозы сконструированных клеток или непосредственно перед этим у субъекта наблюдается рецидив после ремиссии после лечения с помощью двух предшествующих терапий NHL или он становится рефрактерным к ним. Согласно некоторым из предложенных способов во время введения дозы сконструированных клеток или непосредственно перед этим у субъекта наблюдается рецидив после ремиссии после лечения с помощью трех предшествующих терапий NHL или он становится рефрактерным к ним. Согласно некоторым из предложенных способов одна или несколько предшествующих терапий не включают в себя еще одной дозы сконструированных клеток, экспрессирующих CAR.

[0072] Согласно некоторым из предложенных способов во время введения дозы сконструированных клеток или перед этим: у субъекта выявлена или была идентифицирована лимфома с двумя/тремя генетическими изменениями; у субъекта выявлена или была идентифицирована хеморефрактерная лимфома, необязательно хеморефрактерная DLBCL; и/или субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию. Согласно некоторым из предложенных вариантов осуществления субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию.

[0073] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения: обращает фенотип истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта; предотвращает, ингибирует или задерживает возникновение фенотипа истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта; снижает уровень или степень фенотипа истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта; или снижает у субъекта процентную долю или общее количество CAR-экспрессирующих Т-клеток, которые характеризуются фенотипом истощения.

[0074] Согласно некоторым из предложенных способов начало введения соединения осуществляют после введения Т-клеточной терапии, и после введения соединения или его начала у субъекта наблюдается возобновление или восстановление антигенспецифической или опухолеспецифической активности или функции CAR-

экспрессирующих Т-клеток у упомянутого субъекта, причем, необязательно, упомянутые возобновление, восстановление и/или начало введения упомянутого соединения происходит в момент времени после того, как CAR-экспрессирующие Т-клетки у субъекта или в крови субъекта продемонстрировали истощенный фенотип.

[0075] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения предусматривает введение в количестве, с частотой и/или с продолжительностью, эффективными для: (a) обеспечения повышения у субъекта антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности наивных или неистощенных Т-клеток, которые, необязательно, содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, после воздействия на Т-клетки антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения; или (b) предотвращения, ингибирования или задержки у субъекта возникновения фенотипа истощения в наивных или неистощенных Т-клетках, которые, необязательно, содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, после воздействия на Т-клетки антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения; или (c) обращения у субъекта фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно содержащих Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения.

[0076] Согласно некоторым из предложенных способов введение соединения предусматривает введение в количестве, с частотой и/или с продолжительностью, эффективными (i) для обеспечения упомянутого повышения активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или задержки упомянутого возникновения упомянутого фенотипа истощения и/или обращения упомянутого фенотипа истощения.

[0077] Согласно некоторым из предложенных способов Т-клетки у субъекта содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, и/или упомянутый антиген представляет собой CD19, например, воздействие представляет собой воздействие антигена CD19.

[0078] Согласно некоторым из предложенных способов фенотип истощения применительно к Т-клетке или популяции Т-клеток, содержит: повышение уровня или степени поверхностной экспрессии на Т-клетке или Т-клетках, или процентной доли упомянутой популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностную экспрессию, одного или нескольких маркеров истощения, необязательно 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях; или снижение уровня или степени активности, проявляемой упомянутыми Т-клетками или популяцией Т-клеток

при воздействии антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях.

[0079] Согласно некоторым из предложенных способов повышение уровня, степени или процентной доли происходит более чем в 1,2 раза или приблизительно в 1,2 раза, в 1,5 раза или приблизительно в 1,5 раза, в 2,0 раза или приблизительно в 2,0 раза, в 3 раза или приблизительно в 3 раза, в 4 раза или приблизительно в 4 раза, в 5 раз или приблизительно в 5 раз, в 6 раз или приблизительно в 6 раз, в 7 раз или приблизительно в 7 раз, в 8 раз или приблизительно в 8 раз, в 9 раз или приблизительно в 9 раз, в 10 раз или приблизительно в 10 раз или более. Согласно некоторым из предложенных способов, снижение уровня, степени или процентной доли происходит более чем в 1,2 раза или приблизительно в 1,2 раза, в 1,5 раза или приблизительно в 1,5 раза, в 2,0 раза или приблизительно в 2,0 раза, в 3 раза или приблизительно в 3 раза, в 4 раза или приблизительно в 4 раза, в 5 раз или приблизительно в 5 раз, в 6 раз или приблизительно в 6 раз, в 7 раз или приблизительно в 7 раз, в 8 раз или приблизительно в 8 раз, в 9 раз или приблизительно в 9 раз, в 10 раз или приблизительно в 10 раз или более.

[0080] Согласно некоторым из предложенных способов эталонная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, о которых известно, что они характеризуются неистощенным фенотипом, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно от того же субъекта или того же вида, что и субъект, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения. Согласно некоторым из предложенных способов эталонная популяция Т-клеток (а) представляет собой соответствующую субъекту популяцию, содержащую массу Т-клеток, выделенных из крови субъекта, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения, причем, необязательно, масса Т-клеток не экспрессирует CAR, и/или (b) получена от субъекта, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения, до введения дозы Т-клеток, экспрессирующих CAR. Согласно некоторым из предложенных способов эталонная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, например образец Т-клеток, экспрессирующих CAR, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие CAR, до их введения субъекту, причем, необязательно, композиция представляет собой криоконсервированный образец.

[0081] Согласно некоторым из предложенных способов один или несколько маркеров истощения представляют собой ингибирующий рецептор. Согласно некоторым

из предложенных способов один или несколько маркеров истощения выбраны из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

[0082] Согласно некоторым из предложенных способов активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продукции одного воспалительного цитокина или их комбинации, причем, необязательно, один цитокин или их комбинация выбраны из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

[0083] Согласно некоторым из предложенных способов воздействие упомянутого антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства предусматривает инкубацию с антигеном CD19 или специфическим к антигенному рецептору средством, необязательно средством, которое связывает антигенсвязывающий домен CAR. Согласно некоторым из предложенных способов воздействие антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства предусматривает воздействие на Т-клетки экспрессирующих антиген CD19 клеток-мишеней, необязательно клеток В-клеточного злокачественного новообразования.

[0084] Также предложены комбинированная терапия, включающая в себя Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на рак, экспрессирующий CD19, и соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, для применения в способе лечения рака в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0085] Также предложено соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, для применения в способе лечения рака, экспрессирующего CD19, в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0086] Также предложены Т-клеточные терапии, включающие в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на рак, экспрессирующий CD19, для применения в способе лечения рака в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0087] Также предложены применения комбинированной терапии, включающей в себя Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR),

который нацелен на рак, экспрессирующий CD19, и соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, для лечения рака в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0088] Также предложены применения соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, для лечения рака, экспрессирующего CD19, в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0089] Также предложены применения Т-клеточной терапии, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на рак, экспрессирующий CD19, для лечения рака в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0090] Также предложены применения комбинированной терапии, включающей в себя Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на рак, экспрессирующий CD19, и соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, для производства лекарственного средства для лечения рака в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0091] Также предложены применения соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, для производства лекарственного средства для лечения рака, экспрессирующего CD19, в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0092] Также предложены применения Т-клеточной терапии, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который нацелен на рак, экспрессирующий CD19, для производства лекарственного средства для лечения рака в соответствии с любым из предлагаемых способов.

[0093] Согласно некоторым из предложенных вариантов осуществления CAR связывает кластер дифференцировки 19 (CD19). Согласно некоторым вариантам осуществления рак, экспрессирующий CD19, представляет собой лимфому.

[0094] Согласно некоторым из предложенных вариантов осуществления соединение представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль.

Краткое описание фигур

[0095] На **фиг. 1** показаны уровни экспрессии факторов транскрипции Aiolos и Ikaros в анти-CD19 CAR-T-клетках после стимуляции с помощью CAR-специфического антиидиотипического антитела в присутствии различных иммуномодулирующих соединений.

[0096] На **фиг. 2A** показана процентная доля живых анти-CD19 CAR-T-клеток после стимуляции с помощью CAR-специфического антиидиотипического антитела в присутствии различных иммуномодулирующих соединений. На **фиг. 2B** и **2C** показано количество удвоенных клеток анти-CD19 CAR-T-клеток после стимуляции с помощью CAR-специфического антиидиотипического антитела в присутствии различных иммуномодулирующих соединений. На **фиг. 2D** и **2E** показана процентная доля анти-CD19 CAR-T-клеток в фазе G1 клеточного цикла после стимуляции с помощью CAR-специфического антиидиотипического антитела в присутствии различных иммуномодулирующих соединений. На **фиг. 2F** показаны уровни цитокинов в анти-CD19 CAR-T-клетках после стимуляции с помощью CAR-специфического антиидиотипического антитела в присутствии различных иммуномодулирующих соединений. Значения \log_2 кратности изменения больше нуля обозначены знаком «+».

[0097] На **фиг. 2G** показано количество опухолевых клеток RL, обработанных анти-CD19 CAR-T-клетками и соединением С. На **фиг. 2H** показано количество опухолевых клеток RL, обработанных анти-CD19 CAR-T-клетками и соединением 2.

[0098] На **фиг. 3A** показана продукция цитокинов в анти-CD19 CAR-T-клетках после хронической стимуляции. На **фиг. 3B** показана цитолитическая функция анти-CD19 CAR-T-клеток после хронической стимуляции.

[0099] На **фиг. 3C** показаны репрезентативные изображения CD19-экспрессирующих опухолевых сфероидов в день 9 совместного культивирования с анти-CD19 CAR-T-клетками, которые были стимулированы в присутствии соединения С (одновременная обработка).

[0100] На **фиг. 3D** и **3E** показан объем CD19-экспрессирующих опухолевых сфероидов, совместно культивированных с анти-CD19 CAR-T-клетками, которые были стимулированы в присутствии соединения С после хронической стимуляции (одновременная обработка). На **фиг. 3F** показана концентрация IFN γ в супернатанте совместно культивированных клеток.

[0101] На **фиг. 3G** показана экспрессия Ikaros в анти-CD19 CAR-T-клетках после шести дней хронической стимуляции в присутствии соединения С или соединения 2.

[0102] На **фиг. 3H** изображены вулканные диаграммы, демонстрирующие дифференциально экспрессируемые гены в хронически стимулированных анти-CD19 CAR-T-клетках, одновременно обработанных соединением С. На **фиг. 3I** показано сравнение воздействий на профиль экспрессии генов (\log_2 кратности изменения), оказанных одновременной обработкой соединением С анти-CD19 CAR-T-клеток, которые были хронически стимулированы. На **фиг. 3J** показан анализ обогащения пути дифференциально экспрессируемых генов с помощью KEGG в хронически стимулированных анти-CD19 CAR-T-клетках после одновременной обработки соединением С.

[0103] На **фиг. 4A** показаны репрезентативные изображения CD19-экспрессирующих опухолевых сфероидов в день 9 совместного культивирования с анти-CD19 CAR-T-клетками в присутствии соединения С (восстанавливающая обработка).

[0104] На **фиг. 4B** и **4C** показан объем CD19-экспрессирующих опухолевых сфероидов, совместно культивированных с анти-CD19 CAR-T-клетками в присутствии соединения С (восстанавливающая обработка). На **фиг. 4D** показана концентрация IFN γ в супернатанте совместно культивированных клеток.

[0105] На **фиг. 4E** изображены вулканные диаграммы, демонстрирующие дифференциально экспрессируемые гены в хронически стимулированных анти-CD19 CAR-T-клетках после восстанавливающей обработки соединением С. На **фиг. 4F** показано сравнение воздействий на профиль экспрессии генов (\log_2 кратности изменения), оказанных восстанавливающей обработкой соединением С анти-CD19 CAR-T-клеток, которые были хронически стимулированы. На **фиг. 4G** показан анализ обогащения пути дифференциально экспрессируемых генов с помощью KEGG в хронически стимулированных анти-CD19 CAR-T-клетках после восстанавливающей обработки соединением С.

[0106] На **фиг. 5A** показано количество опухолевых клеток во время повторного воздействия на CAR-T-клетки, хронически стимулированные в присутствии соединения С (одновременная обработка). На **фиг. 5B** показано количество опухолевых клеток во время

повторного воздействия на CAR-T-клетки в присутствии соединения С (восстанавливающая обработка).

[0107] На **фиг. 6А** показаны ожидаемые уровни концентрации соединения С в плазме на основе схемы введения доз один раз каждые семь дней (Q7D).

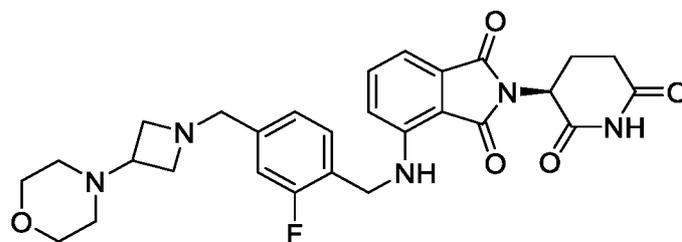
[0108] На **фиг. 6В** и **6С** показаны уровни Ikaros в анти-CD19 CAR-T-клетках после 24-часового (**фиг. 6В**) или шестидневного воздействия (**фиг. 6С**) соединения С.

[0109] На **фиг. 6D** показаны прогнозируемые профили абсолютного числа нейтрофилов (absolute neutrophil count, ANC) на основе схемы Q7D введения доз соединения С, полученные с использованием четырех различных фармакодинамических моделей.

[0110] На **фиг. 7А** показано количество опухолевых клеток во время повторного воздействия на CAR-T-клетки, хронически стимулированные в присутствии соединения С, в том числе CAR-T-клетки, которые были хронически стимулированы в присутствии соединения С в течение одного дня при высокой концентрации соединения С, затем в течение пяти дней при низкой концентрации соединения С. На **фиг. 7В** и **7С** показаны цитолитическая активность и экспрессия CD27/CCR7, соответственно, CAR-T-клеток, хронически стимулированных в присутствии соединения С, включая CAR-T-клетки, которые были хронически стимулированы в присутствии соединения С в течение одного дня при высокой концентрации соединения С, затем в течение шести дней при низкой концентрации соединения С.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0111] В настоящем документе предложены способы и применения клеточной терапии, такой как клеточная терапия, включающая в себя сконструированные Т-клетки (например, CAR-T-клетки) и соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



(формула I),

или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, стереоизомер, таутомер или рацемические смеси (**соединение С**), и его композиции, для лечения субъектов с раком или пролиферативным заболеванием. Согласно некоторым аспектам клеточная терапия

представляет собой Т-клеточную терапию. Согласно некоторым аспектам клеточная терапия представляет собой адоптивную Т-клеточную терапию, включающую в себя Т-клетки, которые специфически распознают и/или нацелены на антиген, ассоциированный с раком или пролиферативным заболеванием, такой как антиген, ассоциированный с В-клеточным злокачественным новообразованием, например лимфомой, такой как неходжкинская лимфома (NHL) или ее подтип. Согласно некоторым аспектам клеточная терапия включает Т-клетки, сконструированные с химерным антигенным рецептором (CAR), содержащим антигенсвязывающий домен, который связывается, например специфически связывается, с антигеном. В некоторых случаях антиген, на который нацелена клеточная терапия, представляет собой CD19. Согласно некоторым аспектам рак, например лимфома, экспрессирует CD19. Также в настоящем документе предложены комбинации и готовые изделия, такие как наборы, которые содержат композицию, содержащую клеточную терапию, и/или композицию, содержащую соединение С, и применения таких композиций и комбинаций для лечения или предотвращения заболеваний, состояний и нарушений, включая раки, такие как лимфома.

[0112] (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион (соединение С) представляет собой пероральное модулирующее цереблон средство (CELMoD). Цереблон действует как рецептор субстрата для E3-убиквитинлигазы CRL4, и связывание модулирующих цереблон соединений индуцирует рекрутирование, убиквитинирование и разрушение ключевых субстратов-мишеней, таких как белки 1 и 3 цинковых пальцев семейства Ikaros (IKZF1 и IKZF3, также известны как Ikaros и Aiolos, соответственно), чтобы опосредовать клеточные эффекты. Как показано в настоящем документе, введение соединения С приводит к сильной деградации Ikaros и Aiolos, в большей степени, чем в случае других CELMoD этого класса (например, леналидомида, аваддомида и ибердомида). Однако потенциальным побочным эффектом деградации Ikaros и Aiolos является развитие нейтропении, вторичной по отношению к остановке созревания нейтрофилов. Нейтропения может развиваться вследствие обеднения Ikaros, критического транскрипционного фактора, контролирующего гемопоз, и обусловлена остановкой созревания предшественников нейтрофилов на поздней стадии.

[0113] Клеточные терапии, такие как терапии на основе Т-клеток, например адоптивные Т-клеточные терапии (в том числе терапии, включающие в себя введение клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, специфические к представляющему интерес заболеванию или нарушению, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или другие рекомбинантные антигенные рецепторы, а также другие адоптивные

клеточные иммунотерапии и adoptивные Т-клеточные терапии) могут быть эффективными при лечении таких заболеваний и нарушений, как В-клеточное злокачественное новообразование. Сконструированная экспрессия рекомбинантных рецепторов, таких как химерные антигенные рецепторы (CAR), на поверхности Т-клеток позволяет перенаправлять специфичность Т-клеток. В клинических исследованиях CAR-T-клетки, например анти-CD19 CAR-T-клетки, вызывали устойчивые полные ответы 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).

[0114] В определенных контекстах доступные подходы к adoptивной клеточной терапии не всегда могут быть полностью удовлетворительными. Например, хотя персистенция CAR-T-клеток может быть обнаружена у многих субъектов с лимфомой, меньше полных ответов (CR) наблюдалось у субъектов с NHL по сравнению с субъектами с ALL (acute lymphoblastic leukemia). Более конкретно, хотя сообщалось о более высокой частоте общего ответа вплоть до 80% (частота CR от 47% до 60%) после инфузии CAR-T-клеток, у некоторых ответы были временными, и было показано, что у субъектов наблюдались рецидивы в присутствии персистирующих CAR-T-клеток (Neelapu, 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH): 2016; San Diego, CA, USA. Abstract № LBA-6,2016; Abramson, *Blood*. 2016 Dec 01;128(22):4192). В другом исследовании сообщалось о частоте долгосрочного CR 40% (Schuster, *Ann Hematol*. 2016 Oct;95(11):1805-10).

[0115] Согласно некоторым аспектам объяснением этого является иммунное истощение циркулирующих CAR-экспрессирующих Т-клеток и/или изменения в популяциях Т-лимфоцитов. Это связано с тем, что в некоторых контекстах оптимальная эффективность может зависеть от способности введенных клеток иметь возможность становиться активированными, размножаться, выполнять различные эффекторные функции, включая цитотоксический киллинг и секрецию различных факторов, таких как цитокины, персистировать, в том числе продолжительно, дифференцироваться, совершать переход или участвовать в перепрограммировании в определенные фенотипические состояния (такие как состояния долгосрочной памяти, менее дифференцированные и эффекторные состояния), предотвращать или уменьшать иммуносупрессивные состояния в локальном микроокружении заболевания, обеспечивать эффективные и надежные вторичные ответы после выведения и повторного воздействия целевого лиганда или антигена и предотвращать или уменьшать истощение, анергию, периферическую

толерантность, терминальную дифференцировку и/или дифференцировку в супрессивное состояние.

[0116] Согласно некоторым аспектам воздействие, персистенция и функции сконструированных клеток уменьшаются или снижаются после введения субъекту. Согласно некоторым аспектам после продолжительной стимуляции или воздействия антигена и/или воздействия в условиях микроокружения опухоли Т-клетки со временем могут становиться гипофункциональными и/или проявлять признаки, связанные с истощенным состоянием. Согласно некоторым аспектам это снижает персистенцию и эффективность Т-клеток в отношении антигена и ограничивает их способность быть эффективными. Тем не менее, наблюдения показывают, что в некоторых случаях введенные клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы, могут повторно размножаться и/или быть повторно активированы *in vivo* (например, демонстрировать увеличение количества клеток или продолжительности во времени) для улучшения эффективности и терапевтических результатов в адоптивной клеточной терапии. Существует потребность в способах улучшения эффективности и функции CAR-T-клеток, в частности минимизации, уменьшения, предотвращения или обращения гипофункциональных или истощенных состояний.

[0117] Предложенные способы основаны на наблюдениях, что лечение с помощью соединения С может улучшать функцию Т-клеток, включая функции, связанные со способностью продуцировать один или несколько цитокинов, цитотоксичностью, размножением, пролиферацией и персистенцией Т-клеток. Согласно некоторым аспектам предложенные способы усиливают или модулируют пролиферацию и/или активность Т-клеточной активности, связанной с введением клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующих Т-клеток). Обнаружено, что такие способы и применения обеспечивают или достигают улучшенной или большей функциональности Т-клеток и, таким образом, улучшенной противоопухолевой эффективности.

[0118] В настоящем исследовании также обнаружено, что, помимо потенцирования функции Т-клеток, лечение соединением С может обращать, задерживать или предотвращать истощение Т-клеток, в том числе за счет увеличения передачи сигналов Т-клеток и/или изменения одного или нескольких генов, которые дифференциально регулируются после хронической стимуляции. Хотя в некоторых случаях средства, которые увеличивают или потенцируют активность Т-клеток, могут доводить клетки до истощенного состояния, в настоящем исследовании обнаружено, что активность соединения С по оказанию потенцирующего эффекта на активность Т-клеток не связана с истощением Т-клеток. Более того, наблюдения, представленные в настоящем документе,

показывают, что соединение С проявляет активность по спасению Т-клеток от истощения Т-клеток, например, путем восстановления или частичного восстановления активности одной или нескольких Т-клеток после того, как клетка продемонстрировала признаки истощения. Примечательно, что результаты, представленные в настоящем документе, показывают, что Т-клетки, которые подвергались хронической стимуляции и проявляют признаки истощенных Т-клеток, способны к восстановлению активности или к тому, что их активность оказывается восстановлена или частично восстановлена после воздействия соединения С. Наблюдения, представленные в настоящем документе, подтверждают, что предложенные способы также могут приводить к улучшенным или более устойчивым ответам по сравнению с некоторыми альтернативными способами, например, у определенных групп субъектов, получавших лечение.

[0119] В настоящем документе также показано, что обработка низкой дозой соединения С (например, 1 нМ) способна сильно ухудшать экспрессию как Ikaros, так и Aiolos в хронически стимулированных CAR-T-клетках. Однако в настоящем документе также показано, что более высокие дозы соединения С (например, 10 и 100 нМ) могут приводить к устойчивой направленной деградации Ikaros и Aiolos и приводить к снижению цитолитической функции. Такие результаты позволяют предположить, что чрезмерная устойчивая направленная деградация Ikaros и Aiolos может иметь контрпродуктивный эффект и приводить к дисфункции CAR-T-клеток. На основании этих результатов, и поскольку соединение С может подвергать Ikaros и Aiolos более сильной деградации, что это могут другие соединения CELMoD, которые нацелены на Ikaros и Aiolos, в настоящем документе выдвинута гипотеза, что одной еженедельной дозы будет достаточно, чтобы вызывать глубокую, но временную деградацию Ikaros и Aiolos, что потенциально позволяет восстанавливать экспрессию Ikaros и/или Aiolos между дозами. Как показано в настоящем документе, фармакокинетическое моделирование соединения С при еженедельной дозе (Q7D) 0,3 мг продемонстрировало быструю (C_{max} приблизительно 20 нМ) и двухфазную элиминацию соединения С с C_{min} в день 7 приблизительно 1 нМ. Моделирование также показало, что еженедельная доза 0,3 мг по существу не влияет на количество нейтрофилов. Также, как показано в настоящем документе в доклинических моделях, цитолитическая активность анти-CD19 CAR-T в отношении CD19+ клеток-мишеней была наиболее выражена после воздействия временных (однодневных) высоких концентраций соединения С (20-100 нМ) с последующим отмыванием и хроническими низкими концентрациями соединения С (пять дней при 1 нМ), причем такое воздействие высоких-низких концентраций выбрано для моделирования фармакокинетического профиля соединения С в количестве 0,3 мг один раз каждые семь дней (Q7D). И наоборот,

более высокие хронические концентрации соединения С оказывали вредное воздействие на цитолитическую функцию.

[0120] Таким образом, исходя из результатов, показанных в настоящем документе, клеточные терапии, например, CAR-T-клеточные терапии, в комбинации с прерывистым (например, один раз каждые семь дней) введением дозы соединения С могут обеспечивать полезный терапевтический подход для предотвращения преждевременного истощения CAR-T-клеток, усиливая и продлевая функциональность Т-клеток и приводя к более сильному и устойчивому ответу при таких раках, как лимфома, при этом также снижая риск развития у пациента нейтропении, вторичной по отношению к остановке созревания нейтрофилов.

[0121] Согласно некоторым вариантам осуществления функция Т-клеток (включая функции, связанные с размножением, пролиферацией и персистенцией Т-клеток) сконструированной Т-клеточной терапии, вводимой в соответствии с предложенными способами, улучшается за счет соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления способы являются предпочтительными благодаря введению Т-клеточной терапии, такой как композиция, включающая в себя клетки для адоптивной клеточной терапии, например такой, как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки) в комбинации с соединением С. Согласно некоторым аспектам предложенные способы и применения обеспечивают или достигают улучшенных или более устойчивых ответов или эффективности по сравнению с некоторыми альтернативными способами. Согласно некоторым аспектам предложенные способы усиливают или модулируют пролиферацию и/или активность Т-клеточной активности, связанной с введением Т-клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующих Т-клеток). Согласно конкретным вариантам осуществления комбинированная терапия с соединением С может обеспечивать полезный терапевтический подход для усиления и продления активности CAR-T-клеток в отношении В-клеточных злокачественных новообразований путем модуляции микроокружения опухоли путем улучшения персистирующей противоопухолевой функции CAR-T-клеток.

[0122] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят субъекту через достаточный промежуток времени после прохождения лимфодеплецирующей терапии, так что миелосупрессивные эффекты соединения С и лимфодеплецирующей терапии сводятся к минимуму.

[0123] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы используют в то время, когда Т-клеточная терапия (например, CAR-T-клетки) может проявлять или будет с определенной вероятностью проявлять признаки истощения.

Согласно некоторым вариантам осуществления фенотип истощения становится очевидным после того, как количество Т-клеток, достигших пика размножения, начинает снижаться в крови субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способы воздействия или контакта Т-клеток Т-клеточной терапии (CAR-T-клетки) с соединением С осуществляют в то время, когда Т-клетки демонстрируют усиление гипофункционального или истощенного состояния по сравнению с моментом времени непосредственно перед воздействием на Т-клетки антигена (исходный уровень) или до момента времени, когда клетки подверглись воздействию антигена, но продолжают пролиферировать и еще не достигли пика размножения. Согласно некоторым вариантам осуществления усиление гипофункционального или истощенного состояния можно определять по повышенной экспрессии маркера истощения по сравнению с предыдущим более ранним моментом времени. Согласно некоторым вариантам осуществления усиление гипофункционального или истощенного состояния, такое как повышение экспрессии маркера истощения, происходит в момент времени после введения Т-клеточной терапии (например, CAR-T-клеток) субъекту, имеющему заболевание или состояние, ассоциированное с антигеном, на который нацелена Т-клеточная терапия. Т-клетки, такие как Т-клетки в периферической крови после введения субъекту, можно контролировать в отношении маркеров активации или истощения Т-клеток, таких как PD-1, TIM-3 и LAG-3.

[0124] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы требуют введения Т-клеточной терапии, например CAR-T-клеток, и начала введения соединения С в момент времени до того, как CAR-T-клетки проявят или будут с определенной вероятностью проявлять фенотип истощения. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в момент времени, когда CAR-T-клетки все еще размножаются или все еще способны размножаться. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в момент времени до или, как полагают, до появления пикового количества CAR-T-клеток в крови субъекта. Согласно некоторым аспектам начало введения соединения С в этот момент времени потенцирует функцию CAR-T-клеток. Согласно некоторым аспектам начало введения соединения С в этот момент времени также задерживает или предотвращает истощение CAR-T-клеток.

[0125] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в момент времени до, или, как полагают, до, или, вероятно, до того момента времени, или приблизительно в тот момент времени, когда в крови субъекта появляется пик CAR-T-клеток, например в течение 21 дня после начала введения Т-клеток. В некоторых случаях пик CAR-T-клеток появляется в течение 11-15 дней после введения

CAR-T-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в момент времени через 1-15 дней, например через 1 день, или 8 дней, или 15 дней или приблизительно через 1 день, или 8 дней, или 15 дней после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят в то время, когда у субъекта не проявляется тяжелая токсичность после введения клеточной терапии.

[0126] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы не приводят к высокой частоте или вероятности токсичности или токсических исходов или снижают частоту или вероятность токсичности или токсических исходов, таких как нейротоксичность (neurotoxicity, NT), синдром высвобождения цитокинов (CRS) или гематологическая токсичность, такая как нейтропения, например, по сравнению с некоторыми другими клеточными терапиями или схемами иммуномодулирующих препаратов.

[0127] Согласно некоторым вариантам осуществления способы не приводят к риску или не повышают риск определенной гематологической токсичности, такой как нейтропения или тромбоцитопения. Согласно некоторым вариантам осуществления не более чем 50% субъектов демонстрируют нейтропению выше степени 3, такую как продолжительная нейтропения степени 3 или нейтропения степени 4, и/или тромбоцитопению выше степени 3, такую как тромбоцитопения степени 3 или степени 4. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших лечение) не демонстрируют тяжелой нейтропении или тяжелой тромбоцитопении степени 3 или выше, чем степени 3.

[0128] Согласно некоторым вариантам осуществления способы не приводят к риску или не повышают риск тяжелой NT (sNT), тяжелого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, лихорадки с по меньшей мере 38 градусами Цельсия или приблизительно 38 градусами Цельсия в течение трех или более дней и уровнем CRP в плазме по меньшей мере 20 мг/дл или приблизительно 20 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления более чем или более чем приблизительно 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами, не демонстрируют какой-либо степени CRS или какой-либо степени нейротоксичности. Согласно некоторым вариантам осуществления не более чем 50% субъектов, получавших лечение (например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших

лечение), демонстрируют синдром высвобождения цитокинов (CRS) выше степени 2 и/или нейротоксичность выше степени 2. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом (например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших лечение), не демонстрируют тяжелый токсический исход (например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность), например не демонстрируют нейротоксичность степени 3 или выше и/или не демонстрируют тяжелый CRS, или не демонстрируют его в течение определенного периода времени после лечения, например в течение недели, двух недель или одного месяца после введения клеток.

[0129] Согласно некоторым аспектам не ожидается, что доза, время введения доз или количество доз вызовут тяжелую токсичность, такую как нейтропения степени 4 или тромбоцитопения степени 4. Согласно некоторым аспектам предложенные способы минимизируют или предотвращают токсичность после введения Т-клеточной терапии и/или соединения С субъекту, например при прерывистом введении доз соединения С. Согласно некоторым аспектам способы, предложенные в настоящем документе, предусматривают введение доз, которые по существу ниже и вводятся с меньшей частотой, чем дозы, которые можно использовать для соединения С в монотерапевтических подходах. Согласно некоторым аспектам способы, предложенные в настоящем документе, предусматривают введение меньшего количества доз, чем можно использовать для соединения С в монотерапевтических подходах. Согласно некоторым аспектам способы, предложенные в настоящем документе, предусматривают введение прерывистых доз соединения С с более длительными периодами времени между дозами соединения С, чем можно использовать для соединения С в монотерапевтических подходах.

[0130] В некоторых случаях соединение С вводят в то время, когда оно может эффективно/результативно стимулировать или примировать клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают при обнаружении или до обнаружения пикового или максимального уровня клеток клеточной терапии в крови субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы могут потенцировать Т-клеточную терапию, например CAR-Т-клеточную терапию, что согласно некоторым аспектам может улучшать исходы лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления способы особенно выгодны у субъектов, у которых клетки Т-клеточной терапии демонстрируют слабое размножение, стали истощенными, демонстрируют уменьшенную или сниженную персистенцию у субъекта и/или у субъектов, имеющих рак,

который является резистентным или рефрактерным к другим терапиям, и/или представляет собой агрессивный рак или рак высокого риска.

[0131] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта, получившего введение Т-клеточной терапии, например CAR-T-клетки, контролируют присутствие, отсутствие или уровень Т-клеток терапии у субъекта, например в биологическом образце субъекта, например в крови субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы приводят к генно-инженерной клетке с повышенной персистенцией и/или лучшей активностью у субъекта, которому ее вводят. Согласно некоторым вариантам осуществления персистенция генно-инженерных клеток, таких как CAR-экспрессирующие Т-клетки, у субъекта выше по сравнению с той, которая была бы достигнута с помощью альтернативных способов, таких как способы, предусматривающие введение Т-клеточной терапии, но в отсутствие введения соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления персистенция повышается по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз или более.

[0132] Согласно некоторым вариантам осуществления степень или величину персистенции вводимых клеток можно обнаружить или количественно оценить после введения субъекту. Например, согласно некоторым аспектам количественную ПЦР (кПЦР) используют для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток), в крови, или сыворотке или органе, или ткани (например, очаге заболевания) субъекта. Согласно некоторым аспектам персистенцию количественно оценивают как количество копий ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, например CAR, на микрограмм ДНК, или как количество клеток, экспрессирующих рецептор, например, экспрессирующих CAR, на микролитр образца, например крови или сыворотки, или на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), или белых кровяных клеток, или Т-клеток на микролитр образца. Согласно некоторым вариантам осуществления также можно проводить проточные цитометрические анализы, детектирующие клетки, экспрессирующие рецептор, обычно с использованием антител, специфических к рецепторам. Клеточные анализы также можно использовать для определения количества или процентной доли функциональных клеток, таких как клетки, способные связываться, и/или нейтрализовать, и/или индуцировать ответы, например цитотоксические ответы, в отношении клеток заболевания или состояния или экспрессирующих антиген, распознаваемый рецептором. Согласно любому из таких вариантов осуществления можно использовать величину или уровень экспрессии другого

маркера, ассоциированного с рекомбинантным рецептором (например, CAR-экспрессирующих клеток), для того, чтобы отличать вводимые клетки от эндогенных клеток субъекта.

[0133] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят в течение определенного периода времени для усиления, увеличения или оптимизации продолжительности ответа. Согласно некоторым аспектам предложенные способы основаны на наблюдениях о том, что субъекты, которые достигают или находятся в полной ремиссии (complete remission, CR) 3 месяца, с большей вероятностью сохраняют ответ в течение более длительного периода времени, например выживут или выживут без прогрессирования в течение более чем или более чем приблизительно трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев или двенадцати месяцев после окончания лечения или после первого достижения полного ответа (CR) после введения комбинированной терапии. Согласно некоторым аспектам способы осуществляют для введения соединения С, например, по конкретной прерывистой схеме введения доз, как описано, в течение периода времени, который составляет по меньшей мере 3 месяца или приблизительно три месяца после начала введения Т-клеточной терапии.

[0134] Согласно некоторым аспектам предложенные способы и применения обеспечивают или достигают улучшенных или более устойчивых ответов или эффективности по сравнению с некоторыми альтернативными способами, например способами, которые предусматривают введение Т-клеточной терапии или соединения С в виде монотерапии или без введения в виде комбинированной терапии вместе, как описано в настоящем документе, например, для конкретных групп субъектов, получавших лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления способы являются предпочтительными благодаря введению Т-клеточной терапии, такой как композиция, включающая в себя клетки для адоптивной клеточной терапии, например такой, как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и соединение С. Согласно некоторым вариантам осуществления такие ответы наблюдаются у пациентов с высоким риском и плохим прогнозом, например у тех, которые имеют заболевание высокого риска, например NHL высокого риска. Согласно некоторым аспектам способы лечат субъектов, имеющих форму агрессивной и/или с плохим прогнозом В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL), такой как NHL, которая имеет рецидив или является рефрактерной (R/R) к стандартной терапии или характеризуется плохим прогнозом. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты, получающие лечение в

соответствии с предложенными способами, имеют диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) или фолликулярную лимфому.

[0135] Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий, наборов или композиций, достигают полного ответа (CR). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется CR и демонстрирует минимальное остаточное заболевание (minimum residual disease, MRD). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется CR и является MRD-. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий, наборов или композиций, достигают объективного ответа частичного ответа (partial response, PR). Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий, наборов или композиций, достигают CR или PR через шесть месяцев, через семь месяцев, через восемь месяцев, через девять месяцев, через десять месяцев, через одиннадцать месяцев или через год после начала введения клеточной терапии.

[0136] Согласно некоторым вариантам осуществления через три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, десять месяцев, одиннадцать месяцев или двенадцать месяцев или более после начала введения клеточной терапии по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий, наборов или композиций, сохраняют ответ, например сохраняют CR или объективный ответ (OR). Согласно некоторым вариантам осуществления такой ответ, такой как CR или OR, устойчив в течение по меньшей мере трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев или более, например, у по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами, или у таких субъектов,

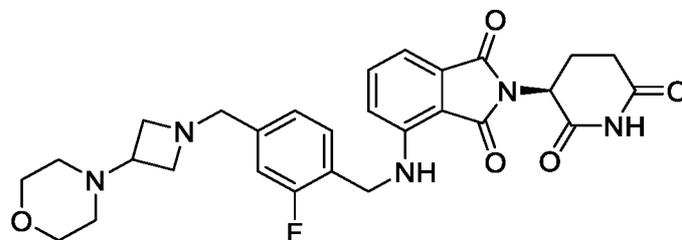
которые достигают CR через три месяца, четыре месяца, пять месяцев или шесть месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий, наборов или композиций, или таких субъектов, которые достигают CR через три месяца, четыре месяца, пять месяцев или шесть месяцев, выживают или выживают без прогрессирования в течение более чем или более чем приблизительно шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев или дольше.

[0137] Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упомянутые в настоящей заявке, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была отдельно включена посредством ссылки. Если определение, приведенное в настоящем документе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, приведенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в настоящий документ посредством ссылки, определение, приведенное в настоящем документе, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0138] Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены только для организационных целей и должны быть истолкованы как ограничивающие описываемый предмет изобретения.

I. Комбинированная терапия

[0139] В настоящем документе предложены способы и применения сконструированных клеток, таких как Т-клетки (например, CAR-Т-клетки), и (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона или соединения формулы I



(формула I),

или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата, гидрата, стереоизомера, таутомера или рацемических смесей (соединение C), включая его композиции, для лечения субъектов с раком. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предназначены для лечения субъекта с лимфомой. Согласно некоторым вариантам

осуществления лимфома представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование. Согласно некоторым аспектам лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL). Согласно некоторым вариантам осуществления рак, например лимфома, экспрессирует CD19. Согласно некоторым аспектам способы и применения обеспечивают или достигают улучшенного ответа и/или более устойчивых ответов или эффективности, например, в конкретных группах субъектов, получавших лечение, по сравнению с некоторыми альтернативными способами.

[0140] Способы получения соединения С описаны в патенте США 2019/0322647, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[0141] Согласно некоторым вариантам осуществления способы и применения предусматривают 1) введение субъекту клеточной терапии, которая включает в себя Т-клетки, экспрессирующие генно-инженерные рецепторы клеточной поверхности (например, рекомбинантные антигенные рецепторы), например химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), которые распознают антиген, экспрессируемый, ассоциированный и/или специфичный для лимфомы (например, В-клеточного злокачественного новообразования, такого как NHL) и/или типа клеток, из которого происходит лимфома, и 2) введение субъекту соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают после введения клеточной терапии (вслед за ним) или после начала введения клеточной терапии (вслед за ним). В некоторых случаях соединение С вводят субъекту, который получил введение клеточной терапии. Способы могут предусматривать введение одной или нескольких доз сконструированных клеток и более одной дозы соединения С субъекту.

[0142] Комбинированная терапия, например, включающая в себя сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), и соединение С или композиции, содержащие сконструированные клетки и/или соединение С, описанные в настоящем документе, полезны при различных терапевтических, диагностических и профилактических показаниях. Например, комбинации полезны в лечении различных заболеваний и нарушений у субъекта. Такие способы и применения охватывают терапевтические способы и применения, например, предусматривающие введение сконструированных клеток, соединения С и/или композиций, содержащих одно из двух или и то, и другое, субъекту, имеющему заболевание, состояние или нарушение, такое как опухоль или рак. Согласно некоторым вариантам осуществления сконструированные клетки, соединение С и/или композиции, содержащие одно из двух или и то, и другое, вводят в эффективном количестве для обеспечения лечения заболевания или нарушения. Применения

охватывают применения сконструированных клеток, соединения С и/или композиций, содержащих одно из двух или и то, и другое, в таких способах и видах лечения и в получении лекарственного средства, для того чтобы осуществлять такие терапевтические способы. Согласно некоторым вариантам осуществления способы осуществляют путем введения сконструированных клеток, соединения С и/или композиций, содержащих одно из двух или и то, и другое, субъекту, имеющему или, как полагают, имеющему заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления способы таким образом лечат заболевание, или состояние, или нарушение у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления сконструированные клетки представляют собой любые, описанные в разделе II.

[0143] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъекту, имеющему лимфому. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъекту, имеющему определенное В-клеточное злокачественное новообразование. В-клеточное злокачественное новообразование, подлежащее лечению, может быть любым, при котором экспрессия антигена связана с этиологией В-клеточного злокачественного новообразования и/или играет роль в ней, например вызывает, усугубляет или иным образом играет роль в В-клеточном злокачественном новообразовании. В качестве примеров В-клеточных злокачественных новообразований могут служить заболевания или состояния, ассоциированные со злокачественным новообразованием или трансформацией клеток (например, рак). Примеры антигенов, к которым относятся антигены, ассоциированные с различными В-клеточными злокачественными новообразованиями, которые можно лечить, описаны в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам осуществления химерный антигенный рецептор специфически связывается с антигеном, ассоциированным с заболеванием или состоянием. Согласно некоторым вариантам осуществления антигены, на которые нацелены рецепторы, включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, например любой из ряда известных маркеров В-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген экспрессируется В-клетками, включая человеческие В-клетки, или на них. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген представляет собой CD19, и химерный антигенный рецептор специфически связывает CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген CD19 представляет собой человеческий CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления лимфома содержит В-клетки,

экспрессирующие CD19. Понятно, что описание любого из способов, предложенных в настоящем документе, в которых CAR-экспрессирующие Т-клетки специфичны к CD19, также может быть выполнено путем нацеливания на другой антиген В-клеток или антиген, ассоциированный с клетками или экспрессируемый на клетках Т-клеточного злокачественного новообразования, такой как любой описанный выше.

[0144] Согласно некоторым вариантам осуществления В-клеточное злокачественное новообразование, подлежащее лечению, включает лейкоз и лимфому, например, острый миелоидный (или миелогенный) лейкоз (AML), хронический миелоидный (или миелогенный) лейкоз (CML), острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (chronic lymphocytic leukemia, CLL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), мантийноклеточную лимфому (MCL), лимфому маргинальной зоны, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (NHL), анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL), фолликулярную лимфому, рефрактерную фолликулярную лимфому и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование, выбранное из острого лимфобластного лейкоза (ALL), ALL взрослых, хронического лимфобластного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL) и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание или состояние представляет собой NHL, и NHL выбрана из группы, состоящей из агрессивной NHL, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), NOS (de novo и трансформированной из индолентной), первичной медиастинальной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (PMBCL), богатой Т-клетками/гистоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомы (TCHRBCL), лимфомы Беркитта, мантийноклеточной лимфомы (MCL) и/или фолликулярной лимфомы (FL), необязательно фолликулярной лимфомы степени 3В (FL3В).

[0145] Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают лечение субъекта, имеющего лимфому, такую как неходжкинская лимфома (NHL), путем введения экспрессирующих антигенный рецептор клеток (например, CAR-экспрессирующих клеток) и соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят после или вслед за введением рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток (например, CAR-экспрессирующих клеток), например после или вслед за началом введения рекомбинантных экспрессирующих рецептор клеток (например, CAR-экспрессирующих клеток).

[0146] Согласно некоторым вариантам осуществления NHL можно классифицировать на основе классификации Лугано (смотри, например, документы Cheson *et al.*, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5). В некоторых случаях стадии обозначаются римскими цифрами с I по IV (1-4) и лимфомы на локализованной стадии (I или II), поражающие орган вне лимфатической системы (экстранодальный орган) обозначаются E. Стадия I представляет собой поражение одного узла или группы соседних узлов или единичное экстранодальное поражение без поражения узла (IE). Стадия 2 представляет собой поражение двух или более групп узлов на одной стороне диафрагмы или стадию I или II по протяженности узлов с ограниченным смежным экстранодальным поражением (IIЕ). Стадия III представляет собой поражение узлов по обе стороны диафрагмы или узлов над диафрагмой с поражением селезенки. Стадия IV представляет собой поражение в дополнительных несмежных экстралимфатических поражениях. Кроме того, термин «массивное поражение» можно использовать для описания крупных опухолей грудной клетки, в частности для стадии II. Степень заболевания определяют с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) – компьютерной томографии (КТ) для авидных лимфом и КТ для неавидных гистологий.

[0147] Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать индекс общего состояния Восточной объединенной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) для оценки или выбора субъектов для лечения, например субъектов, у которых было плохое состояние при предшествующих терапиях (смотри, например, документ Oken *et al.* (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет статус по ECOG меньший или равный 1. Шкала общего состояния ECOG описывает уровень функционирования пациента с точки зрения его способности заботиться о себе, повседневной активности и физических способностей (например, ходьбы, работы и так далее). Согласно некоторым вариантам осуществления общее состояние 0 по ECOG указывает на то, что субъект может выполнять нормальную деятельность. Согласно некоторым аспектам субъекты с общим состоянием 1 по ECOG демонстрируют некоторые ограничения в физической активности, но субъект полностью ходячий. Согласно некоторым аспектам пациенты с общим состоянием 2 по ECOG более чем на 50% ходячие. В некоторых случаях субъект с общим состоянием 2 по ECOG также может быть способен к самообслуживанию; смотри, например, документ Sørensen *et al.*, (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775. Критерии, отражающие общее состояние по ECOG, описаны в таблице 1 ниже:

Таблица 1. Критерии общего состояния по ECOG	
Степень	Общее состояние по ECOG

0	Полностью активен, способен без ограничений продолжать все действия, предшествовавшие заболеванию
1	Ограничен в тяжелой физической деятельности, но ходячий и способен выполнять легкую работу или работу сидячего характера, например легкую работу по дому, офисную работу
2	Ходячий и способен к любому уходу за собой, но неспособен выполнять какую-либо трудовую деятельность; на ногах более 50% времени бодрствования
3	Способен лишь на ограниченный уход за собой; прикован к кровати или стулу более 50% времени бодрствования
4	Полностью нетрудоспособен; не может осуществлять какой-либо уход за собой; полностью прикован к кровати или стулу
5	Мертв

[0148] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта выявлена или была идентифицирована лимфома с двумя/тремя генетическими изменениями или лимфома с молекулярными подтипами двух/трех генетических изменений. Согласно некоторым вариантам осуществления лимфома представляет собой лимфому с двумя генетическими изменениями, характеризующуюся наличием перестроек (например, транслокаций) генов MYC (онкоген миелоцитоматоза), BCL2 (В-клеточная лимфома 2) и/или BCL6 (В-клеточная лимфома 6). Согласно некоторым вариантам осуществления лимфома представляет собой лимфому с тремя генетическими изменениями, характеризующуюся наличием перестроек генов MYC, BCL2 и BCL6; смотри, например, документ Aukema *et al.*, (2011) Blood 117:2319-2331. Согласно некоторым аспектам таких вариантов осуществления субъект характеризуется 0-1 по ECOG. Согласно аспектам для таких субъектов показана терапия и/или инструкции указывают введение субъекту из такой популяции. Согласно некоторым вариантам осуществления на основании критериев ВОЗ 2016 г. (Swerdlow *et al.*, (2016) Blood 127(20):2375-2390) лимфому с двумя/тремя генетическими изменениями можно считать В-клеточной лимфомой высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (с двумя/тремя генетическими изменениями).

[0149] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, которые плохо отвечают или с определенной вероятностью или по прогнозам будут плохо отвечать и/или которые не отвечают, с определенной вероятностью или по прогнозам не будут отвечать или не отвечают в течение

определенного времени и/или в определенной степени на лечение с помощью клеточной терапии (например, CAR+ Т-клетками). Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, которые не демонстрируют или с определенной вероятностью или по прогнозам не будут демонстрировать полный ответ или общий ответ, например, в течение 1 месяца, в течение двух месяцев или в течение трех месяцев после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, которые демонстрируют или с определенной вероятностью будут демонстрировать или по прогнозам будут демонстрировать прогрессирование заболевания (progressive disease, PD), например, в течение 1 месяца, двух месяцев или трех месяцев после введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект с определенной вероятностью или по прогнозам не будет демонстрировать ответ или определенный ответ исходя из множества субъектов, находящихся в аналогичном положении, которых таким же образом лечили или ранее лечили с помощью клеточной терапии.

[0150] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы предусматривают лечение конкретной группы или подгруппы субъектов, например субъектов, у которых выявлено заболевание высокого риска, например NHL высокого риска. Согласно некоторым аспектам способы лечат субъектов, имеющих форму агрессивной и/или с плохим прогнозом В-клеточной неходжкинской лимфомы (NHL), такой как NHL, которая рецидивирует или является рефрактерной (R/R) к стандартной терапии, имеет плохой прогноз. В некоторых случаях частота общего ответа (overall response rate, ORR) на доступные терапии, на стандарт лечения или на эталонную терапию для заболевания и/или популяции пациентов, для которых показана терапия, составляет менее чем 40%, и/или полный ответ (CR) менее чем 20%. Согласно некоторым вариантам осуществления при хеморефрактерной DLBCL ORR при эталонном или доступном лечении или стандартной терапии составляет приблизительно 26%, и CR составляет приблизительно 8% (Crump *et al.* Outcomes in refractory aggressive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): Results from the international SCHOLAR study. ASCO 2016 [Abstract 7516]). Согласно некоторым аспектам предложенные способы, композиции, применения и готовые изделия обеспечивают улучшенные и превосходные ответы на доступные терапии.

[0151] Согласно некоторым вариантам осуществления способы и применения для лечения субъектов, описанные в настоящем документе, предусматривают выбор или идентификацию конкретной группы или подгруппы субъектов, например, на основе конкретных типов заболевания, диагностических критериев, предшествующего лечения

и/или ответа на предшествующее лечение. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают лечение субъекта, у которого произошел рецидив после ремиссии после лечения с помощью одной или нескольких предшествующих терапий или он стал рефрактерным к ним; или субъект, который имеет рецидив или является рефрактерным (R/R) к одной или нескольким предшествующим терапиям, например одной или нескольким линиям стандартной терапии, включая описанные в настоящем документе.

[0152] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался более чем одной, двум, трем, четырем, пяти или шести предшествующим терапиям. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался одной предшествующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался приблизительно двум-четырем предшествующим терапиям. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался приблизительно пяти-шести предшествующим терапиям. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался более чем шести предшествующим терапиям.

[0153] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее подвергался лечению с помощью терапии или терапевтического средства, нацеленного на лимфому, например NHL, до введения клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее подвергался лечению с помощью клеточной терапии (например, CAR+ T-клеток). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее подвергался лечению с помощью трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT), например аллогенной HSCT или аутогенной HSCT. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта был плохой прогноз после лечения с помощью стандартной терапии, и/или одна или несколько линий предыдущей терапии оказались неэффективными. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект подвергался лечению или получал по меньшей мере, или приблизительно по меньшей мере, или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 других терапий для лечения NHL, отличных от лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект ранее подвергался лечению с помощью химиотерапии или лучевой терапии. Согласно некоторым аспектам субъект является рефрактерным или неотвечающим на другую терапию или терапевтическое средство. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет персистирующее или рецидивирующее заболевание, например, после лечения с помощью другой терапии или терапевтического вмешательства, включая химиотерапию или лучевую терапию.

[0154] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, у которых было прогрессирование заболевания на фоне предшествующего лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, у которых прекратился ответ на предыдущую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, у которых произошел рецидив после ремиссии после предшествующего лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, которые являются рефрактерными к предшествующему лечению. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированную терапию вводят субъектам, у которых наблюдается менее чем оптимальный ответ (например, полный ответ, частичный ответ или стабилизация заболевания) на предшествующую терапию.

[0155] Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты являются рефрактерными к последней предшествующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъектов наблюдается рецидив после последней предшествующей терапии. Статус является рефрактерным, если субъект достиг менее чем частичного ответа на последнюю предшествующую терапию. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты ранее проходили химиотерапию. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты являются хеморефрактерными к предшествующей химиотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты являются химиочувствительными к предшествующей терапии. Статус является хеморефрактерным, если субъект достиг стабилизации заболевания (stable disease, SD) или прогрессирования заболевания (PD) после последней предусматриваемой химиотерапии схемы или если у него возник рецидив менее чем через 12 месяцев после трансплантации аутологичных стволовых клеток. В противном случае статус является химиочувствительным.

[0156] Согласно некоторым вариантам осуществления предшествующее лечение или терапия включает в себя нацеленное на CD20 средство. Согласно некоторым вариантам осуществления предшествующее лечение или терапия включает в себя антрациклин. Согласно некоторым вариантам осуществления предшествующее лечение или терапия включает в себя клеточную терапию (например, Т-клеточную терапию, например CAR-T-клеточную терапию).

[0157] Согласно некоторым вариантам осуществления способы, применения и готовые изделия предусматривают, или используются для лечения субъектов, предусматривающего, выбор или идентификацию конкретной группы или подгруппы субъектов, например, на основе конкретных типов заболевания, диагностических

критериев, предшествующего лечения и/или ответа на предшествующее лечение, такой как любая описанная группа субъектов. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают воздействие на субъекта, имеющего рецидив после ремиссии после лечения с помощью одной или нескольких предшествующих терапий или он становится рефрактерным к ним; или субъекта, который имеет рецидив или является рефрактерным (R/R) к одной или нескольким предшествующим терапиям, например одной или нескольким линиям стандартной терапии, например клеточной терапии (например, CAR+ Т-клеткам). Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают лечение субъектов, имеющих диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL) без дополнительных уточнений (NOS; de novo и трансформированную из индолентной), первичную медиастинальную (тимическую) крупноклеточную В-клеточную лимфому (PMBCL) или фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В), EBV-положительную DLBCL или EBV-положительную NOS. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают лечение субъекта, который характеризуется общим состоянием в соответствии с Восточной объединенной онкологической группой (ECOG) менее чем 1, таким как 0-1. Согласно некоторым вариантам осуществления способы лечат популяцию с плохим прогнозом или из пациентов с DLBCL или относящихся к ней субъектов, которые обычно плохо отвечают на терапии или конкретные эталонные терапии, таких как имеющие одну или несколько, например две или три, хромосомные транслокации (например, так называемая лимфома «с двумя генетическими изменениями» или «с тремя генетическими изменениями», которая представляет собой В-клеточную лимфому высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL; имеющие транслокации локусов MYC/8q24, обычно в сочетании с хромосомной транслокацией гена t (14; 18) (q32; q21) bcl-2 или/и BCL6/3q27; смотри, например, документ Xu *et al.* (2013) Int J Clin Exp Pathol. 6(4): 788–794), и/или имеющие рецидив, необязательно рецидив в течение 12 месяцев, и/или признанные хеморефрактерными.

[0158] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет DLBCL, которая представляет собой DLBCL с клетками, подобными клеткам зародышевых центров (GCB). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет DLBCL с клетками, не подобными клеткам зародышевых центров (не GCB). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет лимфому с двумя генетическими изменениями (double-hit lymphoma, DHL). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет лимфому с тремя генетическими изменениями (triple-hit lymphoma, THL). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект положителен в отношении экспрессии гена,

указывающего на ответственность на лечение с помощью соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является отрицательным в отношении экспрессии гена. Смотри документ Blood 2017 130:4118.

[0159] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенный рецептор (например, CAR) специфически связывается с антигеном-мишенью, ассоциированным с заболеванием или состоянием, например ассоциированным с NHL. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген, ассоциированный с заболеванием или нарушением, выбран из CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген представляет собой CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления CD19 антиген представляет собой человеческий CD19.

[0160] Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают введение клеточной терапии и соединения С субъекту, который подвержен риску В-клеточного злокачественного новообразования или у которого подозревают его наличие.

[0161] Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают введение клеток выбранному субъекту или субъекту, идентифицированному как имеющий определенный прогноз или риск NHL. Неходжкинская лимфома (NHL) может представлять собой изменчивое заболевание. Некоторые субъекты с NHL могут выживать без лечения, тогда как другим может потребоваться немедленное вмешательство. В некоторых случаях субъектов с NHL можно разделять на группы, которые могут давать информацию о прогнозе заболевания и/или рекомендуемой стратегии лечения. В некоторых случаях этими группами могут быть группы «низкого риска», «среднего риска», «высокого риска» и/или «очень высокого риска», и пациенты могут быть разделены по ним в зависимости от ряда факторов, включая, но без ограничения, генетические аномалии и/или морфологические или физические характеристики. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектов, получающих лечение в соответствии с настоящими способами и/или готовыми изделиями или композициями, классифицируют или идентифицируют на основании риска NHL. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект субъектом является субъект с высоким риском NHL.

[0162] Согласно некоторым вариантам осуществления к субъектам, подлежащим лечению, относится группа субъектов с агрессивной NHL, в частности с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (DLBCL), без дополнительных уточнений (NOS; de novo и трансформированную из индолентной), богатой Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомой, первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомой (PMBCL),

фолликулярной лимфомой степени 3В (FL3В), EBV-положительной DLBCL, EBV-положительной NOS или В-клеточной лимфомой высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (лимфома «с двумя генетическими изменениями» или «с тремя генетическими изменениями»). Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание субъекта рецидивировало или было рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим линиям терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления предшествующая терапия включает в себя нацеленное на CD20 средство и/или антрациклин. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты характеризуются оценкой 0-1 по ECOG при скрининге. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты имеют положительное по позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) заболевание согласно классификации Лугано (Cheson, 2014). Согласно некоторым вариантам осуществления субъект мог, необязательно, ранее подвергаться лечению с помощью аллогенной трансплантации стволовых клеток (stem cell transplantation, SCT).

[0163] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является взрослым. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты являются мужчинами. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты являются женщинами. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектам по меньшей мере 40 лет на момент введения им комбинированной терапии (например, на момент введения им клеточной терапии). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектам менее 40 лет на момент введения им комбинированной терапии (например, на момент введения им клеточной терапии). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектам приблизительно 40-65 лет на момент введения им комбинированной терапии (например, на момент введения им клеточной терапии). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектам по меньшей мере 65 лет на момент введения им комбинированной терапии (например, на момент введения им клеточной терапии).

А. Введение клеточной терапии

[0164] Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут использоваться в сочетании с предложенными способами, композициями и готовыми изделиями и наборами. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации патентной заявки США № 2003/0170238, выданной Gruenberg *et al.*; патенте США № 4690915, выданном Rosenberg; документе Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). Смотри, например, документы 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.

[0165] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки для применения или введения в связи с предложенными способами содержат или сконструированы так, чтобы они содержали сконструированный рецептор, например сконструированный антигенный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR), или Т-клеточный рецептор (T cell receptor, TCR). Среди композиций есть фармацевтические композиции и составы для введения, например для адоптивной клеточной терапии. Также предложены терапевтические способы для введения клеток и композиций субъектам, например пациентам, в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций.

[0166] Клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как антигенные рецепторы, включая функциональные не представляющие собой TCR антигенные рецепторы, например химерные антигенные рецепторы (CAR), и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR). Также среди рецепторов есть другие химерные рецепторы. Примеры сконструированных клеток для введения в качестве клеточной терапии в предложенных способах описаны в разделе II.

[0167] Согласно некоторым вариантам осуществления клеточную терапию, например адоптивную Т-клеточную терапию, проводят с путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иначе получают от субъекта, который должен получать клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, согласно некоторым аспектам клетки получают от субъекта, например пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

[0168] Согласно некоторым вариантам осуществления клеточную терапию, например адоптивную Т-клеточную терапию, проводят путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иначе получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получать или который в конечном итоге получает клеточную терапию, например первого субъекта. Согласно таким вариантам осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например второму субъекту, того же вида. Согласно некоторым вариантам осуществления первый и второй субъекты генетически идентичны. Согласно некоторым вариантам осуществления первый и второй субъекты генетически схожи. Согласно некоторым вариантам осуществления второй субъект экспрессирует тот же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

[0169] Клетки Т-клеточной терапии можно вводить в композиции, составленной для введения, или, альтернативно, в более чем одной композиции (например, двух

композициях), составленных для отдельного введения. Доза(ы) клеток может(гут) включать в себя определенное количество или относительное количество клеток или сконструированных клеток и/или определенное соотношение или композиции двух или более подтипов в композиции, таких как CD4 и CD8 Т-клетки.

[0170] Клетки можно вводить любым подходящим способом, например с помощью болюсной инфузии, с помощью инъекции, например внутривенной или подкожной инъекций, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, трансептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахориоидальной инъекции, интракамеральной инъекции, подконъюнктивальной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или постериорной юкстасклеральной доставки. Согласно некоторым вариантам осуществления их вводят с помощью парентерального, внутрилегочного и интраназального и, если желательно для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления заданную дозу вводят путем однократного болюсного введения клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления ее вводят путем многократного болюсного введения клеток, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления введение дозы клеток или любых дополнительных терапий, например лимфодеплецирующей терапии, интервенционной терапии и/или комбинированной терапии, осуществляют посредством доставки в амбулаторных условиях.

[0171] Для лечения заболевания соответствующая дозировка может зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа клеток или рекомбинантных рецепторов, тяжести и течения заболевания, предыдущей терапии, клинической истории субъекта и его ответа на клетки и усмотрения лечащего врача. Композиции и клетки согласно некоторым вариантам осуществления целесообразно вводить субъекту за один раз или в течение курса лечения.

[0172] Предварительное кондиционирование субъектов иммунодеплецирующими (например, лимфодеплецирующими) терапиями согласно некоторым аспектам может улучшать эффекты адоптивной клеточной терапии (adoptive cell therapy, АСТ).

[0173] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают введение средства для предварительного кондиционирования, такого как лимфодеплецирующее или химиотерапевтическое средство, такое как

циклофосфамид, флударабин или их комбинации, субъекту до начала клеточной терапии. Например, субъекту можно вводить средство для предварительного кондиционирования по меньшей мере за 2 дня, например по меньшей мере за 3, 4, 5, 6 или 7 дней, до начала клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят средство для предварительного кондиционирования не более чем за 7 дней, например не более чем за 6, 5, 4, 3 или 2 дня, до начала клеточной терапии.

[0174] Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта предварительно кондиционируют циклофосфамидом в дозе между или между приблизительно 20 мг/кг и 100 мг/кг, например между или между приблизительно 40 мг/кг и 80 мг/кг. Согласно некоторым аспектам субъекта предварительно кондиционируют с помощью или с помощью приблизительно 60 мг/кг циклофосфамида. Согласно некоторым вариантам осуществления циклофосфамид можно вводить в виде однократной дозы или можно вводить в виде нескольких доз, например вводимых ежедневно, через день или каждые три дня. Согласно некоторым вариантам осуществления циклофосфамид вводят один раз в день в течение одного или двух дней. Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых лимфодеплецирующее средство содержит циклофосфамид, субъекту вводят циклофосфамид в дозе между или между приблизительно 100 мг/м² и 500 мг/м², например между или между приблизительно 200 мг/м² и 400 мг/м², или 250 мг/м² и 350 мг/м² включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 500 мг/м² циклофосфамида. Согласно некоторым вариантам осуществления циклофосфамид можно вводить в виде однократной дозы или можно вводить в виде нескольких доз, например вводимых ежедневно, через день или каждые три дня. Согласно некоторым вариантам осуществления циклофосфамид вводят ежедневно, например в течение 1-5 дней, например в течение от 3 до 5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 300 мг/м² циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 500 мг/м² циклофосфамида ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

[0175] Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых лимфодеплецирующее средство содержит флударабин, субъекту вводят флударабин в дозе между или между приблизительно 1 мг/м² и 100 мг/м², например между или между приблизительно 10 мг/м² и 75 мг/м², 15 мг/м² и 50 мг/м², 20 мг/м² и 40 мг/м² или 24 мг/м² и 35 мг/м² включительно. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина. Согласно некоторым вариантам осуществления флударабин можно вводить в виде однократной дозы или можно вводить в виде нескольких доз, например вводимых

ежедневно, через день или каждые три дня. Согласно некоторым вариантам осуществления флударабин вводят ежедневно, например в течение 1-5 дней, например в течение от 3 до 5 дней. В некоторых случаях субъекту вводят приблизительно 30 мг/м² флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

[0176] Согласно некоторым вариантам осуществления лимфодеплецирующее средство содержит комбинацию средств, такую как комбинация циклофосфамида и флударабина. Таким образом, комбинация средств может включать в себя циклофосфамид в любой дозе или с любой схемой введения, такой как описанные выше, и флударабин в любой дозе или с любой схемой введения, такой как описанные выше. Например, согласно некоторым аспектам субъекту вводят 60 мг/кг (~2 г/м²) циклофосфамида и от 3 до 5 доз по 25 мг/м² флударабина перед первой или последующей дозой. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят 300 мг/м² циклофосфамида и 30 мг/м² флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят 500 мг/м² циклофосфамида и 30 мг/м² флударабина ежедневно в течение 3 дней до начала клеточной терапии.

[0177] После введения клеток измеряют биологическую активность популяций сконструированных клеток согласно некоторым вариантам осуществления, например, с помощью любого из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например по визуализации, или *ex vivo*, например по ELISA или проточной цитометрии. Согласно определенным вариантам осуществления способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерять с использованием любых подходящих известных способов, таких как анализы цитотоксичности, описанные, например, в документах Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), и Herman *et al.* *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). Согласно определенным вариантам осуществления биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD107a, IFN γ , IL-2 и TNF. Согласно некоторым аспектам биологическую активность измеряют путем анализа клинического исхода, такого как снижение опухолевой массы или нагрузки.

1. Композиции и составы

[0178] Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия, включающая в себя клетки, сконструированные с рекомбинантным антигенным рецептором, например CAR или TCR, предложена в виде композиции или состава, таких как фармацевтические композиция или состав. Такие

композиции можно использовать в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций, например, при лечении В-клеточного злокачественного новообразования.

[0179] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

[0180] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

[0181] Согласно некоторым вариантам осуществления клеточную терапию, такую как сконструированные Т-клетки (например, CAR-T-клетки), составляют с фармацевтически приемлемым носителем. Согласно некоторым аспектам выбор носителя частично определяется конкретной клеткой или средством и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты. Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. Согласно некоторым аспектам используют смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% по весу от всей композиции. Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители, как правило, нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол, и м-крезол); низкомолекулярные (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 средства, такие как ЭДТА; сахара, такие

как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

[0182] Согласно некоторым аспектам в композиции включены буферные средства. Подходящие буферные средства включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и различные другие кислоты и соли. Согласно некоторым аспектам используют смесь двух или более буферных средств. Буферное средство или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% по весу от всей композиции. Известны способы получения фармацевтических композиций, пригодных для введения. Примеры способов описаны более подробно, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

[0183] Составы могут включать водные растворы. Состав или композиция может также содержать более чем один активный ингредиент, применимый при конкретном показании, заболевании или состоянии, которое лечат с помощью клеток или средств, причем соответствующие активности не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные ингредиенты, соответственно, присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает в себя другие фармацевтически активные средства или препараты, такие как химиотерапевтические средства, например аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубицин, доксорубицин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкрестин и так далее.

[0184] Фармацевтическая композиция согласно некоторым вариантам осуществления содержит клетки в количествах, эффективных для лечения заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую эффективность согласно некоторым вариантам осуществления контролируют путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть полезны и могут быть определены другие схемы дозирования. Желаемая дозировка может быть доставлена путем однократного болюсного введения композиции, путем многократного болюсного введения композиции или путем непрерывного инфузионного введения композиции.

[0185] Клетки можно вводить с использованием стандартных методов, составов и/или устройств для введения. Предложены составы и устройства, такие как шприцы и флаконы, для хранения и введения композиций. Что касается клеток, введение может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или предшественники могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунореактивные клетки, полученные из периферической крови, или их потомство (например, полученное *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) можно вводить посредством локализованной инъекции, включая катетерное введение, системную инъекцию, локализованную инъекцию, внутривенную инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированные иммунореактивные клетки) ее обычно составляют в стандартной инъекционной лекарственной форме (раствор, суспензия, эмульсия).

[0186] К составам относятся составы для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, сублингвального или суппозиторного введения. Согласно некоторым вариантам осуществления средство или популяции клеток вводят парентерально. Термин «парентеральный» при использовании в настоящем документе охватывает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления средство или популяции клеток вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

[0187] Композиции согласно некоторым вариантам осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, например изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые могут согласно некоторым аспектам быть забуферены до выбранного рН. Жидкие препараты обычно легче готовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. С другой стороны, вязкие композиции могут быть составлены в соответствующем диапазоне вязкости, чтобы обеспечивать более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

[0188] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения клеток в растворитель, например, в смеси с подходящим носителем, разбавителем или вспомогательным веществом, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза или аналогичные среды.

[0189] Составы для использования для введения *in vivo* обычно стерильны. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

2. Введение доз

[0190] Согласно некоторым вариантам осуществления дозу клеток вводят субъектам в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций. Согласно некоторым вариантам осуществления размер или время введения доз определяют в зависимости от конкретного заболевания или состояния (например, рака, например В-клеточного злокачественного новообразования) у субъекта. В некоторых случаях размер или время введения доз для конкретного заболевания можно определять эмпирически с учетом представленного описания.

[0191] Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток содержит между 2×10^5 или приблизительно 2×10^5 клеток на кг и 2×10^6 или приблизительно 2×10^6 клеток на кг, например между 4×10^5 или приблизительно 4×10^5 клеток на кг и 1×10^6 или приблизительно 1×10^6 клеток на кг или между 6×10^5 или приблизительно 6×10^5 клеток на кг и 8×10^5 или приблизительно 8×10^5 клеток на кг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток содержит не более чем 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм веса тела субъекта (клеток на кг), например не более чем 3×10^5 или приблизительно 3×10^5 клеток на кг, не более чем 4×10^5 или приблизительно 4×10^5 клеток на кг, не более чем 5×10^5 или приблизительно 5×10^5 клеток на кг, не более чем 6×10^5 или приблизительно 6×10^5 клеток на кг, не более чем 7×10^5 или приблизительно 7×10^5 клеток на кг, не более чем 8×10^5 или приблизительно 8×10^5 клеток на кг, не более чем 9×10^5 или приблизительно 9×10^5 клеток на кг, не более чем 1×10^6 или приблизительно 1×10^6 клеток на кг или не более чем 2×10^6 или приблизительно 2×10^6 клеток на кг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток содержит по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 2×10^5 клеток (например, экспрессирующих антиген, таких как CAR-экспрессирующие клетки) на килограмм веса тела субъекта (клеток на кг), например по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 3×10^5 клеток на кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 4×10^5 клеток на кг,

по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 5×10^5 клеток на кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 6×10^5 клеток на кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 7×10^5 клеток на кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 8×10^5 клеток на кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 9×10^5 клеток на кг, по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 1×10^6 клеток на кг или по меньшей мере, или по меньшей мере приблизительно, или точно, или приблизительно 2×10^6 клеток на кг.

[0192] Согласно определенным вариантам осуществления клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от приблизительно одного миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или в этом количестве клеток на килограмм веса тела, таком как, например, 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 в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений), таком как приблизительно от 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 в диапазоне, определяемом любыми двумя из предыдущих значений) 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 в любом значении между этими диапазонами и/или на килограмм веса тела. Дозировки можно изменять в зависимости от особенностей заболевания или нарушения и/или пациента и/или других типов лечения.

[0193] Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток представляет собой базовую дозу клеток или фиксированную дозу клеток, так что доза клеток не привязана и не основана на площади поверхности тела или весе субъекта.

[0194] Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых, например, субъект является человеком, доза включает в себя менее чем приблизительно 5×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, Т-клеток или моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), например в диапазоне от приблизительно 1×10^6 до 5×10^8 таких клеток, например всего 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 или 4×10^8 таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых субъект является человеком, доза включает в себя между приблизительно 1×10^6 и 3×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток, например в диапазоне от приблизительно 1×10^7 до 2×10^8 таких клеток, например 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 или $1,5 \times 10^8$ всех таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любых из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток предусматривает введение от или от приблизительно 1×10^5 до 5×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например CAR) Т-клеток или всех Т-клеток, 1×10^5 до 1×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например CAR) Т-клеток или всех Т-клеток, от или от приблизительно 5×10^5 до 1×10^7 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например CAR) Т-клеток или всех Т-клеток, или от или от приблизительно 1×10^6 до 1×10^7 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например CAR) Т-клеток или всех Т-клеток, все включительно.

[0195] Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клетки дозы включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или CD4+ и CD8+ Т-клетки.

[0196] Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых, например, субъект является человеком, CD8+ Т-клетки дозы, при включении в дозу CD4+ и CD8+ Т-клеток, включают в себя между приблизительно 1×10^6 и 1×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD8+ клеток, например, в диапазоне от приблизительно 5×10^6 до 1×10^8 таких клеток, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$ или 1×10^8 всех таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любых из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток предусматривает введение от или от

приблизительно 1×10^7 до $0,75 \times 10^8$ всех экспрессирующих рекомбинантных рецептор CD8+ Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^7$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, от или от приблизительно 1×10^7 до $0,75 \times 10^8$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток, все включительно. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток предусматривает введение точно или приблизительно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$ или 1×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD8+ Т-клеток.

[0197] Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых, например, субъект является человеком, CD4+ Т-клетки дозы, при включении в дозу CD4+ и CD8+ Т-клеток, включают в себя между приблизительно 1×10^6 и 1×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) CD4+ клеток, например, в диапазоне от приблизительно 5×10^6 до 1×10^8 таких клеток, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$ или 1×10^8 всех таких клеток, или в диапазоне между любыми двумя из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят несколько доз, и каждая из доз или общая доза может находиться в пределах любых из предыдущих значений. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток предусматривает введение от или от приблизительно 1×10^7 до $0,75 \times 10^8$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^7$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток, от или от приблизительно 1×10^7 до $0,75 \times 10^8$ всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток, все включительно. Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток предусматривает введение точно или приблизительно 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$ или 1×10^8 всех экспрессирующих рекомбинантный рецептор CD4+ Т-клеток.

[0198] Согласно некоторым вариантам осуществления дозу клеток, например экспрессирующих рекомбинантный рецептор Т-клеток, вводят субъекту в виде однократной дозы или вводят только один раз в течение периода, составляющего две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев, 1 год или более.

[0199] В контексте адоптивной клеточной терапии введение заданной «дозы» охватывает введение заданного количества или числа клеток в виде одной композиции и/или однократного непрерывного введения, например в виде однократной инъекции или непрерывной инфузии, и также охватывает введение заданного количества или числа клеток в виде разделенной дозы или в виде нескольких композиций, представленных в виде нескольких отдельных композиций или инфузий, в течение определенного периода времени, например, в течение не более 3 дней. Таким образом, в некоторых контекстах доза представляет собой однократное или непрерывное введение указанного количества

клеток, осуществленное или начатое в один момент времени. В некоторых контекстах, однако, дозу вводят в виде нескольких инъекций или инфузий в течение периода не более трех дней, например, один раз в день в течение трех дней или в течение двух дней, или путем нескольких инфузий в течение однодневного периода.

[0200] Таким образом, согласно некоторым аспектам клетки дозы вводят в одной фармацевтической композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки дозы вводят в нескольких композициях, вместе содержащих клетки дозы.

[0201] Согласно некоторым вариантам осуществления термин «разделенная доза» относится к дозе, которую разделяют таким образом, что ее вводят в течение более чем одного дня. Этот тип дозирования охватывается настоящими способами и считается однократной дозой.

[0202] Таким образом, доза клеток может быть введена в виде разделенной дозы, например разделенной дозы, вводимой с течением времени. Например, согласно некоторым вариантам осуществления дозу можно вводить субъекту в течение 2 дней или 3 дней. Примерами способов разделенного введения доз служат введение 25% дозы в первый день и введение остальных 75% дозы во второй день. Согласно другим вариантам осуществления 33% дозы можно вводить в первый день, и остальные 67% вводить во второй день. Согласно некоторым аспектам 10% дозы вводят в первый день, 30% дозы вводят во второй день, и 60% дозы вводят в третий день. Согласно некоторым вариантам осуществления разделенную дозу не распределяют более чем на 3 дня.

[0203] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки дозы можно вводить путем введения нескольких композиций или растворов, таких как первый и второй, необязательно больше, причем каждый содержит некоторое количество клеток дозы. Согласно некоторым аспектам несколько композиций, причем все содержат различные популяции и/или подтипы клеток, вводят по отдельности или независимо, необязательно в течение определенного периода времени. Например, популяции или подтипы клеток могут включать $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки, соответственно, и/или обогащенные $CD8^+$ и $CD4^+$ популяции, соответственно, например $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клетки, причем каждая по отдельности включает в себя клетки, генетически сконструированные для экспрессии рекомбинантного рецептора. Согласно некоторым вариантам осуществления введение дозы содержит введение первой композиции, содержащей дозу $CD8^+$ Т-клеток или дозу $CD4^+$ Т-клеток, и введение второй композиции, содержащей другую дозу из дозы $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-клеток.

[0204] Согласно некоторым вариантам осуществления введение композиции или дозы, например введение нескольких композиций клеток, включает в себя введение

композиций клеток по отдельности. Согласно некоторым аспектам отдельное введение осуществляют одновременно или последовательно в любом порядке. Согласно некоторым вариантам осуществления доза содержит первую композицию и вторую композицию, и первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов. Согласно некоторым вариантам осуществления начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час или не более чем 30 минут, с интервалом не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут. Согласно некоторым вариантам осуществления начало и/или завершение введения первой композиции и завершение и/или начало введения второй композиции осуществляют с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час или не более чем 30 минут, с интервалом не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут.

[0205] Согласно некоторым вариантам осуществления первую композицию и вторую композицию смешивают перед введением субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления первую композицию и вторую композицию смешивают незадолго (например, в пределах 6 часов, 5 часов, 4 часов, 3 часов, 2 часов, 1,5 часов, 1 часа или 0,5 часа) до введения. Согласно некоторым вариантам осуществления первую композицию и вторую композицию смешивают непосредственно перед введением.

[0206] 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. Согласно некоторым вариантам осуществления первую композицию вводят до второй композиции.

[0207] Согласно некоторым вариантам осуществления доза или композиция клеток включает определенное или целевое соотношение CD4⁺ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и CD8⁺ клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, и/или CD4⁺ клеток и CD8⁺ клеток, причем это соотношение, необязательно, составляет приблизительно 1:1 или составляет от приблизительно 1:3 до приблизительно 3:1, например приблизительно 1:1. Согласно некоторым аспектам введение композиции или дозы с целевым или желаемым соотношением различных популяций клеток (таким как соотношение CD4⁺:CD8⁺ или соотношение CAR⁺CD4⁺:CAR⁺CD8⁺, например 1:1) предусматривает введение композиции клеток, содержащей одну из популяций, и затем введение отдельной композиции клеток, содержащей другую из популяций, причем введение осуществляют при целевом или желательном соотношении или приблизительно при нем. Согласно некоторым аспектам введение дозы или композиции клеток при

определенном соотношении приводит к улучшению размножения, персистенции и/или противоопухолевой активности Т-клеточной терапии.

[0208] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получает несколько доз, например две или более доз или несколько последующих доз, клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту вводят две дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получает 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 день после первой дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления несколько последующих доз вводят после первой дозы, так что дополнительные дозу или дозы вводят после введения последующей дозы. Согласно некоторым аспектам количество клеток, вводимых субъекту в дополнительной дозе, такое же как в первой дозе и/или последующей дозе или аналогичное. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные доза или дозы больше, чем предшествующие дозы.

[0209] Согласно некоторым аспектам размер первой и/или последующей дозы определяют исходя из одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например химиотерапию, бремя заболевания у субъекта, такое как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, величина или тип метастазов, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических исходов, например CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина на вводимые клетки и/или рекомбинантные рецепторы.

[0210] Согласно некоторым аспектам время между введением первой дозы и введением последующей дозы составляет от приблизительно 9 до приблизительно 35 дней, от приблизительно 14 до приблизительно 28 дней, или от 15 до 27 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления введение последующей дозы происходит в момент времени через более чем приблизительно 14 дней после и через менее чем приблизительно 28 дней после введения первой дозы. Согласно некоторым аспектам время между первой и последующей дозами составляет приблизительно 21 день. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительные дозу или дозы, например последующие дозы, вводят после введения последующей дозы. Согласно некоторым аспектам дополнительные последующие дозу или дозы вводят через по меньшей мере приблизительно 14 и через менее чем приблизительно 28 дней после введения предшествующей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительную дозу вводят через менее чем приблизительно 14 дней после предшествующей дозы, например через 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 дней после предшествующей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления никакую дозу не вводят через менее чем

приблизительно 14 дней после предшествующей дозы, и/или никакую дозу не вводят через более чем приблизительно 28 дней после предшествующей дозы.

[0211] Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток, например, экспрессирующих рекомбинантный рецептор клеток, содержит две дозы (например, двойную дозу), содержащие первую дозу Т-клеток и последующую дозу Т-клеток, причем одна или обе из первой дозы и второй дозы содержат введение разделенной дозы Т-клеток.

[0212] Согласно некоторым вариантам осуществления доза клеток обычно достаточно велика, чтобы эффективно снижать бремя заболевания.

[0213] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки вводят в желаемой дозировке, которая согласно некоторым аспектам включает в себя желаемую дозу или количество клеток или типов клеток и/или желаемое соотношение типов клеток. Таким образом, дозировка клеток согласно некоторым вариантам осуществления основана на общем количестве клеток (или количестве на кг веса тела) и желаемом соотношении отдельных популяций или подтипов, таком как соотношение CD4⁺ и CD8⁺. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка клеток основана на желаемом общем количестве (или количестве на кг веса тела) клеток в отдельных популяциях или отдельных типах клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка основана на комбинации таких характеристик, как желаемое количество всех клеток, желаемое соотношение и желаемое общее количество клеток в отдельных популяциях.

[0214] Согласно некоторым вариантам осуществления популяции или подтипы клеток, такие как CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки, вводят на уровне желаемой дозы всех клеток, такой как желаемая доза Т-клеток, или в пределах ее допустимого несовпадения. Согласно некоторым аспектам желаемая доза представляет собой желаемое количество клеток или желаемое количество клеток на единицу веса тела субъекта, которому вводят клетки, например клетки на кг. Согласно некоторым аспектам желаемая доза равна или превышает минимальное количество клеток или минимальное количество клеток на единицу веса тела. Согласно некоторым аспектам среди всех клеток, вводимых в желаемой дозе, отдельные популяции или подтипы присутствуют при желаемом итоговом соотношении (таком как соотношение CD4⁺ и CD8⁺) или близко к нему, например в пределах определенного допустимого несовпадения или ошибки такого соотношения.

[0215] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки вводят на уровне желаемой дозы одной или нескольких отдельных популяций или подтипов клеток, такой как желаемая доза CD4⁺ клеток и/или желаемая доза CD8⁺ клеток, или в пределах ее допустимого несовпадения. Согласно некоторым аспектам желаемая доза представляет

собой желаемое количество клеток или желаемое количество клеток подтипа или популяции или желаемое количество таких клеток на единицу веса тела субъекта, которому вводят клетки, например клетки на кг. Согласно некоторым аспектам желаемая доза равна или превышает минимальное количество клеток популяции или подтипа или минимальное количество клеток популяции или подтипа на единицу веса тела.

[0216] Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления дозировка основана на желаемой фиксированной дозе всех клеток и желаемом соотношении и/или основана на желаемой фиксированной дозе одного или нескольких, например всех, отдельных подтипов или субпопуляций. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления дозировка основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе Т-клеток и желаемом соотношении CD4⁺ и CD8⁺ клеток и/или основана на желаемой фиксированной или минимальной дозе CD4⁺ и/или CD8⁺ клеток.

[0217] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки вводят на уровне желаемого итогового соотношения нескольких популяций или подтипов клеток, таких как CD4⁺ и CD8⁺ клетки или подтипы, или в пределах его допустимого диапазона. Согласно некоторым аспектам желаемое соотношение может представлять собой конкретное соотношение или может представлять собой диапазон соотношений. Например, согласно некоторым вариантам осуществления желаемое соотношение (например, соотношение CD4⁺ и CD8⁺ клеток) составляет между 1:5 или приблизительно 1:5 и 5:1 или приблизительно 5:1 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 5:1), или между 1:3 или приблизительно 1:3 и 3:1 или приблизительно 3:1 (или более чем приблизительно 1:3 и менее чем приблизительно 3:1), например между 2:1 или приблизительно 2:1 и 1:5 или приблизительно 1:5 (или более чем приблизительно 1:5 и менее чем приблизительно 2:1, например точно 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. Согласно некоторым аспектам допустимое несовпадение 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 желаемого соотношения, включая любое значение в этих диапазонах.

[0218] Согласно конкретным вариантам осуществления количества и/или концентрации клеток относятся к количеству экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR) клеток. Согласно другим вариантам осуществления количества

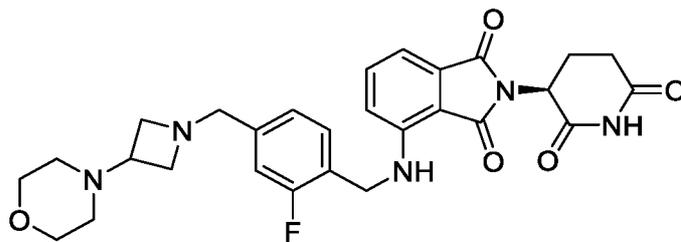
и/или концентрации клеток относятся к количеству или концентрации всех вводимых клеток, Т-клеток или мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС).

[0219] Согласно некоторым аспектам размер дозы определяют исходя из одного или нескольких критериев, таких как ответ субъекта на предшествующее лечение, например химиотерапию, время заболевания у субъекта, такое как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, величина или тип метастазов, стадия и/или вероятность или частота развития у субъекта токсических исходов, например CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина на вводимые клетки и/или рекомбинантные рецепторы.

[0220] Согласно некоторым вариантам осуществления способы также предусматривают введение одной или нескольких дополнительных доз клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), и/или лимфодеплецирующей терапии, и/или повторяют одну или нескольких стадий способов. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько дополнительных доз совпадают с начальной дозой. Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько дополнительных доз отличаются от начальной дозы, например, выше, например в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или более выше чем начальная доза, или ниже, например выше, например в 2 раза, 3 раза, 4 раз, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз или более ниже, чем начальная доза. Согласно некоторым вариантам осуществления введение одной или нескольких дополнительных доз определяют на основании ответа субъекта на начальное лечение или любое предшествующее лечение, времени заболевания у субъекта, такого как опухолевая нагрузка, объем, размер или степень, величины или типа метастазов, стадии и/или вероятности или частоты развития у субъекта токсических исходов, например CRS, синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, нейротоксичности и/или иммунного ответа хозяина на вводимые клетки и/или рекомбинантные рецепторы.

В. Введение соединения С

[0221] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов или готовых изделий, предложенных в настоящем документе, комбинированная терапия включает в себя введение соединения С, имеющего химическое название (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, и/или который имеет структуру формулы I:



(формула I),

или его энантиомера или смеси энантиомеров, или его фармацевтически приемлемых соли, сольвата, гидрата, сокристалла, клатрата или полиморфа.

[0222] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой энантиомер или смесь энантиомеров (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона или фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой сольват (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой гидрат (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой фармацевтически приемлемую соль (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С имеет структуру формулы I.

[0223] Согласно определенным вариантам осуществления соединение С представляет собой твердое вещество. Согласно определенным вариантам осуществления соединение С является гидратированным. Согласно определенным вариантам осуществления соединение С является сольватированным. Согласно определенным вариантам осуществления соединение С является безводным. Согласно определенным вариантам осуществления соединение С является негигроскопичным.

[0224] Согласно определенным вариантам осуществления соединение С является аморфным. Согласно определенным вариантам осуществления соединение С является кристаллическим.

[0225] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой фармацевтически приемлемую соль (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-

((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. При использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, полученной из фармацевтически приемлемых нетоксичных кислоты или основания, включая неорганические кислоту и основание и органические кислоту и основание. Подходящие фармацевтически приемлемые соли присоединения основания соединения С включают соли металлов, полученные из алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия и цинка, или органические соли, полученные из лизина, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, холина, диэтаноламина, этилендиамина, меглюмина (N-метилглюкамина) и прокаина. Подходящие нетоксичные кислоты включают неорганические и органические кислоты, такие как уксусная, альгиновая, антраниловая, бензолсульфоновая, бензойная, камфорсульфоновая, лимонная, этенсульфоновая, муравьиная, фумаровая, фуранкарбоновая, галактурононовая, глюконовая, глюкуроновая, глутаминовая, гликолевая, бромистоводородная, соляная, изетионовая, молочная, малеиновая, яблочная, миндальная, метансульфоновая, слизевая, азотная, памоевая, пантотеновая, фенилуксусная, фосфорная, пропионовая, салициловая, стеариновая, янтарная, сульфаниловая, серная, винная кислота и п-толуолсульфоновая кислота. Другие соединения хорошо известны в данной области техники, смотри например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th eds., Mack Publishing, Easton PA (1990) или Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th eds., Mack Publishing, Easton PA (1995).

[0226] Согласно определенным вариантам осуществления соединение С представляет собой хлористоводородную соль (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона или ее энантиомер или смесь энантиомеров; или ее фармацевтически приемлемый сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф. Согласно определенным вариантам осуществления хлористоводородная соль является твердой. Согласно определенным вариантам осуществления хлористоводородная соль является безводной. Согласно определенным вариантам осуществления хлористоводородная соль является негигроскопичной. Согласно определенным вариантам осуществления хлористоводородная соль является аморфной. Согласно определенным вариантам осуществления хлористоводородная соль является кристаллической.

[0227] При использовании в настоящем документе, и если не указано иное, термин «стереоизомер» или «стереомерно чистый» означает один стереоизомер соединения, который по существу свободен от других стереоизомеров этого соединения. Например, стереомерно чистое соединение, содержащее один хиральный центр, будет по существу

свободно от противоположного энантиомера соединения. Стеремерно чистое соединение, содержащее два хиральных центра, будет по существу свободно от других диастереомеров соединения. Типичное стеремерно чистое соединение содержит более чем приблизительно 80% по весу одного стереоизомера соединения и менее чем приблизительно 20% по весу других стереоизомеров соединения, более чем приблизительно 90% по весу одного стереоизомера соединения и менее чем приблизительно 10% по весу других стереоизомеров соединения, более чем приблизительно 95% по весу одного стереоизомера соединения и менее чем приблизительно 5% по весу других стереоизомеров соединения или более чем приблизительно 97% по весу одного стереоизомера соединения и менее чем приблизительно 3% по весу других стереоизомеров соединения. Соединения могут содержать хиральные центры и могут встречаться в виде рацематов, отдельных энантиомеров или диастереомеров и их смесей. Способы, предусматривающие введение любых таких изомерных форм соединения С, включая введение их смесей, включены в варианты осуществления, предложенные в настоящем документе.

[0228] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С, предложенное в настоящем документе, содержит один хиральный центр и может существовать в виде смеси энантиомеров, например рацемической смеси. Настоящее раскрытие охватывает применение стеремерно чистых форм такого соединения, а также применение смесей этих форм. Например, в способах и композициях, раскрытых в настоящем документе, можно использовать смеси, содержащие равные или неравные количества энантиомеров соединения С, предложенного в настоящем документе. Эти изомеры могут быть асимметрично синтезированы или разделены с использованием стандартных методов, таких как хиральные колонки или хиральные разделяющие средства. Смотри, например, документы Jacques, J., et al, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., et al, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); и Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

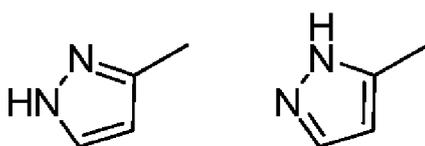
[0229] Следует понимать, что хиральные центры соединения С могут подвергаться эпимеризации *in vivo*. При этом специалисту в данной области техники будет понятно, что в случае эпимеризации *in vivo* введение соединения С в его (R)-форме может быть эквивалентно введению соединения С в его (S)-форме.

[0230] Оптически активные (+) и (-), (R)- и (S)- или (D)- и (L)-изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или разделены

с использованием обычных методов, таких как хроматография на хиральной стационарной фазе.

[0231] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой сольват (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Термин «сольват» означает физическую ассоциацию соединения с одной или несколькими молекулами растворителя, органического или неорганического. Эта физическая ассоциация включает водородную связь. В некоторых случаях сольват будет способен к выделению, например, когда одна или несколько молекул растворителя включены в кристаллическую решетку твердого кристаллического вещества. Термин «сольват» охватывает сольваты как в фазе раствора, так и поддающиеся выделению. Примерами сольватов служат гидраты, этаноляты, метаноляты, изопропаноляты, сольваты ацетонитрила и сольваты этилацетата. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С представляет собой гидрат (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона. Способы сольватации известны в данной области техники.

[0232] Термин «таутомеры» относится к изомерным формам соединения, которые находятся в равновесии друг с другом. Концентрации изомерных форм будут зависеть от среды, в которой находится соединение, и могут различаться в зависимости, например, от того, является ли соединение твердым или находится в органическом или водном растворе. Например, в водном растворе пиразолы могут проявлять следующие изомерные формы, который называют таутомерами друг друга:



[0233] Как легко будет понятно специалисту в данной области техники, таутомерию может проявлять широкий спектр функциональных групп и других структур, и введение любого таутомера соединения С входит в объем способов, предложенных в настоящем документе.

[0234] Следует также отметить, что соединение С при использовании в предложенных способах может содержать неприродные пропорции атомных изотопов у одного или нескольких атомов. Например, соединение С может быть радиоактивно мечено радиоактивными изотопами, такими как, например, тритий (^3H), йод-125 (^{125}I), сера-35 (^{35}S) или углерод-14 (^{14}C), или может быть изотопно обогащено, например, дейтерием (^2H), углеродом-13 (^{13}C) или азотом-15 (^{15}N). При использовании в настоящем

документе «изотополог» представляет собой изотопно-обогащенное соединение. Термин «изотопно-обогащенный» относится к атому, имеющему изотопный состав, отличный от природного изотопного состава этого атома. «Изотопно-обогащенный» может также относиться к соединению, содержащему по меньшей мере один атом, имеющий изотопный состав, отличный от природного изотопного состава этого атома. Термин «изотопный состав» относится к количеству каждого изотопа, присутствующего для данного атома. Радиоактивно меченные и изотопно-обогащенные соединения применимы в качестве терапевтических средств, например, средств для лечения рака, исследовательских реагентов, например, реагентов для анализа связывания, и диагностических средств, например средств визуализации *in vivo*. Предполагается, что способы, предусматривающие введение любого изотопного варианта соединения С, радиоактивного или нет, включены в объем способов, предложенных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предложены способы, предусматривающие введение изотопологов соединения С, например обогащенных дейтерием, углеродом-13 (^{13}C) и/или азотом-15 (^{15}N) соединений. При использовании в настоящем документе термин «дейтерированный» означает соединение, в котором по меньшей мере один водород (H) заменен дейтерием (обозначенным D или ^2H), то есть соединение обогащено дейтерием по меньшей мере в одном положении.

[0235] Следует понимать, что независимо от стереомерного или изотопного состава соединения С можно вводить в форме любой из фармацевтически приемлемых солей, описанных в настоящем документе. В равной степени следует понимать, что изотопный состав может изменяться независимо от стереомерного состава соединения С. Кроме того, изотопный состав, хотя и ограничен теми элементами, которые присутствуют в соединении С или его соли, в остальном может изменяться независимо от выбора фармацевтически приемлемой соли соединения С.

[0236] Следует отметить, что если имеет место несоответствие между изображенной структурой и названием, данным этой структуре, изображенной структуре следует придать больший вес. Кроме того, если стереохимия структуры или части структуры не обозначена, например, жирными или пунктирными линиями, структуру или часть структуры следует интерпретировать как охватывающую все стереоизомеры структуры.

1. Композиции и составы

[0237] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, композиций, комбинаций, наборов и применений комбинированной терапии, предложенным в

настоящем документе, комбинированную терапию можно вводить в виде одной или нескольких композиций, например фармацевтических композиций, содержащих соединение С.

[0238] Согласно некоторым вариантам осуществления композиция, например фармацевтическая композиция, содержащая соединение С, может включать в себя носители, такие как разбавитель, адъювант, вспомогательное вещество или основа, с которыми вводят соединение С и/или клетки. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences», E. W. Martin. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество соединения С, обычно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечивать форму для надлежащего введения пациенту. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло. В качестве жидких носителей также можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, особенно для растворов для инъекций. Фармацевтические композиции могут содержать любые один или несколько разбавителей, адъювантов, антиадгезивов, связующих веществ, покрытий, наполнителей, ароматизаторов, красителей, смазывающих веществ, скользящих веществ, консервантов, моющих средств, сорбентов, эмульгирующих средств, фармацевтических вспомогательных веществ, рН-буферных средств или подсластителей и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция может представлять собой жидкость, твердое вещество, лиофилизированный порошок, иметь форму геля и/или представлять собой комбинацию перечисленного. Согласно некоторым аспектам выбор носителя частично определяется конкретным ингибитором и/или способом введения.

[0239] Фармацевтически приемлемые носители, как правило, нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (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 средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG), стабилизаторы и/или консерванты. Композиции, содержащие соединение С, также могут быть лиофилизированы.

[0240] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтические композиции могут быть составлены для введения с помощью любого пути, известного специалистам в данной области техники, включая внутримышечную, внутривенную, внутрикожную, внутриочаговую, внутрибрюшинную инъекцию, подкожное, внутриопухолевое, эпидуральное, назальное, пероральное, вагинальное, ректальное, топическое, местное, ушное, ингаляционное, буккальное (например, сублингвальное) и чрескожное введение или любой путь. Согласно некоторым вариантам осуществления также предусмотрены другие способы введения. Согласно некоторым вариантам осуществления введение осуществляют с помощью болюсной инфузии, с помощью инъекции, например внутривенной или подкожной инъекций, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, транссептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахориоидальной инъекции, интракамеральной инъекции, подконъюнктивальной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, субтеноновой инъекции, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или постериорной юкстасклеральной доставки. Согласно некоторым вариантам осуществления введение осуществляют с помощью парентерального, внутрилегочного и интраназального и, если желательно для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления заданную дозу вводят путем однократного болюсного введения. Согласно некоторым вариантам осуществления ее вводят путем многократного болюсного введения, например, в течение периода не более 3 дней, или путем непрерывного инфузионного введения.

[0241] Согласно некоторым вариантам осуществления введение может быть местным, топическим или системным в зависимости от места лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления местное введение в область, нуждающуюся в лечении, может быть достигнуто, например, но без ограничения, с помощью местной

инфузии во время хирургического вмешательства, наружного нанесения, например в сочетании с повязкой на рану после хирургического вмешательства, с помощью инъекции, посредством катетера, посредством суппозитория или посредством имплантата. Согласно некоторым вариантам осуществления композиции также можно вводить с другими биологически активными средствами, или последовательно, прерывисто, или в той же композиции. Согласно некоторым вариантам осуществления введение также может включать в себя системы с контролируемым высвобождением, включая составы с контролируемым высвобождением и устройство с контролируемым высвобождением, например, с помощью насоса. Согласно некоторым вариантам осуществления введение является пероральным.

[0242] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С обычно составляют и вводят в однодозовых лекарственных формах или в многодозовых лекарственных формах. Каждая единичная доза содержит заранее определенное количество терапевтически активного соединения С, достаточное для достижения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем, наполнителем или разбавителем. Согласно некоторым вариантам осуществления однодозовые лекарственные формы, включают, но без ограничения, таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии и пероральные растворы или суспензии и водомасляные эмульсии, содержащие подходящие количества соединения С. Однодозовые лекарственные формы могут содержаться в ампулах и шприцах или индивидуально упакованных таблетках или капсулах. Однодозовые лекарственные формы можно вводить в дробном или кратном количестве. Согласно некоторым вариантам осуществления многодозовая лекарственная форма представляет собой несколько идентичных однодозовых лекарственных форм, упакованных в один контейнер для введения в виде отдельных однодозовых лекарственных форм. Примеры многодозовых лекарственных форм включают пузырьки, флаконы с таблетками или капсулами или флаконы емкостью в несколько пинт или галлонов.

2. Введение доз

[0243] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы комбинированной терапии предусматривают начало введения соединения С до, после, во время, в течение, одновременно, почти одновременно, последовательно, параллельно и/или прерывисто с началом клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки). Согласно некоторым вариантам осуществления начало введения соединения С в предложенных способах

комбинированной терапии происходит после или вслед за началом введения Т-клеточной терапии.

[0244] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают после начала клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки) (вслед за ним). Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают, когда в крови субъекта детектируется пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии, или до этого.

[0245] В некоторых случаях начало введения соединения С осуществляют за неделю или в течение недели, например в течение 1, 2 или 3 дней, (i) до момента времени, когда пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии детектируется в крови субъекта; (ii) до того, как количество клеток Т-клеточной терапии, детектируемое в крови, после того они были детектированы в крови, становится не детектируемым или снижается, необязательно снижается по сравнению с предыдущим моментом времени после введения Т-клеточной терапии; (iii) до того, как количество клеток Т-клеточной терапии, детектируемое в крови, уменьшается в или более чем в 1,5 раза, 2,0 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 5,0 раза, 10 раз или более от пикового или максимального количества клеток Т-клеточной терапии, детектируемого в крови субъекта после начала введения Т-клеточной терапии; (iv) в момент времени после того, как пиковый или максимальный уровень клеток Т-клеточной терапии детектируется в крови субъекта, причем количество клеток из или полученных из клеток, детектируемых в крови субъекта, меньше чем 10%, меньше чем 5%, меньше чем 1% или меньше чем 0,1% от всех мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) в крови субъекта; (v) до того, как у субъекта наблюдают прогрессирование заболевания и/или рецидив после ремиссии после лечения с помощью Т-клеточной терапии; и/или (iv) до того, как у субъекта наблюдают повышение опухолевой нагрузки по сравнению с опухолевой нагрузкой во время до или после введения клеток и до начала введения соединения С. Согласно определенным аспектам предложенные способы осуществляют для усиления, увеличения или потенцирования Т-клеточной терапии у субъектов для улучшения ответа на Т-клеточную терапию, например присутствия Т-клеток и/или уменьшения опухолевой нагрузки.

[0246] Согласно некоторым вариантам осуществления клеточную терапию, такую как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), вводят в день 1 комбинированной терапии.

[0247] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают после начала клеточной терапии (вслед за ним). Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают после начала Т-клеточной терапии

в течение шести дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в течение пяти дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в течение четырех дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в течение трех дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в течение двух дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают в течение одного дня после конца введения лимфодеплецирующей терапии.

[0252] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через семь дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через шесть дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через пять дней после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через четыре дня после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через три дня после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через два дня после конца введения лимфодеплецирующей терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С начинают через один день после конца введения лимфодеплецирующей терапии.

[0253] Согласно некоторым вариантам осуществления в момент, когда субъекту впервые вводят соединение С, и/или в любое последующее время после начала введения у субъекта не проявляются признаки или симптомы тяжелой токсичности, такие как тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелая токсичность. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С осуществляют в то время, когда у субъекта не проявляются признаки или симптомы тяжелого CRS и/или не проявляется CRS степени 3 или выше, такой как продолжительный CRS степени 3 или CRS степени 4 или 5. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С осуществляют в то время, когда у субъекта не проявляются признаки или симптомы тяжелой нейротоксичности и/или не проявляется нейротоксичность степени 3 или выше, такая как продолжительная нейротоксичность степени 3 или нейротоксичность

степени 4 или степени 5. Согласно некоторым аспектам между временем начала введения Т-клеточной терапии и временем введения соединения С у субъекта не проявляется тяжелый CRS и/или не проявляется CRS степени 3 или выше, такой как продолжительный CRS степени 3 или CRS степени 4 или 5. В некоторых случаях между временем начала введения Т-клеточной терапии и временем введения соединения С у субъекта не проявляется тяжелая нейротоксичность и/или не проявляется нейротоксичность степени 3 или выше, такая как продолжительная нейротоксичность степени 3 или нейротоксичность степени 4 или 5.

[0254] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят согласно прерывистой (то есть не ежедневной) схеме введения доз. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят в виде нескольких прерывистых доз. Согласно некоторым вариантам осуществления все дозы из нескольких прерывистых доз соединения С являются одинаковыми. Согласно другим вариантам осуществления несколько прерывистых доз соединения С могут содержать разные количества.

[0255] Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 1,0 мг или приблизительно 1,0 мг, например от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,9 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,8 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,7 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,5 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,4 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,3 мг, от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,2 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 1,0 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,9 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,8 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,7 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,6 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,5 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,4 мг, от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,3 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 1,0 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,9 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,8 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,7 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,6 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,5 мг, от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,4 мг, от 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг до 1,0 мг, от 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг до 0,9 мг, от 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг до 0,8 мг, от 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг до 0,7 мг, от 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг до 0,6 мг, от 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг до 0,5 мг, от 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг до 1,0 мг, от 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг до 0,9 мг, от 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг до 0,8 мг, от 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг до 0,7 мг, от 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг до 0,6 мг, от 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг до 1,0 мг, от 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг до

0,9 мг, от 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг до 0,8 мг, от 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг до 0,7 мг, от 0,7 мг или приблизительно 0,7 мг до 1,0 мг, от 0,7 мг или приблизительно 0,7 мг до 0,9 мг, от 0,7 мг или приблизительно 0,7 мг до 0,8 мг, от 0,8 мг или приблизительно 0,8 мг до 1,0 мг, от 0,8 мг или приблизительно 0,8 мг до 0,9 мг, или от 0,8 мг или приблизительно 0,8 мг до 1,0 мг, все включительно. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет 0,5 мг или приблизительно 0,5 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза соединения С составляет 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг. Согласно любому из предшествующих вариантов осуществления все дозы из нескольких прерывистых доз соединения С являются одинаковыми.

[0256] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С как часть прерывистой схемы введения доз вводят не чаще чем один раз каждые пять дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые шесть дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые семь дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые восемь дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые девять дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые 10 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые 11 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые 12 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые 13 дней.

Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С вводят не чаще чем один раз каждые 14 дней.

[0257] Согласно некоторым вариантам осуществления соединение С как часть прерывистой схемы введения доз вводят один раз каждые пять дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые шесть дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз в неделю. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые семь дней (Q7D). Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые восемь дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые девять дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые 10 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые 11 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые 12 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые 13 дней. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые две недели. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят один раз каждые 14 дней (Q14D).

[0258] Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение периода времени после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере одной недели после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере двух недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере трех недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере четырех недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере пяти недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере шести недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере семи недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере восьми недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере девяти недель после начала введения клеточной терапии. Согласно

некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере 10 недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере 11 недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение по меньшей мере 12 недель после начала введения клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в течение вплоть до 12 недель после начала введения клеточной терапии. Согласно любому из предшествующих вариантов осуществления соединения С вводят в течение вплоть до 12 недель после начала введения клеточной терапии. Таким образом, что касается комбинированной терапии, при которой клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии, согласно некоторым вариантам осуществления соединения С не вводят позднее чем в день 85 комбинированной терапии.

[0259] Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85 комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85 комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85 комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения С вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78 комбинированной терапии.

[0260] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,3 мг, и соединение С вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

[0261] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,3 мг, и соединение С вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

[0262] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,3 мг, и соединение С вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

[0263] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,4 мг, и соединение С вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

[0264] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,3 мг, и соединение С вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78.

[0265] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,2 мг, и соединение С вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

[0266] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза из нескольких прерывистых доз соединения С составляет 0,6 мг, и соединение С вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

[0267] В некоторых случаях циклическая схема может быть прервана в любое время и/или один или несколько раз. В некоторых случаях циклическую схему прерывают или модифицируют, если у субъекта развивается одно или несколько нежелательных явлений, дозолимитирующая токсичность (dose-limiting toxicity, DLT), нейтропения или фебрильная нейтропения, тромбоцитопения, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и/или нейротоксичность (NT), такие как описанные в разделе IV. Согласно некоторым вариантам осуществления количество соединения С для каждого введения или в день в определенные дни недели изменяют после того, как у субъекта развивается одно или несколько нежелательных явлений, дозолимитирующая токсичность (DLT), нейтропения или фебрильная нейтропения, тромбоцитопения, синдром высвобождения цитокинов (CRS) и/или нейротоксичность (NT), такие как описанные в разделе IV.

II. Клеточная терапия и сконструированные клетки

[0268] Согласно некоторым вариантам осуществления клеточная терапия (например, Т-клеточная терапия) для применения в соответствии с предложенными способами комбинированной терапии включает в себя введение сконструированных клеток, экспрессирующих рекомбинантные рецепторы, предназначенные для распознавания и/или специфического связывания антигенов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, таким как рак, например В-клеточное злокачественное новообразование. Согласно некоторым вариантам осуществления связывание с антигеном приводит к ответу, такому как иммунный ответ против таких антигенов. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки содержат или сконструированы таким образом, чтобы они содержали сконструированный рецептор или рекомбинантный рецептор, например сконструированный антигенный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR). Рекомбинантный рецептор, такой как CAR, обычно содержит внеклеточный связывающий антиген (или лиганд) домен, связанный с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, согласно некоторым аспектам через линкеры и/или трансмембранный(ые) домен(ы). Согласно некоторым аспектам сконструированные клетки предлагаются в виде фармацевтических композиций и составов, подходящих для введения субъектам, например, для адоптивной клеточной

терапии. Также предложены терапевтические способы для введения клеток и композиций субъектам, например пациентам. Согласно некоторым вариантам осуществления способы представляют собой любые, описанные в разделе I.

[0269] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных посредством генной инженерии, и поэтому экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. Согласно некоторым вариантам осуществления перенос гена осуществляют путем вначале стимуляции клеток, например, путем их объединения со стимулом, который индуцирует ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, например, в соответствии с измерениями с помощью экспрессии цитокина или маркера активации, с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением культуры до количества, достаточного для клинических применений.

A. Химерные антигенные рецепторы

[0270] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенных способов и применений, например любых, описанных в разделе I, сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют химерные рецепторы, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат один или несколько доменов, которые объединяют лиганд-связывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который обеспечивает специфичность в отношении желаемого антигена (например, опухолевого антигена), с внутриклеточными сигнальными доменами. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой часть активирующего внутриклеточного домена, такого как домен активации Т-клеток, обеспечивающий первичный сигнал активации. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит или дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен для облегчения эффекторных функций. При специфическом связывании с молекулой, например антигеном, рецептор обычно доставляет иммуностимулирующий сигнал, такой как передаваемый ITAM сигнал, в клетку, тем самым способствуя иммунному ответу, направленному на заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления химерные рецепторы, генетически встроенные в иммунные клетки, могут модулировать активность Т-клеток и в некоторых случаях могут модулировать дифференцировку или гомеостаз Т-клеток, тем самым приводя к генно-инженерным клеткам с улучшенной долговечностью, выживаемостью и/или персистенцией *in vivo*, например, для применения в способах адоптивной клеточной терапии.

[0271] Примерами антигенных рецепторов, включая CAR, и способов конструирования и введения таких рецепторов в клетки служат описанные, например, в публикациях международных заявок на выдачу патента №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикациях заявок на выдачу патента США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патентах США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118 и европейской заявке на выдачу патента № EP2537416 и/или описанные в документах 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. Согласно некоторым аспектам антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США № 7446190 и описано в публикации международной заявки на выдачу патента № WO/2014055668 A1. К примерам CAR относятся CAR, раскрытые в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190, патент США № 8389282, Kochenderfer *et al.*, 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang *et al.* (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens *et al.*, *Sci Transl Med.* 2013 5(177). Смотри также WO2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США № 7446190 и патент США № 8389282.

[0272] Примерами CAR-T-клеточных терапий, нацеленных на CD19, служат те, которые исследовались или исследуются в клинических исследованиях NCT02644655, NCT03744676, NCT01087294, NCT03366350, NCT03790891, NCT03497533, NCT04007029, NCT03960840, NCT04049383, NCT04094766, NCT03366324, NCT02546739, NCT03448393, NCT03467256, NCT03488160, NCT04012879, NCT03016377, NCT03468153, NCT03483688, NCT03398967, NCT03229876, NCT03455972, NCT03423706, NCT03497533 и NCT04002401, включая одобренные FDA продукты BREYANZI® (лизокабтаген маралейсел), TECARTUS™ (брексукабтаген аутолейсел), KYMRIAH™ (тисагенлеклейсел) и YESCARTA™ (аксикабтаген цилолейсел). Примерами сконструированных клеток служат BREYANZI®, TECARTUS™, KYMRIAH™, YESCARTA™, UCART19 и ALLO-501. Согласно некоторым аспектам сконструированные клетки включают любые из клеток, описанных в документе Marofi *et al.*, *Front. Immunol.* (2021) 12:681984, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[0273] Согласно некоторым вариантам осуществления сконструированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют рекомбинантный рецептор, такой как химерный

антигенный рецептор (CAR), со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый на поверхности клеток определенного типа. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой полипептид. Согласно некоторым вариантам осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или не целевыми клетками или тканями. Согласно другим вариантам осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

[0274] Антигены, на которые нацелены рецепторы, согласно некоторым вариантам осуществления включают антигены, ассоциированные с В-клеточным злокачественным новообразованием, такие как любой из ряда известных маркеров В-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления антиген, на который нацелен рецептор, представляет собой CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig-каппа, Ig-лямбда, CD79a, CD79b или CD30. Согласно конкретным аспектам антиген представляет собой CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления любой из таких антигенов относится к антигенам, экспрессируемым на человеческих В-клетках.

[0275] Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно включают в себя внеклеточный антигенсвязывающий домен, который представляет собой антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой часть молекулы антитела, обычно переменную область тяжелой (VH) цепи и/или переменную область легкой (VL) цепи антитела, например фрагмент scFv антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменное антитело (sdAb), такое как sdFv, нанотело, V_HH и V_{NAR}. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области антитела, соединенные гибким линкером.

[0276] Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент (например scFv или домен V_H) специфически распознает антиген, такой как CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент происходит от антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с CD19, или представляет собой их вариант.

[0277] Согласно некоторым вариантам осуществления антиген представляет собой CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит V_H и V_L , происходящие от антитела или фрагмента антитела, специфических к CD19. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела, которые связывают CD19, представляют собой антитело мышиноного происхождения, такое как FMC63 и SJ25C1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент антитела представляют собой человеческое антитело, например, как описано в патентной публикации США № US 2016/0152723.

[0278] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий домен включает в себя V_H и/или V_L , происходящие от FMC63, которое, согласно некоторым аспектам, может представлять собой scFv. FMC63 обычно относится к мышинному моноклональному антителу IgG1, выработанному против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело FMC63 содержит последовательности CDR-H1 и CDR-H2, приведенные под SEQ ID NO: 38 и 39, соответственно, CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 40 или 54, CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 35, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 36 или 55, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 37 или 56. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело FMC63 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 42.

[0279] Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 согласно SEQ ID NO:35, последовательность CDR-L2 согласно SEQ ID NO:36 и последовательность CDR-L3 согласно SEQ ID NO:37, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 согласно SEQ ID NO:38, последовательность CDR-H2 согласно SEQ ID NO:39 и последовательность CDR-H3 согласно SEQ ID NO:40, или вариант любой из вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи из FMC63, приведенную под SEQ ID NO:41, и переменную область легкой цепи из FMC63, приведенную под SEQ ID NO:42, или вариант любой из вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Согласно некоторым вариантам осуществления переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер приведен под SEQ ID NO:59. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит, по порядку, V_L , линкер и V_H . Согласно некоторым вариантам осуществления scFv кодируется последовательностью нуклеотидов, приведенной под SEQ ID NO:57, или последовательностью, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO:57. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO:43, или последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO:43. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CD19 CAR представляет собой CAR из BREYANZI® (лизокабтаген маралейсел). Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клеточная терапия представляет собой BREYANZI® (лизокабтаген маралейсел).

[0280] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий домен включает V_H и/или V_L , происходящие из SJ25C1, которое, согласно некоторым аспектам, может представлять собой scFv. SJ25C1 представляет собой мышинное моноклональное антитело IgG1, выработанное против клеток Nalm-1 и -16, экспрессирующих CD19 человеческого происхождения (Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). Согласно некоторым вариантам осуществления антитело SJ25C1 содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные под SEQ ID NO: 47-49, соответственно, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные под SEQ ID NO: 44-46, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело SJ25C1 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит переменную легкую цепь, содержащую последовательность CDR-L1 согласно SEQ ID NO:44, последовательность CDR-L2 согласно SEQ ID NO: 45 и последовательность CDR-L3 согласно SEQ ID NO:46, и/или переменную тяжелую цепь, содержащую последовательность CDR-H1 согласно SEQ ID NO:47, последовательность CDR-H2 согласно SEQ ID NO:48 и последовательность CDR-H3 согласно SEQ ID NO:49, или вариант любой из

вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит переменную область тяжелой цепи из SJ25C1, приведенную под SEQ ID NO:50, и переменную область легкой цепи из SJ25C1, приведенную под SEQ ID NO:51, или вариант любой из вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. Согласно некоторым вариантам осуществления переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены линкером. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер приведен под SEQ ID NO:52. Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит, по порядку, V_H , линкер и V_L . Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит, по порядку, V_L , линкер и V_H . Согласно некоторым вариантам осуществления scFv содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO:53 или последовательность, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с SEQ ID NO:53.

[0281] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CD19 CAR представляет собой CAR из TECARTUS™ (брексукабтаген аутолейсел). Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клеточная терапия представляет собой TECARTUS™ (брексукабтаген аутолейсел).

[0282] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CD19 CAR представляет собой CAR из KYMRIAH™ (тисагенлеклейсел). Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клеточная терапия представляет собой KYMRIAH™ (тисагенлеклейсел).

[0283] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CD19 CAR представляет собой CAR из YESCARTA™ (аксикабтаген цилолейсел). Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клеточная терапия представляет собой YESCARTA™ (аксикабтаген цилолейсел).

[0284] Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и включает поликлональные и моноклональные антитела, включая интактные антитела и функциональные (антигенсвязывающие) фрагменты антитела, включая антигенсвязывающие (Fab) фрагменты, $F(ab')_2$ -фрагменты, Fab'-фрагменты, Fv-фрагменты, рекомбинантные фрагменты IgG (rIgG), переменные области тяжелой цепи (V_H), способные специфически связывать антиген, одноцепочечные фрагменты антител, включая одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), и однодоменные антитела

(например, sdAb, sdFv, нанотело, V_HH или V_{NAR}) или фрагменты. Термин охватывает генно-инженерные и/или иным образом модифицированные формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептитела, химерные антитела, полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела и гетероконъюгатные антитела, мультиспецифические, например биспецифические, антитела, диатела, триатела и тетраатела, тандемные ди-scFv, тандемные три-scFv. Если не указано иное, термин «антитело» следует понимать как охватывающий его функциональные фрагменты антитела. Термин также охватывает интактные или полноразмерные антитела, включая антитела любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы, IgM, IgE, IgA и IgD. Согласно некоторым аспектам CAR представляет собой биспецифический CAR, например, содержащий два антигенсвязывающих домена с различной специфичностью.

[0285] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие белки, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты специфически распознают антиген полноразмерного антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая и легкая цепи антитела могут быть полноразмерными или могут представлять собой антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv)). Согласно другим вариантам осуществления константная область тяжелой цепи антитела выбрана из, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, IgG1 (например, человеческого IgG1). Согласно другому варианту осуществления константная область легкой цепи антитела выбрана из, например, каппа или лямбда, в частности, каппа.

[0286] Известно, что термины «определяющая комплементарность область» и «CDR», синонимичные «гипервариабельной области» или «HVR», в некоторых случаях относятся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. Обычно есть три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Известно, что «каркасные области» и «FR» в некоторых случаях относятся к не-CDR частям вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Обычно есть четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4).

[0287] Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая описанные в документах Kabat *et al.* (1991), “Sequences of Proteins of

Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «по Кабату»); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273927-948 (схема нумерации «по Чотиа»); 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»); Honegger A and Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70 (схема нумерации «Aho»); и Martin *et al.*, “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272 (схема нумерации «AbM»).

[0288] Границы данной CDR или FR могут изменяться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема Кабата основана на структурных выравниваниях, а схема Чотиа основана на структурной информации. Нумерация в схемах как Кабата, так и Чотиа основана на наиболее распространенных длинах последовательностей областей антител, причем вставки обозначаются буквами вставок, например «30a», и в некоторых антителах появляются делеции. Эти две схемы помещают определенные вставки и делеции («индель») в разных позициях, что приводит к разной нумерации. Контактная схема основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом аналогична схеме нумерации Чотиа. Схема AbM представляет собой компромисс между определениями Кабата и Чотиа, основанный на определении, которое используется программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular.

[0289] В таблице 2 ниже приведены примеры границ положений CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 и CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 определенные по схемам Кабата, Чотиа, AbM и контактной, соответственно. Для CDR-H1 нумерация остатков указана с использованием схем нумерации как Кабата, так и Чотиа. FR расположены между CDR, причем, например, FR-L1 расположена до CDR-L1, FR-L2 расположена между CDR-L1 и CDR-L2, FR-L3 расположена между CDR-L2 и CDR-L3 и так далее. Следует отметить, что, поскольку в показанной схеме нумерации Кабата вставки помещены в H35A и H35B, конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации с использованием показанного соглашения о нумерации Кабата варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли.

Таблица 2. Границы CDR в соответствии с различными схемами нумерации

CDR	По Кабату	По Чотиа	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 Кабата ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Нумерация Чотиа 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

[0290] Таким образом, следует понимать, что, если не указано иное, «CDR» или «определяющая комплементарность область» или отдельные указанные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области, такой как его переменная область, охватывают определяющую комплементарность область (или конкретную определяющую комплементарность область), как определено в соответствии с любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. Например, если указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в аминокислотной последовательности данной области V_H или V_L, следует понимать, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) внутри переменной области, как определено в соответствии с любой из вышеупомянутых схем или других известных схем. Согласно некоторым вариантам осуществления указаны конкретные последовательности CDR. Примеры последовательностей CDR предлагаемых антител описаны с использованием различных схем нумерации, хотя понятно, что предлагаемое антитело может включать в себя CDR, как описано в соответствии с любой из других вышеупомянутых схем или других схем, известных специалисту в данной области техники.

[0291] Аналогичным образом, следует понимать, что, если не указано иное, FR или отдельная(ые) указанная(ые) FR (например, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4) данного антитела или его области, такой как его переменная область, охватывают каркасную область (или конкретную каркасную область), как определено в соответствии с любой из известных схем. В некоторых случаях указываются схемы для идентификации конкретной CDR, FR, или конкретных FR или CDR, например CDR, определенная в соответствии со способом Кабата, Чотиа, AbM или контактным или в соответствии с другими известными

схемами. В других случаях приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR или FR.

[0292] Термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» относятся к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела обычно имеют схожие структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (Смотри, например, документ Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, могут быть выделены антитела, которые связывают конкретный антиген, с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_L или V_H , соответственно. Смотри, например, документы Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

[0293] К числу предлагаемых антител относятся фрагменты антител. Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител служат, но без ограничения, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; вариабельные области тяжелой цепи (V_H), одноцепочечные молекулы антител, такие как scFv и однодоменные одиночные антитела V_H ; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Согласно конкретным вариантам осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, такие как scFv.

[0294] Термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» относятся к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела обычно имеют схожие структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. (Смотри, например, документ Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного домена V_H или V_L может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, могут быть выделены антитела, которые связывают конкретный антиген, с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_L или V_H ,

соответственно. Смотри, например, документы Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991).

[0295] Однодоменные антитела (sdAb) представляют собой фрагменты антитела, содержащие полностью или частично вариабельный домен тяжелой цепи или полностью или частично вариабельный домен легкой цепи антитела. Согласно определенным вариантам осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR содержит домен тяжелой цепи антитела, который специфически связывает антиген, такой как маркер рака или антиген клеточной поверхности клетки заболевания, подлежащего нацеливанию, такой как опухолевая клетка или раковая клетка, такой как любой из описанных в настоящем документе или известных антигенов-мишеней. Примерами однодоменных антител служат sdFv, нанотело, V_HH или V_{NAR}.

[0296] Фрагменты антитела могут быть получены с помощью различных методов, включая, но без ограничения, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продукцию рекомбинантными клетками-хозяевами. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела представляют собой рекомбинантно получаемые фрагменты, такие как фрагменты, содержащие структуры, которые не встречаются в природе, например с двумя или более областями или цепями антитела, соединенными синтетическими линкерами, например пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены путем ферментативного расщепления встречающихся в природе интактных антител. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагменты антитела представляют собой scFv.

[0297] «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR происходят от CDR отличного от человека вида и все или по существу все аминокислотные остатки FR происходят от человеческих FR. Гуманизированное антитело может, необязательно, содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящую от человеческого антитела. Термин «гуманизированная форма» антитела отличного от человека вида относится к варианту антитела отличного от человека вида, которое подверглось гуманизации, обычно для снижения иммуногенности по отношению к человеку, сохранив при этом специфичность и аффинность родительского антитела отличного от человека вида. Согласно некоторым вариантам осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками антитела отличного от человека вида (например, антитела, от которого происходят остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0298] Согласно некоторым аспектам рекомбинантный рецептор, например химерный антигенный рецептор, содержит внеклеточную часть, содержащую один или несколько связывающих лиганд (например, антиген) доменов, таких как антитело или его фрагмент, и одну или несколько внутриклеточных сигнальных областей или доменов (также взаимозаменяемо называемых цитоплазматическими сигнальными доменами или областями). Согласно некоторым аспектам рекомбинантный рецептор, например CAR, дополнительно включает в себя спейсер и/или трансмембранный домен или часть. Согласно некоторым аспектам спейсер и/или трансмембранный домен может связывать внеклеточную часть, содержащую связывающий лиганд (например, антиген) домен и внутриклеточные сигнальные область(и) или домен(ы).

[0299] Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный рецептор, такой как CAR, дополнительно включает в себя спейсер, который может представлять собой или включать в себя по меньшей мере часть иммуноглобулиновой константной области или ее варианта или модифицированного варианта, такую как шарнирная область, например шарнирную область IgG4, и/или область C_H1/C_L и/или Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный рецептор дополнительно содержит спейсер и/или шарнирную область. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область или часть относится к человеческому IgG, такому как IgG4 или IgG1. Согласно некоторым аспектам часть константной области служит в качестве спейсерной области между антигенраспознающим компонентом, например scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает повышенную ответственность клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В некоторых примерах спейсер имеет длину 12 аминокислот или приблизительно 12 аминокислот или имеет длину не более чем 12 аминокислот. Примерами спейсеров служат спейсеры, содержащие 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, включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. Согласно некоторым вариантам осуществления область спейсера содержит приблизительно 12 аминокислот или менее, приблизительно 119 аминокислот или менее или приблизительно 229 аминокислот или менее. Примерами спейсеров служат сам шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, или

шарнир IgG4, связанный с доменом CH3. Примерами спейсеров служат, но без ограничения, описанные в документах Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol Res.* 3(2): 125–135 или в публикации международной заявки на выдачу патента № WO2014031687.

[0300] Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер содержит только шарнирную область IgG, например только шарнир IgG4 или IgG1, такой как состоящий только из шарнира спейсер, приведенный под SEQ ID NO: 1 и кодируемый последовательностью, приведенной под SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и/или CH3. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, такой как приведенный под SEQ ID NO: 3. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер представляет собой шарнир Ig, например шарнир IgG4, связанный только с доменом CH3, например приведенный под SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер представляет собой или содержит богатую глицином-серином последовательность или другой гибкий линкер, такой как известные гибкие линкеры. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область или часть относится к IgD. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер имеет последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 5. Согласно некоторым вариантам осуществления спейсер имеет последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с любой из SEQ ID NO: 1, 3, 4 и 5.

[0301] Согласно некоторым аспектам спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который (a) содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир или его модифицированный вариант или состоит из него или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, (b) содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно шарнир IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него и/или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее, и не содержит внеклеточную область CD28 или внеклеточную область CD8, или (c) имеет длину 12 аминокислот или приблизительно 12 аминокислот и/или содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него; или (d) состоит из последовательности аминокислот, приведенной под SEQ ID NO: 1, 3-5, 27-34 или 58, или варианта любой из вышеперечисленных,

характеризующегося идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, или содержит ее, или (е) содержит формулу X_1PPX_2P , где X_1 представляет собой глицин, цистеин или аргинин и X_2 представляет собой цистеин или треонин, или состоит из нее.

[0302] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен, связанный непосредственно или опосредованно с внеклеточным доменом. Согласно некоторым вариантам осуществления химерный антигенный рецептор включает трансмембранный домен, связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит ITAM. Например, согласно некоторым аспектам домен распознавания антигена (например, внеклеточный домен) обычно связан с одним или несколькими внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию через комплекс антиген-рецептор, такой как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал через другой рецептор клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления химерный рецептор содержит трансмембранный домен, связанный или слитый между внеклеточным доменом (например, scFv) и внутриклеточным сигнальным доменом. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или несколькими трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами.

[0303] Согласно одному варианту осуществления используется трансмембранный домен, который природно ассоциирован с одним из доменов в рецепторе, например CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены так, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

[0304] Трансмембранный домен согласно некоторым вариантам осуществления происходит или из природного, или из синтетического источника. Если источник является природным, домен согласно некоторым аспектам происходит от любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, происходящие от (то есть содержат по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и) из) альфа, бета или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 (4-1BB) или CD154. Альтернативно, трансмембранный домен согласно некоторым вариантам осуществления является синтетическим. Согласно некоторым аспектам

синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. Согласно некоторым аспектам на каждом конце синтетического трансмембранного домена находится триплет из фенилаланина, триптофана и валина. Согласно некоторым вариантам осуществления связь осуществляется с помощью линкеров, спейсеров и/или трансмембранного(ых) домена(ов). Согласно некоторым аспектам трансмембранный домен содержит трансмембранную часть из CD28 или ее вариант. Внеклеточный домен и трансмембранный могут быть связаны непосредственно или опосредованно. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный домен и трансмембранный связаны с помощью спейсера, такого как любой, описанный в настоящем документе.

[0305] Согласно некоторым вариантам осуществления трансмембранный домен рецептора, например CAR, представляет собой трансмембранный домен человеческого CD28 или его вариант, например состоящий из 27 аминокислот трансмембранный домен человеческого CD28 (№ доступа P10747.1), или представляет собой трансмембранный домен, который содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 8, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO:8. Согласно некоторым вариантам осуществления содержащая трансмембранный домен часть рекомбинантного рецептора содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 9, или последовательность аминокислот, характеризующуюся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

[0306] Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный рецептор, например CAR, включает в себя по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты, такие как внутриклеточные сигнальные область или домен. Активация Т-клеток согласно некоторым аспектам описана как опосредуемая двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Согласно некоторым аспектам CAR включает в себя один или оба из таких сигнальных компонентов. К внутриклеточным сигнальным областям относятся те, которые имитируют или

приближают сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. Согласно некоторым вариантам осуществления присутствует короткий олиго- или полипептидный линкер, например линкер длиной от 2 до 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, например дублет глицин-серин, и он образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

[0307] Согласно некоторым вариантам осуществления после лигирования CAR цитоплазматический домен или внутриклеточная сигнальная область CAR активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например Т-клетки, сконструированный для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах CAR индуцирует функцию Т-клетки, такую как цитолитическая активность или Т-хелперная активность, такая как секреция цитокинов или других факторов. Согласно некоторым вариантам осуществления используют усеченную часть внутриклеточной сигнальной области компонента антигенного рецептора или костимулирующей молекулы вместо интактной иммуностимулирующей цепи, например, если она передает сигнал эффекторной функции. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают в себя цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), а также, согласно некоторым аспектам, корецепторов, которые в природном контексте действуют совместно с таким рецептором для инициации передачи сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, и/или любого производного или варианта таких молекул, и/или любую синтетическую последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточные сигнальные области, например, содержащие внутриклеточный домен или домены, включают в себя цитоплазматические последовательности области или домена, которые участвуют в обеспечении костимулирующего сигнала.

[0308] Согласно некоторым аспектам CAR включает в себя первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотивы активации иммунорецепторов на основе тирозина или ITAM. Примерами ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, служат происходящие от цепи CD3-

дзета, FcR-гамма, CD3-гамма, CD3-дельта и CD3-эпсилон. Согласно некоторым вариантам осуществления цитоплазматическая(ие) сигнальная(ые) молекула(ы) в CAR содержит(ат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, происходящие от CD3-дзета.

[0309] Согласно некоторым вариантам осуществления рецептор включает в себя внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как CD3-цепь TCR, которая опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например цепь CD3-дзета. Таким образом, согласно некоторым аспектам антигенсвязывающая часть связана с одним или несколькими клеточными сигнальными модулями. Согласно некоторым вариантам осуществления клеточные сигнальные модули включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранный домены CD. Согласно некоторым вариантам осуществления рецептор, например CAR, дополнительно включает в себя часть одной или нескольких дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор- γ , CD8-альфа, CD8-бета, CD4, CD25 или CD16. Например, согласно некоторым аспектам CAR или другой химерный рецептор включает в себя химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc-рецептором- γ и CD8-альфа, CD8-бета, CD4, CD25 или CD16.

[0310] Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточная (или цитоплазматическая) сигнальная область содержит человеческую CD3-цепь, необязательно стимулирующий сигнальный домен CD3-дзета или его функциональный вариант, такой как цитоплазматический домен 112 AA изоформы 3 человеческой CD3 ζ (№ доступа P20963,2) или сигнальный домен CD3-дзета, как описано в патенте США № 7446190 или патенте США № 8911993. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточная сигнальная область содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 13, 14 или 15, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 13, 14 или 15.

[0311] В контексте природного TCR полная активация обычно требует передачи не только сигнала через TCR, но также костимулирующего сигнала. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления для обеспечения полной активации в CAR также включен компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала. Согласно другим вариантам осуществления CAR не включает в себя компонент для генерации костимулирующего сигнала. Согласно некоторым аспектам дополнительный CAR

экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для генерации вторичного или костимулирующего сигнала.

[0312] Согласно некоторым вариантам осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен Т-клеточной костимулирующей молекулы. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR включает в себя сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такого как CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS и/или других костимулирующих рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR включает в себя костимулирующую область или домен из CD28 или 4-1BB, например из человеческого CD28 или человеческого 4-1BB.

[0313] Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточные сигнальные область или домен содержат внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен человеческого CD28 или его функциональный вариант или часть, например его состоящий из 41 аминокислоты домен и/или такой домен с заменой LL на GG в положениях 186-187 нативного белка CD28. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 10 или 11, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 10 или 11. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточная область содержит внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен из 4-1BB или его функциональный вариант или часть, например состоящий из 42 аминокислот цитоплазматический домен человеческого 4-1BB (№ доступа Q07011.1) или его функциональный вариант или часть, например последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 12, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 12.

[0314] Согласно некоторым аспектам один и тот же CAR включает в себя как первичные (или активирующие) цитоплазматические сигнальные области, так и костимулирующие сигнальные компоненты.

[0315] Согласно некоторым вариантам осуществления активирующий домен включен один CAR, тогда как костимулирующий компонент обеспечивается другим CAR, распознающим другой антиген. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR

включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, причем и те, и другие экспрессируются на одной и той же клетке (смотри WO2014/055668). Согласно некоторым аспектам клетки содержат один или несколько стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующих CAR. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки дополнительно содержат ингибирующие CAR (iCAR, смотри документ Fedorov et al., *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013)), такие как CAR, распознающий антиген, отличный от антигена, ассоциированного и/или специфического для заболевания или состояния, посредством которого активирующий сигнал, доставляемый через нацеленный на заболевание CAR, ослабляется или ингибируется из-за связывания ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения нецелевых эффектов.

[0316] В некоторых случаях CAR называют CAR первого, второго и/или третьего поколения. Согласно некоторым аспектам CAR первого поколения представляет собой CAR, который обеспечивает исключительно индуцируемый CD3-цепью сигнал при связывании антигена; согласно некоторым аспектам CAR второго поколения представляет собой CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, такой как CAR, включающий в себя внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; согласно некоторым аспектам CAR третьего поколения согласно некоторым аспектам представляет собой CAR, который включает в себя несколько костимулирующих доменов различных костимулирующих рецепторов.

[0317] Согласно некоторым вариантам осуществления CAR включает в себя один или несколько, например, два или более, костимулирующих доменов и доменов активации, например домен первичной активации, в цитоплазматической части. Примеры CAR включают в себя внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

[0318] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенный рецептор дополнительно включает в себя маркер, и/или клетки, экспрессирующие CAR или другой антигенный рецептор, дополнительно содержат суррогатный маркер, такой как маркер клеточной поверхности, который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора. Согласно некоторым аспектам маркер включает полностью или частично (например, в усеченной форме) CD34, NGFR, или рецептор эпидермального фактора роста, например усеченный вариант такого рецептора клеточной поверхности (например, tEGFR). Согласно некоторым вариантам 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 любые раскрытые в опубликованной заявке на выдачу патента № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который, необязательно, связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A.

[0319] Пример полипептида усеченного EGFR (например, tEGFR) содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 7 или 16. Пример линкерной последовательности T2A содержит последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 6 или 17, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 6 или 17.

[0320] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой молекулу, например белок клеточной поверхности, не встречающийся в природе на Т-клетках или не встречающийся в природе на поверхности Т-клеток или их части. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула представляет собой не свою молекулу, например не свой белок, то есть молекулу, которая не распознается как «своя» иммунной системой хозяина, которому клетки будут адоптивно перенесены.

[0321] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого эффекта, кроме его использования в качестве маркера для генной инженерии, например для отбора успешно сконструированных клеток. Согласно другим вариантам осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой можно столкнуться *in vivo*, например, костимулирующую молекулу или молекулу иммунной контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответов клеток на адоптивный перенос и встречу с лигандом.

[0322] Согласно некоторым вариантам осуществления химерный антигенный рецептор включает в себя внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым аспектам химерный антигенный рецептор включает в себя внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент, описанные в настоящем документе, и внутриклеточный сигнальный домен. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или фрагмент включают scFv или

однодоменное антитело V_H , и внутриклеточный домен содержит ITAM. Согласно некоторым аспектам внутриклеточный сигнальный домен включает в себя сигнальный домен дзета-цепи цепи CD3-дзета (CD3 ζ). Согласно некоторым вариантам осуществления цепь CD3-дзета представляет собой человеческую цепь CD3-дзета. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточная сигнальная область дополнительно содержит костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3-дзета. Согласно некоторым вариантам осуществления CD28 представляет собой человеческий CD28. Согласно некоторым вариантам осуществления 4-1BB представляет собой человеческий 4-1BB. Согласно некоторым вариантам осуществления химерный антигенный рецептор включает в себя трансмембранный домен, расположенный между внеклеточным доменом и внутриклеточной сигнальной областью. Согласно некоторым аспектам трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. Внеклеточный домен и трансмембранный домен могут быть связаны непосредственно или опосредованно. Согласно некоторым вариантам осуществления внеклеточный домен и трансмембранный домен связаны посредством спейсера, такого как любой, описанный в настоящем документе.

[0323] Согласно некоторым вариантам 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-дзета или ее функциональный вариант. Например, согласно некоторым вариантам осуществления CAR включает в себя антитело, такое как фрагмент антитела, включая scFv, например специфический к CD19, такой как любой, описанный выше, спейсер, такой как спейсер, содержащий часть иммуноглобулиновой молекулы, такую как шарнирная область и/или одна или несколько константных областей молекулы тяжелой цепи, например содержащий Ig-шарнир спейсер, трансмембранный домен, содержащий полностью или частично происходящий от CD28 трансмембранный домен, происходящий от CD28 внутриклеточный сигнальный домен и сигнальный домен CD3-дзета.

[0324] Согласно некоторым вариантам 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-дзета или ее функциональный вариант. Согласно некоторым таким вариантам осуществления рецептор дополнительно включает

в себя спейсер, содержащий часть молекулы Ig, такой как человеческая молекула Ig, такой как Ig-шарнир, например шарнир IgG4, такой как состоящий только из шарнира спейсер. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR включает в себя антитело или фрагмент, такой как scFv, например специфический к CD19, такой как любой, описанный выше, спейсер, такой как любой из содержащих Ig-шарнир спейсеров, происходящий от CD28 трансмембранный домен, происходящий от 4-1BB внутриклеточный сигнальный домен и происходящий от CD3-дзета сигнальный домен.

В. Нуклеиновые кислоты, векторы и способы генной инженерии

[0325] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, например Т-клетки, генетически сконструированы для экспрессии рекомбинантного рецептора. Согласно некоторым вариантам осуществления конструирование осуществляют путем введения полинуклеотидов, которые кодируют рекомбинантный рецептор. Также предложены полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантный рецептор, и векторы или конструкции, содержащие такие нуклеиновые кислоты и/или полинуклеотиды.

[0326] В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Согласно некоторым аспектам сигнальная последовательность может кодировать сигнальный пептид, происходящий из нативного полипептида. Согласно другим аспектам сигнальная последовательность может кодировать гетерологичный или ненативный сигнальный пептид, такой как приведенный в качестве примера сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, приведенный под SEQ ID NO:25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, приведенной под SEQ ID NO:24. В некоторых случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, например химерный антигенный рецептор (CAR), содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид. Неограничивающими типичными примерами сигнальных пептидов служат, например, сигнальный пептид альфа-цепи GMCSFR, приведенный под SEQ ID NO: 25 и кодируемый нуклеотидной последовательностью, приведенный под SEQ ID NO:24, или сигнальный пептид CD8-альфа, приведенный под SEQ ID NO:26.

[0327] Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, содержит по меньшей мере один промотор, который функционально связан с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора. В некоторых примерах полинуклеотид содержит два, три или более промоторов, функционально связанных с контролем экспрессии рекомбинантного рецептора.

[0328] В некоторых случаях, когда молекулы нуклеиновой кислоты кодируют две или более различных полипептидных цепи, например рекомбинантный рецептор и маркер, каждая из полипептидных цепей может кодироваться отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Например, предлагаются две отдельные нуклеиновые кислоты, и каждая может быть индивидуально перенесена или введена в клетку для экспрессии в клетке. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, и нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связаны с одним и тем же промотором и, необязательно, разделены сайтом внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site, IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает прорыв рибосомы, которая необязательно представляет собой T2A, P2A, E2A или F2A. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя различными промоторами. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, присутствуют или встроены в разные места генома клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор, введен в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

[0329] Согласно некоторым вариантам осуществления, таким как те, в которых полинуклеотид содержит первую и вторую последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности, кодирующие каждую из различных полипептидных цепей, могут быть функционально связаны с промотором, которые могут быть одинаковыми или различными. Согласно некоторым вариантам осуществления молекула нуклеиновой кислоты может содержать промотор, который управляет экспрессией двух или более различных полипептидных цепей. Согласно некоторым вариантам осуществления такие молекулы нуклеиновой кислоты могут быть мультицистронными (бицистронными или трицистронными, смотри, например, патент США № 6060273). Согласно некоторым вариантам осуществления транскрипционные единицы могут быть сконструированы как бицистронные единицы, содержащие IRES (сайт внутренней посадки рибосомы), что обеспечивает совместную экспрессию генных продуктов (например, кодирующих маркер и кодирующих рекомбинантный рецептор) с помощью сообщения от одного промотора. Альтернативно, в некоторых случаях один промотор может направлять экспрессию РНК, которая содержит в одной открытой рамке считывания (single open reading frame, ORF) два или три гена (например, кодирующий

маркер и кодирующий рекомбинантный рецептор), отделенные друг от друга последовательностями, кодирующими саморасщепляющийся пептид (например, последовательностями 2A) или сайт узнавания протеазы (например, фурина). Таким образом, ORF кодирует один полипептид, который или во время (в случае 2A), или после трансляции процессируется в отдельные белки. В некоторых случаях пептид, такой как T2A, может вызывать пропуск рибосомой (проскок рибосомы) синтеза пептидной связи на С-конце элемента 2A, что приводит к разделению между концом последовательности 2A и следующего далее пептида (смотри, например, документы de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) и de Felipe *et al.* *Traffic* 5:616-626 (2004)). Известны различные элементы 2A. Примерами последовательностей 2A, которые можно использовать в способах и системах, раскрытых в настоящем документе, служат, без ограничения, последовательности 2A из вируса ящура (F2A, например SEQ ID NO: 21), вируса лошадиного ринита А (E2A, например SEQ ID NO: 20), вируса *Thosea asigna* (T2A, например SEQ ID NO: 6 или 17) и тешовируса-1 свиней (P2A, например SEQ ID NO: 18 или 19), как описано в патентной публикации США № 20070116690.

[0330] Любой из рекомбинантных рецепторов, описанных в настоящем документе, может кодироваться полинуклеотидами, содержащими одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих рекомбинантные рецепторы, в любых комбинациях или расположениях. Например, один, два, три или более полинуклеотидов могут кодировать один, два, три или более различных полипептидов, например рекомбинантных рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления один вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую маркер, и отдельный вектор или конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую рекомбинантный рецептор, например CAR. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связаны с двумя различными промоторами. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный рецептор, находится после нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер.

[0331] Согласно некоторым вариантам осуществления остов вектора содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько маркеров. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько маркеров представляют собой маркер трансдукции, суррогатный маркер и/или маркер селекции.

[0332] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой маркер трансдукции или суррогатный маркер. Маркер трансдукции или суррогатный

маркер можно использовать для обнаружения клеток, в которые был введен полинуклеотид, например полинуклеотид, кодирующий рекомбинантный рецептор. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер трансдукции может указывать или подтверждать модификацию клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления суррогатный маркер представляет собой белок, который предназначен для совместной экспрессии на поверхности клетки с рекомбинантным рецептором, например CAR. Согласно конкретным вариантам осуществления такой суррогатный маркер представляет собой поверхностный белок, который был модифицирован так, чтобы он имел небольшую активность или не имел активности. Согласно определенным вариантам осуществления суррогатный маркер кодируется на том же полинуклеотиде, который кодирует рекомбинантный рецептор. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный рецептор, функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, необязательно отделенной сайтом внутренней посадки рибосомы (IRES) или нуклеиновой кислотой, кодирующей саморасщепляющийся пептид или пептид, который вызывает проскок рибосомы, такой как последовательность 2A, такая как T2A, P2A, E2A или F2A. В некоторых случаях можно использовать внешние маркерные гены в связи с сконструированной клеткой для обеспечения детектирования или отбора клеток и в некоторых случаях также для стимулирования самоубийства клеток.

[0333] Примерами суррогатных маркеров могут служить усеченные формы полипептидов клеточной поверхности, такие как усеченные формы, которые нефункциональны и не передают или не способны передавать сигнал или сигнал, обычно передаваемый полноразмерной формой полипептида клеточной поверхности, и/или не осуществляют интернализацию или не способны к ней. Примерами усеченных полипептидов клеточной поверхности служат усеченные формы рецепторов факторов роста или других рецепторов, такие как усеченный рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста (tHER2), усеченный рецептор эпидермального фактора роста (tEGFR, пример последовательности tEGFR приведен под SEQ ID NO:7 или 16) или простатспецифический мембранный антиген (PSMA) или его модифицированная форма. tEGFR может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Erbbitux®) или другим терапевтическим антителом или связывающей молекулой против EGFR, что можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые были сконструированы с использованием конструкции tEGFR и кодируемого экзогенного белка, и/или для элиминации или отделения клеток, экспрессирующих кодируемый белок. Смотри патент США № 8802374 и Liu *et al.*, Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430–434).

Согласно некоторым аспектам маркер, например суррогатный маркер, включает полностью или частично (например, в усеченной форме) CD34, NGFR, CD19 или усеченный CD19, например усеченный CD19 отличного от человека вида, или рецептор эпидермального фактора роста (например, tEGFR).

[0334] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперфолдер GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), улучшенный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Примерами светоизлучающих репортерных генов служат люцифераза (*luc*), β -галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT), β -глюкуронидаза (GUS) или их варианты.

[0335] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой маркер селекции. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, который придает устойчивость к экзогенным средствам или препаратам. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотику. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотику, придающий устойчивость к антибиотику клетке млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой или содержит ген устойчивости к пурамицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину или их модифицированную форму.

[0336] Согласно некоторым вариантам осуществления молекула представляет собой не свою молекулу, например не свой белок, то есть молекулу, которая не распознается как «своя» иммунной системой хозяина, которому клетки будут адоптивно перенесены.

[0337] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер не выполняет терапевтической функции и/или не оказывает никакого эффекта, кроме его использования в качестве маркера для генной инженерии, например для отбора успешно сконструированных клеток. Согласно другим вариантам осуществления маркер может представлять собой терапевтическую молекулу или молекулу, иным образом оказывающую некоторый желаемый эффект, например, лиганд для клетки, с которой можно столкнуться *in vivo*, например, костимулирующую молекулу или молекулу иммунной контрольной точки, для усиления и/или ослабления ответов клеток на адаптивный перенос и встречу с лигандом.

[0338] Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например T2A. Например, маркер и, необязательно, линкерная последовательность, могут быть любыми, раскрытыми в публикации РСТ № WO2014031687. Например, маркер может представлять собой усеченный EGFR (tEGFR), который, необязательно, связан с линкерной последовательностью, такой как расщепляемая линкерная последовательность T2A. Примером полипептида усеченного EGFR (например tEGFR) служит последовательность аминокислот, приведенная под SEQ ID NO: 7 или 16, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует идентичность последовательности по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более с SEQ ID NO: 7 или 16.

[0339] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой или содержит флуоресцентный белок, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), такой как суперфолдер GFP (sfGFP), красный флуоресцентный белок (RFP), такой как tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed или DsRed2, голубой флуоресцентный белок (CFP), сине-зеленый флуоресцентный белок (BFP), улучшенный синий флуоресцентный белок (EBFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) и их варианты, включая видовые варианты, мономерные варианты и кодон-оптимизированные и/или улучшенные варианты флуоресцентных белков. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой или содержит фермент, такой как люцифераза, ген *lacZ* из *E. coli*, щелочная фосфатаза, секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза (SEAP), хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Примерами светоизлучающих репортерных генов служат люцифераза (*luc*), β -галактозидаза, хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT), β -глюкуронидаза (GUS) или их варианты.

[0340] Согласно некоторым вариантам осуществления маркер представляет собой маркер селекции. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой или содержит полипептид, который придает устойчивость к экзогенным средствам или препаратам. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотику. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой ген устойчивости к антибиотику, придающий устойчивость к антибиотику клетке млекопитающего. Согласно некоторым вариантам осуществления маркер селекции представляет собой или содержит ген устойчивости к пурамицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к бластицидину, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к генетицину или ген устойчивости к зеоцину или их модифицированную форму.

[0341] Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в клетки с использованием рекомбинантных инфекционных вирусных частиц, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (смотри, например, документы 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.

[0342] Согласно некоторым вариантам осуществления вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).

[0343] Согласно некоторым вариантам осуществления ретровирусный вектор содержит последовательность длинных концевых повторов (long terminal repeat, LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинового лейкоза Молони (MoMLV), вируса миелопролиферативной саркомы (MPSV), вируса эмбриональных стволовых клеток мыши (MESV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV), формирующего очаги в селезенке вируса (SFFV). Большинство ретровирусных векторов происходят от мышинных ретровирусов. Согласно некоторым вариантам осуществления к ретровирусам относятся происходящие из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно амфотропны, то есть они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая людей. Согласно одному варианту осуществления экспрессируемый ген заменяет ретровирусные последовательности gag,

pol и/или env. Описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5219740; 6207453; 5219740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa *et al.* (1991) *Virology* 180:849-852; Burns *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109).

[0344] Известны способы лентивирусной трансдукции. Примеры способов описаны, например, в документах 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.

[0345] Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (смотри, например, документы Chicaubam *et al.*, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo *et al.* (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (смотри, например, документы Manuri *et al.* (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma *et al.* (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang *et al.* (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунные клетки включают трансфекцию фосфатом кальция (например, как описано в документе *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N.Y.), слияние протопластов, опосредованную катионными липосомами трансфекцию; бомбардировку микрочастицами с помощью вольфрамовых частиц (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); и соосаждение ДНК с фосфатом стронция (Brash *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

[0346] Другими подходами и векторами для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рекомбинантные продукты, являются описанные, например, в публикации международной заявки на выдачу патента № WO2014055668 и патенте США № 7446190.

[0347] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, например Т-клетки, могут быть трансфицированы или во время, или после размножения, например Т-клеточным рецептором (TCR) или химерным антигенным рецептором (CAR). Эту трансфекцию для введения гена желаемого рецептора можно осуществлять, например, с помощью любого подходящего ретровирусного вектора. Затем генетически модифицированную популяцию клеток можно освободить от первоначального стимула (стимула анти-CD3/анти-CD28, например) и после этого стимулировать вторым типом стимула, например, через рецептор, введенный *de novo*. Этот второй тип стимула может включать антигенный стимул в форме пептида/молекулы МНС, когнатного (сшивающего) лиганда генетически введенного рецептора (например, природного лиганда CAR) или

любого лиганда (такого как антитело), который непосредственно связывается в каркасе нового рецептора (например, путем распознавания константных областей в рецепторе). Смотри, например, Cheadle *et al.*, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett *et al.*, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).

[0348] В некоторых случаях можно использовать вектор, который не требует, чтобы клетки, например Т-клетки, были активированы. В некоторых таких случаях клетки могут быть выбраны и/или трансдуцированы до активации. Таким образом, клетки могут быть сконструированы до или после культивирования клеток и в некоторых случаях одновременно или во время по меньшей мере части культивирования.

[0349] Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например генов для введения, есть гены, которые улучшают эффективность терапии, например, путем стимулирования жизнеспособности и/или функции перенесенных клеток; гены, обеспечивающие генетический маркер для селекции и/или оценки клеток, например, для оценки выживаемости или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делающие клетку восприимчивой к отрицательному отбору *in vivo*, как описано в документах Lupton S. D. *et al.*, *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell *et al.*, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); смотри также публикации Lupton *et al.* PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601, описывающие применение бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных в результате слияния доминантного положительного селектируемого маркера с отрицательным селектируемым маркером. Смотри, например, Riddell *et al.*, патент США № 6040177, столбцы 14-17.

С. Клетки и подготовка клеток для генной инженерии

[0350] Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, то есть обычно не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, таком как образец, полученный из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в конструируемой клетке и/или организме, из которого происходит такая клетка. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновые кислоты являются не встречающимися в природе, такими как нуклеиновая кислота, не найденная в природе, включая содержащие химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующие различные домены из множества разных типов клеток.

[0351] Клетки обычно представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и обычно представляют собой клетки человека. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки получают из крови, костного мозга, лимфы

или лимфоидных органов, и они представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или NK-клетки. Другими примерами клеток служат стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетки обычно представляют собой первичные клетки, такие как выделенные непосредственно у субъекта и/или выделенные у субъекта и замороженные. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки включают один или несколько подтипов Т-клеток или других типов клеток, например целые популяции Т-клеток, CD4⁺ клетки, CD8⁺ клетки и их субпопуляции, такие как определенные функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом к дифференцировке, способностью к размножению, рециркуляции, локализации и/или персистенции, антигенной специфичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, профилем секреции маркеров или цитокинов и/или степенью дифференцировки. Что касается субъекта, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. К способам относятся готовые способы. Согласно некоторым аспектам, например, для готовых технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, такими как стволовые клетки, такие как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают выделение клеток у субъекта, их получение, обработку, культивирование и/или конструирование и повторное введение их тому же субъекту до или после криоконсервации.

[0352] Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток, и/или CD4⁺, и/или CD8⁺ Т-клеток есть наивные Т-клетки (T_N), 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), природные и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как TH1-клетки, TH2-клетки, TH3-клетки, TH17-клетки, TH9-клетки, TH22-клетки, фолликулярные хелперные Т-клетки, альфа/бета-Т-клетки и дельта/гамма-Т-клетки.

[0353] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки представляют собой клетки-естественные киллеры (natural killer, NK). Согласно некоторым вариантам осуществления клетки представляют собой моноциты или гранулоциты, например

миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

[0354] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, введенных посредством генной инженерии, и поэтому экспрессируют рекомбинантные или генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, то есть обычно не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, таком как образец, полученный из другого организма или клетки, которые, например, обычно не обнаруживаются в конструируемой клетке и/или организме, из которого происходит такая клетка. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновые кислоты являются не встречающимися в природе, такими как нуклеиновая кислота, не найденная в природе, включая содержащие химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующие различные домены из множества разных типов клеток.

[0355] Согласно некоторым вариантам осуществления получение сконструированных клеток предусматривает одну или несколько стадий культивирования и/или получения. Клетки для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей трансгенный рецептор, такой как CAR, могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный или происходящий от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, у которого выделена клетка, является субъектом, имеющим заболевание или состояние или нуждающимся в клеточной терапии, или которому будут вводить клеточную терапию. Субъект согласно некоторым вариантам осуществления является человеком, нуждающимся в конкретном терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой клетки выделяют, обрабатывают и/или конструируют.

[0356] Соответственно, клетки согласно некоторым вариантам осуществления представляют собой первичные клетки, например первичные человеческие клетки. Образцы включают ткань, жидкость и другие образцы, взятые непосредственно у субъекта, а также образцы, полученные в результате одной или нескольких стадий обработки, таких как разделение, центрифугирование, генная инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), промывание и/или инкубация. Биологический образец может представлять собой образец, полученный непосредственно из биологического источника, или образец, который обработан. Биологические образцы включают, но без ограничения, жидкости организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая обработанные образцы, полученные из них.

[0357] Согласно некоторым аспектам образец, из которого клетки получают или выделяют, представляет собой кровь или полученный из крови образец, или представляет собой или получен из продукта афереза или лейкофереза. Примерами образцов служат цельная кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсия ткани, опухоль, лейкоз, лимфома, лимфатический узел, связанная с кишечником лимфоидная ткань, связанная со слизистой оболочкой лимфоидная ткань, селезенка, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстая кишка, почка, поджелудочная железа, молочная железа, кость, предстательная железа, шейка матки, яички, яичники, миндалины или другой орган и/или клетки, полученные из них. Образцы включают, в контексте клеточной терапии, например адоптивной клеточной терапии, образцы из аутологичных и аллогенных источников.

[0358] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки происходят из клеточных линий, например линий Т-клеток. Клетки согласно некоторым вариантам осуществления получают из ксеногенного источника, например от мыши, крысы, отличного от человека примата, и свиньи.

[0359] Согласно некоторым вариантам осуществления выделение клеток предусматривает одну или несколько стадий получения и/или разделения клеток на основе неаффинности. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или нескольких реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизиса или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам.

[0360] В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, с помощью афереза или лейкофереза. Образцы согласно некоторым аспектам содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и/или тромбоциты, а согласно некоторым аспектам содержат клетки, отличные от красных кровяных клеток и тромбоцитов.

[0361] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки крови, собранные у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). Согласно некоторым вариантам осуществления раствор для промывания не содержит кальция, и/или магния, и/или многих или всех двухвалентных катионов.

Согласно некоторым аспектам стадию промывания выполняют с помощью полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. Согласно некоторым аспектам стадию промывания выполняют с помощью тангенциальной проточной фильтрации (tangential flow filtration, TFF) в соответствии с инструкциями производителя. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки после промывания ресуспендируют в различных биосовместимых буферах, таких как, например, PBS без $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$. Согласно определенным вариантам осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, и клетки непосредственно ресуспендируют в культуральной среде.

[0362] Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение белых кровяных клеток из периферической крови путем лизиса красных кровяных клеток и центрифугирования в градиенте перколла или фиколла.

[0363] Согласно некоторым вариантам осуществления способы выделения предусматривают разделение различных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. Согласно некоторым вариантам осуществления разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделение согласно некоторым аспектам предусматривает разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии клетками или уровня экспрессии одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывания и отделения клеток, связавшихся с антителом или партнером по связыванию, от тех клеток, которые не связались с антителом или партнером по связыванию.

[0364] Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, при котором клетки, связавшиеся с реагентами, сохраняют для дальнейшего использования, и/или отрицательном отборе, при котором сохраняют клетки, не связавшиеся с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции сохраняют для дальнейшего использования. Согласно некоторым аспектам отрицательный отбор может быть особенно полезен, когда нет доступных антител, которые специфически идентифицируют тип клеток в гетерогенной популяции, так что

разделение лучше всего проводить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

[0365] Разделение не обязательно должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор или обогащение клетками определенного типа, такими как экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процентной доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих этот маркер. Аналогичным образом, отрицательный отбор, удаление или обеднение клетками определенного типа, такими как экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процентной доли таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

[0366] В некоторых примерах осуществляют несколько циклов стадий разделения, в которых положительно или отрицательно выбранная на одной стадии фракция подвергается другой стадии разделения, такой как последующий положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах одна стадия разделения может обеднять клетками, экспрессирующими несколько маркеров одновременно, например, путем инкубации клеток с несколькими антителами или партнерами по связыванию, причем каждый из них специфичен к маркеру, нацеленному на отрицательный отбор. Аналогично, несколько типов клеток могут быть одновременно положительно отобраны путем инкубации клеток с несколькими антителами или партнерами по связыванию, экспрессируемыми на различных типах клеток.

[0367] Например, согласно некоторым аспектам конкретные субпопуляции Т-клеток, такие как клетки, положительные по одному или нескольким поверхностным маркерам или экспрессирующие их высокие уровни, например $CD28^+$, $CD62L^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD127^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$ и/или $CD45RO^+$ Т-клетки, выделяют с помощью методов положительного или отрицательного отбора.

[0368] Например, $CD3^+$, $CD28^+$ Т-клетки могут быть положительно отобраны с использованием анти-CD3/анти-CD28-конъюгированных магнитных гранул (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

[0369] Согласно некоторым вариантам осуществления выделение осуществляют путем обогащения конкретной популяцией клеток с помощью положительного отбора или обеднения конкретной популяцией клеток с помощью отрицательного отбора. Согласно некоторым вариантам осуществления положительный или отрицательный отбор осуществляют путем инкубации клеток с одним или несколькими антителами или другими связывающими средствами, которые специфически связываются с одним или

несколькими поверхностными маркерами, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно.

[0370] Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клетки отделяют от образца РВМС путем отрицательного отбора маркеров, экспрессируемых на не-Т-клетках, таких как В-клетки, моноциты или другие белые кровяные клетки, таких как CD14. Согласно некоторым аспектам стадию отбора по CD4⁺ или CD8⁺ используют для разделения хелперных CD4⁺ и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. Такие CD4⁺ и CD8⁺ популяции могут быть дополнительно рассортированы на субпопуляции путем положительного или отрицательного отбора по маркерам, экспрессируемым или экспрессируемым в относительно более высокой степени на одной или нескольких субпопуляциях наивных, памяти и/или эффекторных Т-клеток.

[0371] Согласно некоторым вариантам осуществления CD8⁺ клетки дополнительно обогащают или обедняют наивными клетками, центральными клетками памяти, эффекторными клетками памяти и/или центральными стволовыми клетками памяти, например, путем положительного или отрицательного отбора на основе поверхностных антигенов, ассоциированных с соответствующей субпопуляцией. Согласно некоторым вариантам осуществления обогащение центральными Т-клетками (Т_{СМ}) памяти осуществляют для повышения эффективности, например для улучшения продолжительной выживаемости, размножения и/или приживления после введения, что согласно некоторым аспектам является особенно надежным в таких субпопуляциях. Смотри документы Terakura *et al.* (2012) *Blood*,1:72–82; Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701. Согласно некоторым вариантам осуществления объединение Т_{СМ}-обогащенных CD8⁺ Т-клеток и CD4⁺ Т-клеток дополнительно повышает эффективность.

[0372] Согласно вариантам осуществления Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L⁺, так и в CD62L⁻ подмножествах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. РВМС могут быть обогащены или обеднены фракциями CD62L⁻CD8⁺ и/или CD62L⁺CD8⁺, например, с использованием анти-CD8 и анти-CD62L антител.

[0373] Согласно некоторым вариантам осуществления обогащение центральными Т-клетками (Т_{СМ}) памяти основано на положительной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; согласно некоторым аспектам оно основано на отрицательном отборе по клеткам, экспрессирующим или высоко экспрессирующим CD45RA и/или гранзим В. Согласно некоторым аспектам выделение CD8⁺ популяции, обогащенной Т_{СМ}-клетками осуществляют путем обеднения клетками, экспрессирующими CD4, CD14, CD45RA, и положительного отбора или

обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. Согласно одному аспекту обогащение центральными Т-клетками (Т_{СМ}) памяти осуществляют, начиная с отрицательной фракции клеток, отобранной на основе экспрессии CD4, которую подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA и положительному отбору на основе CD62L. Такой отбор согласно некоторым аспектам осуществляют одновременно, а согласно другим аспектам осуществляют последовательно в любом порядке. Согласно некоторым аспектам ту же стадию отбора на основе экспрессии CD4, использованную при получении популяции или субпопуляции CD8⁺ клеток, также используют для создания популяции или субпопуляции CD4⁺ клеток, так что как положительную, так и отрицательную фракции из разделения на основе CD4 сохраняют и используют на последующих стадиях способов, необязательно после одной или нескольких стадий положительного или отрицательного отбора.

[0374] В конкретном примере образец РВМС или другой образец белых кровяных клеток подвергают отбору CD4⁺ клеток, причем сохраняют как отрицательную, так и положительную фракции. Затем отрицательную фракцию подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA или CD19 и положительному отбору на основе маркера, характерного для центральных Т-клеток памяти, таких как CD62L или CCR7, причем положительный и отрицательный отбор осуществляют в любом порядке.

[0375] CD4⁺ Т-хелперные клетки сортируют на наивные, центральные памяти и эффекторные клетки путем идентификации клеточных популяций, которые содержат антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты могут быть получены с помощью стандартных способов. Согласно некоторым вариантам осуществления наивные CD4⁺ Т-лимфоциты представляют собой CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ Т-клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления центральные CD4⁺ клетки памяти представляют собой CD62L⁺ и CD45RO⁺. Согласно некоторым вариантам осуществления эффекторные CD4⁺ клетки представляют собой CD62L⁻ и CD45RO⁻.

[0376] В одном примере для обогащения CD4⁺ клетками с помощью отрицательного отбора коктейль моноклональных антител обычно включает в себя антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или партнер по связыванию связаны с твердой подложкой или матрицей, таким как магнитная гранула или парамагнитная гранула, чтобы обеспечивать разделение клеток для положительного и/или отрицательного отбора. Например, согласно некоторым вариантам осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют с использованием методов иммуномагнитного (или аффинномагнитного) разделения (обзор приведен в *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: Metastasis Research

Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

[0377] Согласно некоторым аспектам образец или композиция клеток, подлежащие разделению, инкубируют с небольшим намагничивающимся или магнитно чувствительным материалом, таким как магнитно чувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные гранулы (например, такие как гранулы Dynalbeads или MACS). Магнитно чувствительный материал, например частица, обычно непосредственно или опосредованно прикреплен к партнеру по связыванию, например антителу, которое специфически связывается с молекулой, например поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые желательно отделить, например, которые желательно отрицательно или положительно отобрать.

[0378] Согласно некоторым вариантам осуществления магнитная частица или гранула содержит магнитно чувствительный материал, связанный со специфически связывающим элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует множество хорошо известных магнитно чувствительных материалов, применяемых в способах магнитного разделения. Подходящие магнитные частицы включают описанные в документе Molday, патент США № 4452773, и в описании европейского патента EP 452342 B, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Другими примерами являются частицы коллоидного размера, такие как описанные в документах Owen, патент США № 4795698, и Liberti *et al.*, патент США № 5200084.

[0379] Инкубацию обычно осуществляют в условиях, при которых антитела, или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или грануле, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности, если они присутствуют на клетках в образце.

[0380] Согласно некоторым аспектам образец помещают в магнитное поле, и клетки, содержащие прикрепленные к ним магнитно чувствительные или намагничивающиеся частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. При положительном отборе сохраняют клетки, которые притянуты к магниту; при отрицательном отборе сохраняют клетки, которые не притянуты (немеченые клетки). Согласно некоторым аспектам сочетание положительного и отрицательного отбора осуществляют во время одной и той же стадии отбора, причем положительную и

отрицательную фракции сохраняют и подвергают дальнейшей обработке или подвергают дальнейшим стадиям разделения.

[0381] Согласно определенным вариантам осуществления магнитно чувствительные частицы покрыты первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. Согласно определенным вариантам осуществления магнитные частицы прикрепляются к клеткам через покрытие первичными антителами, специфическими к одному или нескольким маркерам. Согласно определенным вариантам осуществления клетки, а не гранулы метят с помощью первичного антитела или партнера по связыванию и затем добавляют магнитные частицы, покрытые специфичным к типу клеток вторичным антителом или другим партнером по связыванию (например, стрептавидином). Согласно определенным вариантам осуществления покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

[0382] Согласно некоторым вариантам осуществления магнитно чувствительные частицы оставляют прикрепленными к клеткам, которые впоследствии подлежат инкубации, культивированию и/или конструированию; согласно некоторым аспектам частицы оставляют прикрепленными к клеткам для введения пациенту. Согласно некоторым вариантам осуществления намагничивающиеся или магнитно чувствительные частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц из клеток известны и предусматривают, например, применение конкурирующих немеченых антител и намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами. Согласно некоторым вариантам осуществления намагничивающиеся частицы являются биоразлагаемыми.

[0383] Согласно некоторым вариантам осуществления отбор на основе аффинности осуществляют посредством магнитно-активируемой сортировки клеток (Magnetic Activated Cell Sorting, MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Системы магнитно-активируемой сортировки клеток (MACS) способны к отбору с высокой степенью чистоты клеток, к которым прикреплены намагниченные частицы. Согласно определенным вариантам осуществления MACS работает в режиме, в котором не мишени и мишени последовательно элюируются после приложения внешнего магнитного поля. То есть клетки, прикрепленные к намагниченным частицам, удерживаются на месте, в то время как неприкрепленные элюируются. Затем, после завершения этой первой стадии элюирования, частицы, которые были захвачены магнитным полем и не имели возможности элюироваться, каким-либо образом освобождаются, так что их можно

элюировать и восстанавливать. Согласно определенным вариантам осуществления клетки, не являющиеся мишенями, метят и удаляют из гетерогенной популяции клеток.

[0384] Согласно определенным вариантам осуществления выделение или разделение осуществляют с использованием системы, устройства или аппарата, которые выполняют в способах одну или несколько стадий выделения, получения клеток, разделения, обработки, инкубации, культивирования и/или составления. Согласно некоторым аспектам систему используют для выполнения каждой из этих стадий в закрытом или стерильном окружении, например, чтобы свести к минимуму ошибки, манипуляции пользователя и/или загрязнение. В одном примере система представляет собой систему, описанную в международной заявке на выдачу патента, публикация № WO2009/072003, или в US 20110003380 A1.

[0385] Согласно некоторым вариантам осуществления система или аппарат выполняют одну или несколько, например все, из стадий выделения, обработки, конструирования и составления в интегрированной или автономной системе и/или автоматизированным или программируемым образом. Согласно некоторым аспектам система или аппарат включают в себя компьютер и/или компьютерную программу, взаимодействующие с системой или аппаратом, которые позволяют пользователю программировать, контролировать, оценивать результат и/или корректировать различные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и составления.

[0386] Согласно некоторым аспектам разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на клиническом уровне в закрытой и стерильной системе. Компоненты могут включать встроенный микрокомпьютер, блок магнитного разделения, перистальтический насос и различные пережимные клапаны. Встроенный компьютер согласно некоторым аспектам управляет всеми компонентами прибора и предписывает системе выполнять повторяющиеся процедуры в стандартизированной последовательности. Блок магнитного разделения согласно некоторым аспектам включает в себя подвижный постоянный магнит и держатель селекционной колонны. Перистальтический насос управляет скоростью потока по всему набору трубок и вместе с пережимными клапанами обеспечивает контролируемый поток буфера через систему и постоянное суспендирование клеток.

[0387] Система CliniMACS согласно некоторым аспектам использует связанные с антителами намагничивающиеся частицы, которые поставляются в стерильном апиrogenном растворе. Согласно некоторым вариантам осуществления после мечения клеток магнитными частицами клетки промывают для удаления излишков частиц. Затем

мешок для подготовки клеток подсоединяют к набору трубок, который, в свою очередь, соединяют с мешком, содержащим буфер, и мешком для сбора клеток. Набор трубок состоит из предварительно собранных стерильных трубок, включая предколону и разделительную колонку, и предназначен только для одноразового использования. После запуска программы разделения система автоматически наносит образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки удерживаются внутри колонки, а немеченые клетки удаляются посредством серии стадий промывания. Согласно некоторым вариантам осуществления популяции клеток для применения со способами, описанными в настоящем документе, являются немечеными и не удерживаются в колонке. Согласно некоторым вариантам осуществления популяции клеток для применения со способами, описанными в настоящем документе, являются мечеными и удерживаются в колонке. Согласно некоторым вариантам осуществления популяции клеток для применения со способами, описанными в настоящем документе, элюируются из колонки после удаления магнитного поля и собираются в мешке для сбора клеток.

[0388] Согласно определенным вариантам осуществления разделение и/или другие стадии осуществляют с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). Система CliniMACS Prodigy согласно некоторым аспектам оснащена блоком обработки клеток, который позволяет автоматически промывать и фракционировать клетки с помощью центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy может также включать в себя встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток путем распознавания макроскопических слоев исходного клеточного продукта. Например, периферическая кровь автоматически разделяется на слои эритроцитов, белых кровяных клеток и плазмы. Система CliniMACS Prodigy может также включать в себя встроенную камеру для культивирования клеток, которая выполняет протоколы культивирования клеток, такие как, например, дифференцировка и размножение клеток, загрузка антигена и продолжительное культивирование клеток. Входные порты позволяют стерильно извлекать и пополнять среду, а клетки можно контролировать с помощью встроенного микроскопа. См. также, например, документы Klebanoff *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9): 651–660, Terakura *et al.* (2012) *Blood*.1:72–82, и Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689–701.

[0389] Согласно некоторым вариантам осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или обедняют) посредством проточной цитометрии, при которой клетки, окрашенные на множество маркеров клеточной поверхности, переносятся в потоке жидкости. Согласно некоторым вариантам

осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или обедняют) посредством препаративной (FACS)-сортировки. Согласно определенным вариантам осуществления популяцию клеток, описанную в настоящем документе, собирают и обогащают (или обедняют) посредством использования чипов микроэлектромеханических систем (microelectromechanical systems, MEMS) в сочетании с системой детектирования на основе FACS (смотри, например, документы WO 2010/033140, Cho *et al.* (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; и Godin *et al.* (2008) *J Biophoton.* 1(5):355–376). В обоих случаях клетки можно пометить несколькими маркерами, что обеспечивает выделение четко определенных подмножеств Т-клеток с высокой чистотой.

[0390] Согласно некоторым вариантам осуществления антитела или партнеры по связыванию помечают одним или несколькими детектируемыми маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфических к одному или нескольким маркерам клеточной поверхности, осуществляют в потоке жидкости, например, путем активируемой флуоресценцией сортировки клеток (fluorescence-activated cell sorting, FACS), включая препаративную (FACS) и/или чипы микроэлектромеханических систем (MEMS), например, в сочетании с системой детектирования на основе проточной цитометрии. Такие способы позволяют проводить положительный и отрицательный отбор на основе нескольких маркеров одновременно.

[0391] Согласно некоторым вариантам осуществления способы получения предусматривают стадии замораживания, например криоконсервации, клеток или до, или после выделения, инкубации и/или конструирования. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия замораживания и последующего оттаивания удаляет гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты из клеточной популяции. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после стадии промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. Согласно некоторым аспектам можно использовать любой из множества известных растворов и параметров замораживания. Один пример предусматривает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA), или другой подходящей среды для замораживания клеток. Затем его разбавляют средой 1:1, так что конечная концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки обычно замораживают до -80°C со скоростью 1°C в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

[0392] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки инкубируют и/или культивируют до или в связи с генной инженерией. Стадии инкубации могут предусматривать культивирование, выращивание, стимуляцию, активацию и/или размножение. Инкубацию и/или инженерию можно проводить в культуральном сосуде, таком как блок, камера, лунка, колонка, пробирка, набор трубок, клапан, флакон, культуральная чашка, мешок или другой контейнер для культивирования или выращивания клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления композиции или клетки инкубируют при стимулирующих условиях или в присутствии стимулирующего средства. К таким условиям относятся условия, предназначенные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживания клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для подготовки клеток к генной инженерии, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

[0393] Условия могут предусматривать одну или несколько конкретных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого газа, время, средства, например питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, белки слияния, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие средства, предназначенные для активации клеток.

[0394] Согласно некоторым вариантам осуществления к стимулирующим условиям или средствам относятся одно или несколько средств, например лиганд, который способен активировать или стимулировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. Согласно некоторым аспектам средство включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. К таким средствам могут относиться антитела, такие как специфические к TCR, например анти-CD3. Согласно некоторым вариантам осуществления к стимулирующим условиям относятся одно или несколько средств, например лиганд, который способен стимулировать костимулирующий рецептор, например анти-CD28. Согласно некоторым вариантам осуществления такие средства и/или лиганды могут быть связаны с твердой подложкой, такой как гранула, и/или могут представлять собой один или несколько цитокинов. Необязательно, способ размножения может дополнительно предусматривать стадию добавления анти-CD3 и/или анти-CD28 антитела в культуральную среду (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 нг/мл). Согласно некоторым вариантам осуществления к стимулирующим средствам относятся IL-2, IL-15 и/или IL-7. Согласно некоторым аспектам концентрация IL-2 составляет по меньшей мере приблизительно 10 единиц на мл.

[0395] Согласно некоторым аспектам инкубацию осуществляют в соответствии с такими методами, как описанные в патенте США № 6040177, Riddell *et al.*, документах Klebanoff *et al.*(2012) *J Immunother.* 35(9): 651–660, Terakura *et al.* (2012) *Blood.*1:72–82, и/или Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

[0396] Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клетки размножают путем добавления к иницирующей культивирование композиции фидерных клеток, таких как неделящиеся моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) (например, таким образом, что полученная популяция клеток содержит по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или более фидерных клеток РВМС для каждого Т-лимфоцита в исходной популяции, подлежащей размножению); и инкубации культуры (например, в течение времени, достаточного увеличения количества Т-клеток). Согласно некоторым аспектам неделящиеся фидерные клетки могут содержать подвергнутые гамма-облучению фидерные клетки РВМС. Согласно некоторым вариантам осуществления РВМС облучают гамма-лучами в диапазоне от приблизительно 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. Согласно некоторым аспектам фидерные клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

[0397] Согласно некоторым вариантам осуществления к стимулирующим условиям относится температура, подходящая для роста человеческих Т-лимфоцитов, например по меньшей мере приблизительно 25 градусов Цельсия, обычно по меньшей мере приблизительно 30 градусов и обычно 37 градусов Цельсия или приблизительно 37 градусов Цельсия. Необязательно, инкубация может дополнительно предусматривать добавление неделящихся EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (lymphoblastoid cells, LCL) в качестве фидерных клеток. LCL могут быть облучены гамма-лучами в диапазоне от приблизительно 6000 до 10000 рад. Фидерные LCL-клетки согласно некоторым аспектам предоставляются в любом подходящем количестве, например при соотношении фидерных LCL-клеток и исходных Т-лимфоцитов по меньшей мере приблизительно 10:1.

[0398] Согласно вариантам осуществления антигенспецифические Т-клетки, такие как антигенспецифические CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки, получают посредством стимуляции наивных или антигенспецифических Т-лимфоцитов антигеном. Например, антигенспецифические линии или клоны Т-клеток могут быть произведены к антигенам цитомегаловируса посредством выделения Т-клеток от инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном.

III. Примеры исходов лечения и способы их оценки

[0399] Согласно некоторым вариантам осуществления способов, композиций, комбинаций, применений, наборов и готовых изделий, предложенных в настоящем документе, предлагаемая комбинированная терапия приводит к одному или нескольким исходам лечения, таким как признак, ассоциированный с любыми одним или несколькими из параметров, ассоциированных с терапией или лечением, как описано ниже. Согласно некоторым вариантам осуществления способ является любым, описанным в разделе I. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает оценку воздействия, персистенции и пролиферации Т-клеток, например Т-клеток, вводимых для основанной на Т-клетках терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления воздействие, или продолжительное размножение и/или персистенцию клеток, и/или изменения клеточных фенотипов или функциональной активности клеток, например клеток, вводимых для иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, в способах, предложенных в настоящем документе, можно измерять путем оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, например Т-клеточной терапии, до, во время или после введения комбинированной терапии, предложенной в настоящем документе.

[0400] Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированная терапия может дополнительно предусматривать одну или несколько стадий скрининга для идентификации субъектов для лечения с помощью комбинированной терапии и/или продолжения комбинированной терапии и/или стадию оценки исходов лечения и/или наблюдения за исходами лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия оценки исходов лечения может предусматривать стадии оценки и/или наблюдения за лечением и/или идентификации субъектов для введения дополнительных или оставшихся стадий терапии и/или для повторения терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления стадию скрининга и/или оценку исходов лечения можно использовать для определения дозы, частоты, продолжительности, времени введения и/или порядка комбинированной терапии, предложенной в настоящем документе.

[0401] Согласно некоторым вариантам осуществления любую из стадий скрининга и/или оценку исходов лечения, описанные в настоящем документе, можно использовать до, во время, в течение или после введения одной или нескольких стадий предложенной комбинированной терапии, например введения Т-клеточной терапии (например, CAR-экспрессирующих Т-клеток) и/или соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления оценку проводят до, во время, в течение или после выполнения любого из способов, предложенных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам

осуществления оценку проводят до выполнения способов, предложенных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления оценку проводят после выполнения одной или нескольких стадий способов, предложенных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления оценку проводят до введения одной или нескольких стадий предложенной комбинированной терапии, например, для скрининга и идентификации пациентов, подходящий и/или восприимчивых к получению комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления оценку проводят во время, в течение или после введения одной или нескольких стадий предложенной комбинированной терапии, например, для оценки промежуточного или конечного исхода лечения, например для определения эффективности лечения, и/или чтобы определить, следует ли продолжать или повторять лечение, и/или чтобы определить, следует ли вводить оставшиеся стадии комбинированной терапии.

[0402] Согласно некоторым вариантам осуществления к исходам лечения относятся улучшение иммунной функции, например иммунной функции Т-клеток, вводимых для клеточной терапии, и/или эндогенных Т-клеток в организме. Согласно некоторым вариантам осуществления примерами исходов лечения служат, но без ограничения, усиление пролиферации Т-клеток, усиление функциональной активности Т-клеток, изменения в экспрессии фенотипических маркеров иммунных клеток, например, такие признаки, ассоциированные с сконструированными Т-клетками, например CAR-Т-клетками, вводимыми субъекту. Согласно некоторым вариантам осуществления примерами исходов лечения служат снижение бремени заболевания, например опухолевой нагрузки, улучшение клинических исходов и/или повышение эффективности терапии.

[0403] Согласно некоторым вариантам осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения предусматривают оценку выживаемости и/или функции Т-клеток, вводимых для клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения предусматривают оценку уровней цитокинов или факторов роста. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения предусматривают оценку бремени заболевания и/или улучшений, например оценку опухолевой нагрузки и/или клинических исходов. Согласно некоторым вариантам осуществления стадия скрининга и/или оценка исходов лечения могут предусматривать любой из способов оценки и/или анализов, описанных в настоящем документе и/или известных, и могут быть выполнены один или несколько раз, например, до, во время, в течение или после введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Примерами наборов параметров, связанных с исходом

лечения, которые можно оценивать согласно некоторым вариантам осуществления способов, предложенных в настоящем документе, служат профилем популяции иммунных клеток периферической крови и/или опухолевая нагрузка.

[0404] Согласно некоторым вариантам осуществления способы влияют на эффективность клеточной терапии у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления персистенция, размножение и/или присутствие экспрессирующих рекомбинантный рецептор, например CAR-экспрессирующих, клеток у субъекта после введения дозы клеток в способе с соединением С выше по сравнению с теми, которые достигаются посредством способа без введения соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления размножение и/или персистенцию вводимой Т-клеточной терапии, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, у субъекта оценивают по сравнению со способом, в котором Т-клеточную терапию вводят субъекту в отсутствие соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления способы приводят к тому, что вводимые Т-клетки демонстрируют увеличенное или продолжительное размножение и/или персистенцию у субъекта по сравнению со способом, в котором Т-клеточную терапию вводят субъекту в отсутствие соединения С.

[0405] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С снижает бремя заболевания, например опухолевую нагрузку, у субъекта по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в отсутствие соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С уменьшает количество бластов в костном мозге у субъекта по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в отсутствие соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С приводит к улучшению клинических исходов, например частоты объективного ответа (objective response rate, ORR), выживаемости без прогрессирования (progression-free survival, PFS) и общей выживаемости (overall survival, OS), по сравнению со способом, в котором дозу клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор, вводят субъекту в отсутствие соединения С.

[0406] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект может быть подвергнут скринингу до введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии. Например, субъект может быть подвергнут скринингу на характеристики заболевания и/или бремя заболевания, например опухолевую нагрузку, до введения комбинированной терапии для определения пригодности, отвечаемости и/или восприимчивости к введению комбинированной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления стадию скрининга и/или оценку исходов лечения можно использовать для

определения дозы, частоты, продолжительности, времени и/или порядка комбинированной терапии, предложенной в настоящем документе.

[0407] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект может быть подвергнут скринингу после введения одной из стадий комбинированной терапии для определения и идентификации субъектов, которые будут получать оставшиеся стадии комбинированной терапии, и/или для наблюдения за эффективностью терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления число, уровень или количество вводимых Т-клеток и/или пролиферацию и/или активность вводимых Т-клеток оценивают до введения и/или после введения соединения С.

[0408] Согласно некоторым вариантам осуществления определяют или оценивают изменение и/или альтерацию, например увеличение, повышение, уменьшение или снижение, уровней, значений или измерений параметра или исхода по сравнению с уровнями, значениями или измерениями того же параметра или исхода в другой момент времени оценки, в других условиях, при эталонном значении и/или у другого субъекта. Например, согласно некоторым вариантам осуществления можно определять кратность изменения, например увеличения или уменьшения, конкретных параметров, например количества сконструированных Т-клеток в образце, по сравнению с тем же параметром в других условиях, например до введения соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления определяют уровни, значения или измерения двух или более параметров и сравнивают относительные уровни. Согласно некоторым вариантам осуществления определенные уровни, значения или измерения параметров сравнивают с уровнями, значениями или измерениями в контрольном образце или необработанном образце. Согласно некоторым вариантам осуществления определенные уровни, значения или измерения параметров сравнивают с уровнями в образце от того же субъекта, но в другой момент времени. Значения, полученные при количественном определении отдельного параметра, можно комбинировать с целью оценки заболевания, например, путем формирования арифметической или логической операции над уровнями, значениями или измерениями параметров с использованием многопараметрического анализа. Согласно некоторым вариантам осуществления можно рассчитывать соотношение двух или более конкретных параметров.

А. Воздействие, персистенция и пролиферация Т-клеток

[0409] Согласно некоторым вариантам осуществления параметр, связанный с терапией или исходом лечения, к которым относятся параметры, которые можно оценивать при стадиях скрининга, и/или при оценке исходов лечения, и/или при наблюдении за исходами лечения, представляет собой или включает в себя оценку

воздействия, персистенции и пролиферации Т-клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления повышенное воздействие, или продолжительность размножения и/или персистенции клеток, и/или изменения клеточных фенотипов или функциональной активности клеток, например клеток, вводимых для иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, в способах, предложенных в настоящем документе, можно измерять посредством оценки характеристик Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. Согласно некоторым вариантам осуществления такие анализы можно использовать для определения или подтверждения функции Т-клеток, используемых для иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, до или после введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии, предложенной в настоящем документе.

[0410] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С предназначено для стимулирования воздействия на субъекта клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, например, путем стимулирования их размножения и/или персистенции во времени. Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клеточная терапия демонстрирует повышенные или продолжительные размножение и/или персистенцию у субъекта по сравнению со способом, в котором Т-клеточную терапию вводят субъекту в отсутствие соединения С.

[0411] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы увеличивают воздействие на субъекта вводимых клеток (например, увеличивают количество клеток или продолжительность во времени) и/или улучшают эффективность и терапевтические исходы иммунотерапии, например Т-клеточной терапии. Согласно некоторым аспектам способы имеют преимущество, состоящее в том, что более высокая и/или более продолжительная степень воздействия на клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы, например CAR-экспрессирующие клетки, улучшает исходы лечения по сравнению с другими способами. К таким исходам могут относиться выживаемость и ремиссия у пациента даже у индивидуумов с тяжелой опухолевой нагрузкой.

[0412] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С может увеличивать максимальное, общее воздействие клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, и/или его продолжительность у субъекта по сравнению с введением только Т-клеток в отсутствие соединения С. Согласно некоторым аспектам введение соединения С в контексте высокого бремени заболевания (и, следовательно, более высоких количеств антигена) и/или более агрессивного или резистентного В-клеточного злокачественного новообразования повышает эффективность

по сравнению с введением только Т-клеток в отсутствие соединения С в том же контексте, что может приводить к иммуносупрессии, анергии и/или истощению, что может препятствовать размножению и/или персистенции клеток.

[0413] Согласно некоторым вариантам осуществления детектируют присутствие и/или количество клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, вводимых для Т-клеточной терапии), у субъекта после введения Т-клеток и до, во время и/или после введения соединения С. Согласно некоторым аспектам для оценки количества клеток, экспрессирующих рекомбинантный рецептор (например, CAR-экспрессирующих клеток, вводимых для Т-клеточной терапии), в образце крови, или сыворотки, или органа, или ткани (например, в очаге заболевания, например в образце опухоли) субъекта используют количественную ПЦР (кПЦР). Согласно некоторым аспектам персистенцию количественно определяют как количество копий ДНК или плазмиды, кодирующей рецептор, например CAR, на микрограмм ДНК, например всей ДНК, полученной из образца, или как количество экспрессирующих рецептор, например CAR-экспрессирующих, клеток на микролитр образца, например, крови или сыворотки, или на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), или белых кровяных клеток, или Т-клеток на микролитр образца.

[0414] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки детектируют у субъекта через или по меньшей мере через 4, 7, 10, 14, 18, 21, 24, 27 или 28 дней после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток. Согласно некоторым аспектам клетки детектируют через или по меньшей мере через 2, 4 или 6 недель после или через 3, 6, или 12, 18, или 24, или 30, или 36 месяцев или через 1, 2, 3, 4, 5 или более лет после введения Т-клеток.

[0415] Согласно некоторым вариантам осуществления персистенция экспрессирующих рецептор клеток (например, CAR-экспрессирующих клеток) у субъекта в результате настоящих способов после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или соединения С выше по сравнению с той, которая могла бы быть достигнута с помощью альтернативных способов, таких как предусматривающие введение только иммунотерапии, например введение Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, в отсутствие соединения С.

[0416] Воздействие, например количество, клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, свидетельствующее о размножении и/или персистенции, может быть указано в терминах максимального количества клеток, воздействию которых подвергается субъект, продолжительности присутствия детектируемых клеток или клеток выше определенных количества или процентной доли, площади под кривой количества

клеток с течением времени и/или их комбинаций и их 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, сыворотки, плазмы или ткани, таком как образец опухоли, и/или проточные цитометрические анализы, детектирующие клетки, экспрессирующие рецептор, обычно с использованием антител, специфических к рецепторам. Также можно использовать клеточные анализы для детектирования количества или процентной доли функциональных клеток, таких как клетки, способные связываться, и/или нейтрализовать, и/или индуцировать ответы, например цитотоксические ответы, в отношении клеток заболевания или состояния или экспрессирующих антиген, распознаваемый рецептором.

[0417] Согласно некоторым аспектам повышенное воздействие на субъекта клеток включает в себя повышенное размножение клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления экспрессирующие рецептор клетки, например CAR-экспрессирующие клетки, размножаются у субъекта после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или после введения соединения С. Согласно некоторым аспектам способы приводят к большему размножению клеток по сравнению с другими способами, такими как предусматривающие введение Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, в отсутствие введения соединения С.

[0418] Согласно некоторым аспектам способ приводит к высокой пролиферации вводимых клеток *in vivo*, например, по данным измерения с помощью проточной цитометрии. Согласно некоторым аспектам обнаруживают высокие пиковые доли клеток. Например, согласно некоторым вариантам осуществления на пиковом или максимальном уровне после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или соединения С, в крови или очаге заболевания субъекта или в их фракции белых кровяных клеток, 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.

[0419] Согласно некоторым вариантам осуществления способ приводит к максимальной концентрации в крови, или сыворотке, или другой телесной жидкости, или органе, или ткани субъекта, 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 экспрессирующих CAR, клеток на общее количество мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), общее количество мононуклеарных клеток, общее количество Т-клеток или общее количество микролитров. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, экспрессирующие рецептор, детектируют в количестве по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50 или 60% от общего количества РВМС в крови субъекта и/или на этом 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 соединения С или в течение 1, 2, 3, 4 или 5 или более лет после такого введения.

[0420] Согласно некоторым аспектам способ приводит к повышению 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 количества копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, например CAR, на микрограмм ДНК, например, в сыворотке, плазме, крови или ткани, например в образце опухоли, субъекта.

[0421] Согласно некоторым вариантам осуществления клетки, экспрессирующие рецептор, детектируют в сыворотке, плазме, крови или ткани, например в образце опухоли, субъекта, например, с помощью указанного способа, такого как способ детектирования на основе кПЦР или проточной цитометрии, по меньшей мере 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 дней после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, или после введения соединения С, в течение по меньшей мере 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 соединения С.

[0422] Согласно некоторым аспектам 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, например экспрессирующих CAR, 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, обнаруживаются или присутствуют у субъекта или в его жидкости, плазме, сыворотке, ткани или их компартменте, например в крови, например в периферической крови, или в

очаге заболевания, например в опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления такие количество или концентрацию клеток детектируют у субъекта в течение по меньшей мере приблизительно 20 дней, по меньшей мере приблизительно 40 дней, или по меньшей мере приблизительно 60 дней, 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 соединения С. Такие количества клеток могут быть определены с помощью основанных на проточной цитометрии или основанных на количественной ПЦР способов и экстраполяции на общее количество клеток с использованием известных способов. Смотри, например, документы 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.

[0423] Согласно некоторым аспектам количество копий нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный рецептор, например количество копий вектора, на 100 клеток, например в периферической крови, или в костном мозге, или в другом компартменте, по измерениям с помощью 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 соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления количество копий вектора, 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 через приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели или по меньшей мере приблизительно 4 недели после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, или соединения С, 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.

[0424] Согласно некоторым аспектам рецептор, например CAR, экспрессируемый клетками, можно детектировать с помощью количественной ПЦР (кПЦР) или с помощью проточной цитометрии у субъекта, в его плазме, сыворотке, крови, ткани и/или очаге

заболевания, например очаге опухоли, через промежуток 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 чем 3 года после введения клеток, например после начала введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или соединения С.

[0425] Согласно некоторым вариантам осуществления площадь под кривой (AUC) для концентрации экспрессирующих рецептор (например, CAR) клеток в жидкости, плазме, сыворотке, крови, ткани, органе и/или очаге заболевания, например очаге опухоли, субъекта с течением времени после введения Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или соединения С больше по сравнению с той, которая была бы достигнута с помощью альтернативной схемы введения доз, при которой субъекту вводят Т-клетки, например CAR-экспрессирующие Т-клетки, в отсутствие введения соединения С.

[0426] Согласно некоторым аспектам способ приводит к высокой пролиферации вводимых клеток *in vivo*, например, по измерениям с помощью проточной цитометрии. Согласно некоторым аспектам обнаруживают высокие пиковые доли клеток. Например, согласно некоторым вариантам осуществления на пиковом или максимальном уровне после Т-клеток, например CAR-экспрессирующих Т-клеток, и/или соединения С, в крови, плазме, сыворотке, ткани или очаге заболевания субъекта или в их фракции белых кровяных клеток, 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.

[0427] Согласно некоторым аспектам повышенные или продолжительные размножение и/или персистенция дозы клеток у субъекта, которому вводили соединение С, связано с улучшением связанных с опухолью исходов у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления к связанным с опухолью исходам относятся уменьшение опухолевой нагрузки или уменьшение количества бластов в костном мозге у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления опухолевая нагрузка уменьшается на, или по меньшей мере на, или приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов после применения настоящего способа. Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания, размер опухоли, объем опухоли, масса опухоли и/или

опухолевая нагрузка или величина уменьшаются после дозы клеток по меньшей мере на или приблизительно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению субъектом, которого лечили с помощью способа, которые не предусматривает введение соединения С.

В. Функциональная активность Т-клеток

[0428] Согласно некоторым вариантам осуществления к параметрам, связанным с терапией или исходом лечения, к которым относятся параметры, которые можно оценивать на стадиях скрининга и/или при оценке исходов лечения и/или наблюдении за исходами лечения, относятся один или несколько параметров из активности, фенотипа, пролиферации или функции Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать любой из известных в данной области техники анализов для оценки активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии. До и/или после введения клеток и/или соединения С согласно некоторым вариантам осуществления измеряют биологическую активность сконструированных популяций клеток, например, с помощью любого из ряда известных способов. К параметрам для оценки относятся специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например по данным визуализации, или *ex vivo*, например по данным ELISA или проточной цитометрии. Согласно определенным вариантам осуществления способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерять с использованием любого подходящего известного способа, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в документах Kochenderfer *et al.*, *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009), и Herman *et al.*, *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004).

[0429] Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клетки, такие как экспрессирующие рекомбинантный рецептор (например, CAR) Т-клетки, можно оценивать до и/или после введения клеток и/или соединения С, чтобы оценить или определить, демонстрируют ли Т-клетки признаки истощения. В некоторых случаях истощение можно оценивать путем наблюдения за потерей функции Т-клеток, например за уменьшением или снижением антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности, такой как уменьшение или снижение способности продуцировать цитокины или управлять цитолитической активностью в отношении антигена-мишени. В некоторых случаях истощение также можно оценивать путем наблюдения за экспрессией поверхностных маркеров на Т-клетках (например, CD4 и/или CD4 Т-клетках), которые связаны с фенотипом истощения. К маркерам истощения относятся такие ингибирующие рецепторы, как PD-1, CTLA-4, LAG-3 и TIM-3.

[0430] Согласно некоторым вариантам осуществления такая уменьшенная или пониженная активность наблюдается с течением времени после введения субъекту и/или после продолжительного воздействия антигена.

[0431] Согласно конкретным вариантам осуществления предложены способы (i) обеспечения упомянутого повышения антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности и (ii) предотвращения, ингибирования или задержки упомянутого возникновения фенотипа истощения и/или обращения упомянутого фенотипа истощения. Согласно некоторым вариантам осуществления количество, продолжительность и/или частота эффективны (i) для обеспечения упомянутого повышения антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или задержки упомянутого возникновения фенотипа истощения. Согласно другим вариантам осуществления количество, продолжительность и/или частота эффективны (i) для обеспечения упомянутого повышения антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или задержки упомянутого возникновения фенотипа истощения и обращения упомянутого фенотипа истощения.

[0432] Согласно некоторым вариантам осуществления фенотип истощения применительно к Т-клетке или популяции Т-клеток, содержит: повышение уровня или степени поверхностной экспрессии на Т-клетке или Т-клетках, или процентной доли упомянутой популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностную экспрессию, одного или нескольких маркеров истощения, необязательно 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях; или снижение уровня или степени активности, проявляемой упомянутыми Т-клетками или популяцией Т-клеток при воздействии антигена или специфического к антигенному рецептору средства, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях.

[0433] Согласно определенным вариантам осуществления биологическую активность клеток измеряют 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 оценки цитолитической активности.

[0434] Согласно некоторым вариантам осуществления к анализам активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, относятся, но без ограничения, ELISPOT, ELISA, клеточная пролиферация, анализ цитотоксических лимфоцитов (cytotoxic lymphocyte, CTL), связывание с эпитопом, антигеном или лигандом Т-клеток или окрашивание внутриклеточных цитокинов, анализы пролиферации, анализы секреции лимфокинов,

прямые анализы цитотоксичности и анализы предельных разведений. Согласно некоторым вариантам осуществления пролиферативные ответы Т-клеток можно измерять, например, с помощью включения ³H-тимидина, BrdU (5-бром-2'-дезоксинуридина) или 2'-дезоксидезокси-5-этилинуридина (EdU) в их ДНК или анализов разведения красителя с использованием таких красителей, как сукцинимидиловый эфир диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE), CellTrace Violet или мембранный краситель PKH26.

[0435] Согласно некоторым вариантам осуществления оценка активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, предусматривает измерение продукции цитокинов Т-клетками и/или измерение продукции цитокинов в биологическом образце субъекта, например, в образцах плазмы, сыворотки, крови и/или ткани, например образцах опухоли. В некоторых случаях к таким измеряемым цитокинам могут относиться, без ограничения, 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). Анализы для измерения цитокинов хорошо известны, и к ним относятся, без ограничения, ELISA, внутриклеточное окрашивание цитокинов, цитометрический анализ на гранулах, ПЦР-РВ, ELISPOT, проточная цитометрия и биоанализы, в которых клетки, реагирующие на соответствующий цитокин, тестируют на отвечаемость (например, пролиферацию) в присутствии тестируемого образца.

[0436] Согласно некоторым вариантам осуществления оценка активности, фенотипов, пролиферации и/или функции Т-клеток, например Т-клеток, вводимых для Т-клеточной терапии, предусматривает оценку клеточных фенотипов, например экспрессии конкретных маркеров клеточной поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления Т-клетки, например Т-клетки, вводимые для Т-клеточной терапии, оценивают в отношении экспрессии маркеров активации Т-клеток, маркеров истощения Т-клеток и/или маркеров дифференцировки Т-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления клеточный фенотип оценивают до введения. Согласно некоторым вариантам осуществления клеточный фенотип оценивают во время или после введения клеточной терапии и/или соединения С. К маркерам активации Т-клеток, маркерам истощения Т-клеток и/или маркерам дифференцировки Т-клеток для оценки относятся любые маркеры, известные для конкретного подмножества Т-клеток, например CD25, CD38, человеческий лейкоцитарный антиген-DR (HLA-DR), CD69, CD44, CD137, KLRG1, CD62L^{low}, CCR7^{low}, CD71, CD2, CD54, CD58, CD244, CD160, белок-1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1), белок гена 3 активации лимфоцитов

(LAG-3), белок домена иммуноглобулина Т-клеток и домена муцина 3 (TIM-3), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA) и/или домен Т-клеточного иммуноглобулина и иммунорецепторного тирозинового ингибирующего мотива (TIGIT) (смотри, например, документ Liu *et al.*, Cell Death and Disease (2015) 6, e1792). Согласно некоторым вариантам осуществления маркер истощения представляет собой любые один или несколько из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT. Согласно некоторым вариантам осуществления оцениваемый маркер клеточной поверхности представляет собой CD25, PD-1 и/или TIM-3. Согласно некоторым вариантам осуществления оцениваемый маркер клеточной поверхности представляет собой CD25.

[0437] Согласно некоторым аспектам детектирование уровней экспрессии предусматривает проведение анализа *in vitro*. Согласно некоторым вариантам осуществления анализ *in vitro* представляет собой иммуноанализ, анализ на основе аптамеров, гистологический или цитологический анализ или анализ уровня экспрессии иРНК. Согласно некоторым вариантам осуществления параметр или параметры для одного или нескольких из каждого из одного или нескольких факторов, эффекторов, ферментов и/или поверхностных маркеров детектируют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноблоттинга, иммунопреципитации, радиоиммуноанализа (RIA), иммуноокрашивания, анализа с помощью проточной цитометрии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR), хемилюминесцентного анализа, иммуноанализа латерального потока, анализа ингибирования или анализа авидности. Согласно некоторым вариантам осуществления детектирование цитокинов и/или поверхностных маркеров определяют 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.

[0438] Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С повышает уровень циркулирующих CAR-T-клеток.

С. Ответ, эффективность и выживаемость

[0439] Согласно некоторым вариантам осуществления к параметрам, связанным с терапией или исходом лечения, к которым относятся параметры, которые можно оценивать на стадиях скрининга и/или при оценке исходов лечения и/или наблюдении за исходами лечения, относятся нагрузка опухоли или заболевания. Введение иммунотерапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и/или соединения С может уменьшать или предотвращать распространение или

бремя заболевания или состояния у субъекта. Например, если заболевание или состояние представляет собой опухоль, настоящие способы обычно уменьшают размер, объем, метастазы опухоли, процентную долю бластов в костном мозге или молекулярно обнаруживаемое В-клеточное злокачественное новообразование и/или улучшают прогноз или выживаемость или другие симптомы, ассоциированные с опухолевой нагрузкой.

[0440] Согласно некоторым аспектам введение в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций обычно уменьшает или предотвращает распространение или бремя заболевания или состояния у субъекта. Например, если заболевание или состояние представляет собой опухоль, настоящие способы обычно уменьшают размер, объем, метастазы опухоли, процентную долю бластов в костном мозге или молекулярно обнаруживаемое В-клеточное злокачественное новообразование и/или улучшают прогноз или выживаемость или другие симптомы, ассоциированные с опухолевой нагрузкой.

[0441] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы приводят к уменьшению опухолевой нагрузки у получивших лечение субъектов по сравнению с альтернативными способами, в которых иммунотерапию, такую как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), проводили без введения соединения С. Не обязательно, что опухолевая нагрузка будет фактически снижаться у всех субъектов, получавших комбинированную терапию, но опухолевая нагрузка уменьшается в среднем у получивших лечение субъектов, например, исходя из клинических данных, в которых большинство субъектов, получавших лечение с помощью такой комбинированной терапии, демонстрируют снижение опухолевой нагрузки, например, по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более субъектов, получавших лечение с помощью комбинированной терапии, демонстрируют снижение опухолевой нагрузки.

[0442] Бремя заболевания может охватывать общее количество клеток заболевания у субъекта или в органе, ткани или телесной жидкости субъекта, таких как орган или ткань опухоли или другое местоположение, которое, например, указывает на метастазы. Например, опухолевые клетки в контексте некоторых гематологических злокачественных новообразований могут быть обнаружены и/или количественно определены в крови, лимфе или костном мозге. К бремени заболевания могут относиться согласно некоторым вариантам осуществления масса опухоли, количество или степень метастазов и/или процентная доля бластных клеток, присутствующих в костном мозге.

[0443] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта лимфома или лейкоз. Величину бремени заболевания можно определять путем оценки остаточного

лейкоза в крови или костном мозге. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта неходжкинская лимфома (NHL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL). Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта MM или DBCBL.

[0444] Согласно некоторым аспектам частота ответа у субъектов, таких как субъекты с NHL, основана на критериях Лугано. (Cheson *et al.*, (2014) *JCO.*, 32(27):3059-3067; Johnson *et al.*, (2015) *Radiology* 2:323–338; Cheson, B.D. (2015) *Chin. Clin. Oncol.* 4(1):5). Согласно некоторым аспектам оценка ответа использует любой из клинических, гематологических и/или молекулярных способов. Согласно некоторым аспектам оценка ответа с использованием критериев Лугано предусматривает применение позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) – компьютерной томографии (КТ) и/или КТ, в зависимости от обстоятельств. Оценки по ПЭТ-КТ могут дополнительно предусматривать применение фтордезоксиглюкозы (fluorodeoxyglucose, FDG) при лимфомах с повышенным накоплением FDG. Согласно некоторым аспектам при использовании ПЭТ-КТ для оценки ответа в гистологиях с повышенным накоплением FDG можно использовать 5-балльную шкалу. В некоторых отношениях 5-балльная шкала содержит следующие критерии: 1, отсутствует поглощение выше фонового; 2, поглощение \leq , чем в средостении; 3, поглощение $>$, чем в средостении, но \leq , чем в печени; 4, поглощение умеренно $>$, чем в печени; 5, поглощение заметно выше, чем в печени и/или новых очагах; X, новые области поглощения вряд ли связаны с лимфомой.

[0445] Согласно некоторым аспектам полный ответ, как описано с использованием критериев Лугано, включает в себя полный метаболический ответ и полный радиологический ответ в различных поддающихся измерению участках. Согласно некоторым аспектам к этим участкам относятся лимфатические узлы и экстралимфатические участки, причем CR описывается как балл 1, 2 или 3 с остаточной массой или без нее по 5-балльной шкале при использовании ПЭТ-КТ. Согласно некоторым аспектам в кольце Вальдейера или экстранодальных участках с высоким физиологическим поглощением или при активации в селезенке или костном мозге (например, при использовании химиотерапии или миелоидных колониестимулирующих факторов) поглощение может быть выше, чем в нормальном средостении и/или печени. В этом случае можно сделать вывод о полном метаболическом ответе, если поглощение в участках первоначального поражения не выше, чем в окружающей нормальной ткани, даже если ткань имеет высокое физиологическое поглощение. Согласно некоторым аспектам ответ оценивают в лимфатических узлах с использованием КТ, причем CR

описывается как отсутствие экстралимфатических участков заболевания, причем целевые узлы/узловые образования должны регрессировать до $\leq 1,5$ см в наибольшем поперечном диаметре поражения (LDi). К дополнительным участкам оценки относится костный мозг, причем оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать на отсутствие признаков заболевания с повышенным накоплением FDG в костном мозге, а оценка на основе КТ должна указывать на нормальную морфологию, которая, если она является неопределенной, должна быть отрицательной по ИНС. К дополнительным участкам может относиться оценка увеличения органов, которые должны вернуться к норме. Согласно некоторым аспектам оценивают неизмеренные очаги и новые очаги, которые в случае CR должны отсутствовать (Cheson *et al.*, (2014) *JCO.*, 32(27):3059-3067; Johnson *et al.*, (2015) *Radiology* 2:323–338; Cheson, B.D. (2015) *Chin. Clin. Oncol.* 4(1):5).

[0446] Согласно некоторым аспектам частичный ответ (PR), как описано с использованием критериев Лугано, включает в себя частичный метаболический и/или радиологический ответ в различных поддающихся измерению участках. Согласно некоторым аспектам к этим участкам относятся лимфатические узлы и экстралимфатические участки, причем PR описывается как балл 4 или 5 со сниженным поглощением по сравнению с исходным уровнем и остаточной(ыми) массой(ами) любого размера при использовании ПЭТ-КТ. Как промежуточные такие результаты могут указывать на отвечающее заболевание. В конце лечения такие результаты могут указывать на остаточное заболевание. Согласно некоторым аспектам ответ оценивают в лимфатических узлах с использованием КТ, причем PR описывают как снижение SPD $\geq 50\%$ в вплоть до 6 целевых измеряемых узлах и экстранодальных участках. Если очаг слишком мал для измерения с помощью КТ, в качестве значения по умолчанию назначают 5 мм \times 5 мм; если очаг больше не виден, значение составляет 0 мм \times 0 мм; для узла > 5 мм \times 5 мм, но меньше нормального для расчета используют фактические измерения. К дополнительным участкам оценки относится костный мозг, причем оценка на основе ПЭТ-КТ должна указывать на остаточное поглощение, превышающее поглощение в нормальном костном мозге, но сниженное по сравнению с исходным уровнем (допускается диффузное поглощение, совместимое с реактивными изменениями в результате химиотерапии). Согласно некоторым аспектам при наличии стойких очаговых изменений в костном мозге в контексте узлового ответа следует рассматривать возможность дальнейшей оценки с помощью МРТ, или биопсии, или интервального сканирования. Согласно некоторым аспектам к дополнительным участкам может относиться оценка увеличения органов, причем селезенка должна регрессировать на $>50\%$ по длине сверх нормы. Согласно некоторым аспектам оценивают неизмеренные очаги и

новые очаги, которые в случае PR должны отсутствовать/нормализоваться, регрессировать, но не увеличиваться. Отсутствие ответа/стабилизацию заболевания (SD) или прогрессирование заболевания (PD) также можно измерять с помощью оценок на основе ПЭТ-КТ и/или КТ. (Cheson *et al.*, (2014) *JCO.*, 32(27):3059-3067; Johnson *et al.*, (2015) *Radiology* 2:323–338; Cheson, B.D. (2015) *Chin. Clin. Oncol.*, 4(1):5).

[0447] В некоторых отношениях выживаемость без прогрессирования (PFS) описывается как промежуток времени во время и после лечения заболевания, такого как В-клеточное злокачественное новообразование, в течение которого субъект живет с заболеванием, но состояние не ухудшается. Согласно некоторым аспектам объективный ответ (OR) описывается как измеримый ответ. Согласно некоторым аспектам частота объективного ответа (ORR) описывается как доля пациентов, у которых достигнут CR или PR. Согласно некоторым аспектам общая выживаемость (OS) описывается как промежуток времени или с даты постановки диагноза, или с начала лечения заболевания, такого как В-клеточное злокачественное новообразование, в течение которого субъекты с диагнозом заболевания все еще живы. Согласно некоторым аспектам бессобытийная выживаемость (event-free survival, EFS) описывается как промежуток времени после окончания лечения В-клеточного злокачественного новообразования, в течение которого у субъекта не возникают определенные осложнения или события, которые лечение было призвано предотвратить или отсрочить. К этим событиям могут относиться возвращение В-клеточного злокачественного новообразования, или появление определенных симптомов, таких как боль в костях из-за В-клеточного злокачественного новообразования, которое распространилось на кость, или смерть.

[0448] Согласно некоторым вариантам осуществления мера продолжительности ответа (duration of response, DOR) включает в себя время от момента документирования ответа опухоли до прогрессирования заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления к параметрам для оценки ответа может относиться устойчивый ответ, например ответ, который сохраняется через определенный период времени после начала терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления устойчивый ответ определяется частотой ответа через приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяца после начала терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления ответ является устойчивым в течение более чем 3 месяцев или более чем 6 месяцев.

[0449] Согласно некоторым аспектам критерии RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) используют для определения объективного ответа опухоли. (Eisenhauer *et al.*, *European Journal of Cancer* 45 (2009) 228-247.) Согласно некоторым аспектам критерии RECIST используют для определения объективного ответа опухоли

для целевых очагов. В некоторых отношениях полный ответ, определенный с использованием критериев RECIST, описывается как исчезновение всех целевых очагов, причем любые патологические лимфатические узлы (как целевые, так и нецелевые) должны характеризоваться уменьшением по короткой оси до <10 мм. Согласно другим аспектам частичный ответ, определенный с использованием критериев RECIST, описывается как уменьшение суммы диаметров целевых очагов по меньшей мере на 30% относительно исходной суммы диаметров. Согласно другим аспектам прогрессирование заболевания (PD) описывается как увеличение суммы диаметров целевых очагов по меньшей мере на 20% относительно наименьшей суммы в исследовании (включая исходную сумму, если она является наименьшей в исследовании). Помимо относительного увеличения на 20% сумма должна также демонстрировать абсолютное увеличение по меньшей мере на 5 мм (согласно некоторым аспектам прогрессированием также считается появление одного или нескольких новых очагов). Согласно другим аспектам стабилизация заболевания (SD) описывается как не достаточное сокращение, чтобы квалифицировать его как PR, и не достаточное увеличение, чтобы квалифицировать его как PD, относительно наименьшей суммы диаметров во время исследования.

[0450] В случае MM примерами параметров для оценки величины бремени заболевания служат такие параметры, как количество клональных плазматических клеток (например, $>10\%$ в биопсии костного мозга или в любом количестве в биопсии из других тканей; плазмоцитомы), присутствие моноклонального белка (парапротеина) или в сыворотке, или в моче, признаки поражения органов-мишеней, связанные с поражением плазматических клеток (например, гиперкальциемия (скорректированный кальций $>2,75$ ммоль/л); почечная недостаточность, связанная с миеломой; анемия (гемоглобин <10 г/дл); и/или поражения костей (литические поражения или остеопороз с компрессионными переломами)).

[0451] В случае DLBCL примерами параметров для оценки величины бремени заболевания служат такие параметры, как клеточная морфология (например, центробластные, иммунобластные и анапластические клетки), экспрессия генов, экспрессия микроРНК и экспрессия белка (например, экспрессия BCL2, BCL6, MUM1, LMO2, MYC и p21).

[0452] Согласно некоторым аспектам частота ответа у субъектов, таких как субъекты с CLL, основана на критериях ответа Международного семинара по хроническому лимфоцитарному лейкозу (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, IWCLL) (Hallek, *et al.*, Blood 2008, Jun 15; 111(12): 5446-5456). Согласно некоторым аспектам эти критерии описаны следующим образом: полная ремиссия (CR),

которая согласно некоторым аспектам требует отсутствия клональных лимфоцитов периферической крови по данным иммунофенотипирования, отсутствия лимфаденопатии, отсутствия гепатомегалии или спленомегалии, отсутствия конституциональных симптомов и удовлетворительного анализа крови; полная ремиссия с неполным восстановлением костного мозга (CRi), которая согласно некоторым аспектам описывается как CR выше, но без нормального анализа крови; частичная ремиссия (PR), которая согласно некоторым аспектам описывается как снижение количества лимфоцитов на $\geq 50\%$, уменьшение лимфаденопатии на $\geq 50\%$ или уменьшение печени или селезенки на $\geq 50\%$ вместе с улучшением анализа периферической крови; прогрессирование заболевания (PD), которое согласно некоторым аспектам описывается как увеличение числа лимфоцитов на $\geq 50\%$ до $>5 \times 10^9/\text{л}$, увеличение лимфаденопатии на $\geq 50\%$, увеличение размера печени или селезенки на $\geq 50\%$, трансформация Рихтера или новая цитопения вследствие CLL; и стабилизация заболевания, которая согласно некоторым аспектам описывается как несоответствие критериям CR, CRi, PR или PD.

[0453] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъектов наблюдают CR или OR, если в течение 1 месяца введения дозы клеток лимфатические узлы у субъекта имеют размер менее чем 20 мм или приблизительно 20 мм, менее чем 10 мм или приблизительно 10 мм или менее чем 10 мм или приблизительно 10 мм.

[0454] Согласно некоторым вариантам осуществления индексный клон CLL не обнаруживается в костном мозге субъекта (или в костном мозге более чем 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с настоящими способами). Согласно некоторым вариантам осуществления индексный клон CLL оценивают с помощью глубокого секвенирования IgH. Согласно некоторым вариантам осуществления индексный клон не обнаруживается в момент времени через, или приблизительно через, или по меньшей мере через, или по меньшей мере приблизительно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 или 24 месяца после введения клеток.

[0455] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если количество бластов в костном мозге превышает или равно 5%, например, по данным световой микроскопии, например, количество бластов в костном мозге превышает или равно 10%, количество бластов в костном мозге превышает или равно 20%, количество бластов в костном мозге превышает или равно 30%, количество бластов в костном мозге превышает или равно 40% или количество бластов в костном мозге превышает или равно 50%. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект демонстрирует полную или клиническую ремиссию если количество бластов в костном мозге менее 5%.

[0456] Согласно некоторым вариантам осуществления субъект может демонстрировать полную ремиссию, но присутствует небольшая доля морфологически неопределяемых (методами световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Говорят, что у субъекта наблюдается минимальное остаточное заболевание (MRD), если субъект демонстрирует количество бластов в костном мозге менее чем 5% и демонстрирует молекулярно детектируемое В-клеточное злокачественное новообразование. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярно детектируемое В-клеточное злокачественное новообразование можно оценивать с использованием любого из множества молекулярных методов, которые позволяют чувствительно детектировать небольшое количество клеток. Согласно некоторым аспектам к таким методам относятся анализы ПЦР, которые могут определять уникальные перестройки генов Ig/T-клеточного рецептора или слитые транскрипты, образующиеся в результате хромосомных транслокаций. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать проточную цитометрию для идентификации клеток В-клеточного злокачественного новообразования на основе специфичных для лейкоза иммунофенотипов. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярное детектирование В-клеточного злокачественного новообразования позволяет детектировать всего 1 лейкозную клетку в 100000 нормальных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект демонстрирует MRD, которая поддается молекулярному детектированию, если детектирована по меньшей мере или более чем 1 лейкозная клетка в 100000 клеток, например, с помощью ПЦР или проточной цитометрии. Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания субъекта является молекулярно недетектируемым или MRD⁻, так что в некоторых случаях у субъекта невозможно обнаружить лейкозные клетки с использованием методов ПЦР или проточной цитометрии.

[0457] В случае лейкоза величину бремени заболевания можно определять путем оценки остаточного лейкоза в крови или костном мозге. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект демонстрирует морфологическое заболевание, если количество бластов в костном мозге превышает или равно 5%, например, по данным световой микроскопии. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект демонстрирует полную или клиническую ремиссию если количество бластов в костном мозге менее 5%.

[0458] Согласно некоторым вариантам осуществления при лейкозе субъект может демонстрировать полную ремиссию, но присутствует небольшая доля морфологически неопределяемых (методами световой микроскопии) остаточных лейкозных клеток. Говорят, что у субъекта наблюдается минимальное остаточное заболевание (MRD), если

субъект демонстрирует количество бластов в костном мозге менее чем 5% и демонстрирует молекулярно детектируемое В-клеточное злокачественное новообразование. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярно детектируемое В-клеточное злокачественное новообразование можно оценивать с использованием любого из множества молекулярных методов, которые позволяют чувствительно детектировать небольшое количество клеток. Согласно некоторым аспектам к таким методам относятся анализы ПЦР, которые могут определять уникальные перестройки генов Ig/T-клеточного рецептора или слитые транскрипты, образующиеся в результате хромосомных транслокаций. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать проточную цитометрию для идентификации клеток В-клеточного злокачественного новообразования на основе специфичных для лейкоза иммунофенотипов. Согласно некоторым вариантам осуществления молекулярное детектирование В-клеточного злокачественного новообразования позволяет детектировать всего 1 лейкозную клетку в 100000 нормальных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект демонстрирует MRD, которая поддается молекулярному детектированию, если детектирована по меньшей мере или более чем 1 лейкозная клетка в 100000 клеток, например, с помощью ПЦР или проточной цитометрии. Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания субъекта является молекулярно недетектируемым или MRD⁻, так что в некоторых случаях у субъекта невозможно обнаружить лейкозные клетки с использованием методов ПЦР или проточной цитометрии.

[0459] Согласно некоторым вариантам осуществления способы и/или введение клеточной терапии, такой как Т-клеточная терапия (например, CAR-экспрессирующие Т-клетки), и/или соединения С, уменьшают бремя заболевания по сравнению с бременем заболевания в момент времени непосредственно перед введением иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, и/или соединения С.

[0460] Согласно некоторым аспектам введение иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, и/или соединения С, может предотвращать увеличение бремени заболевания, и об этом может свидетельствовать отсутствие изменений в бремени заболевания.

[0461] Согласно некоторым вариантам осуществления способ снижает бремя заболевания или состояния, например количество опухолевых клеток, размер опухоли, продолжительность выживания пациентов или бессобытийную выживаемость, в большей степени и/или на больший период времени по сравнению с снижением, которое наблюдалось бы при использовании сопоставимого способа с использованием

альтернативной терапии, такой как терапия, при которой субъект получает только иммунотерапию, например Т-клеточную терапию, в отсутствие введения соединения С. Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания снижается в большей степени или на более длительный срок после комбинированной терапии с введением иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, и соединения С, по сравнению со снижением, которое было бы достигнуто при введении каждого из средств по отдельности, например, при введении соединения С субъекту, не получившему иммунотерапию, например Т-клеточную терапию; или введение иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, субъекту, не получившему соединения С.

[0462] Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания или состояния у субъекта детектируют, оценивают или измеряют. Бремя заболевания можно детектировать согласно некоторым аспектам посредством детектирования общего количества клеток заболевания или ассоциированных с заболеванием, например опухолевых клеток, у субъекта или в органе, ткани или телесной жидкости субъекта, такой как кровь или сыворотка. Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания, например опухолевую нагрузку, оценивают посредством измерения количества или степени метастазов. Согласно некоторым аспектам оценивают выживаемость субъекта, выживаемость в течение определенного периода времени, степень выживаемости, наличие или продолжительность бессобытийной или бессимптомной выживаемости или безрецидивную выживаемость. Согласно некоторым вариантам осуществления оценивают любой симптом заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления указана мера бремени заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления к примерам параметров для определения относятся конкретные клинические исходы, свидетельствующие об облегчении или улучшении заболевания или состояния, например опухоли. К таким параметрам относятся: контроль продолжительности заболевания, включая полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабилизацию заболевания (SD) (смотри, например, рекомендации «Критерии оценки ответа при солидных опухолях» (RECIST)), частота объективного ответа (ORR), выживаемость без прогрессирования (PFS) и общая выживаемость (OS). Конкретные пороговые значения параметров могут быть установлены для определения эффективности способа комбинированной терапии, предложенного в настоящем документе.

[0463] Согласно некоторым аспектам бремя заболевания измеряют или детектируют до введения иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, после введения иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, но до введения соединения С и/или

после введения как иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, так и соединения С. В контексте многократного введения одной или нескольких стадий комбинированной терапии бремя заболевания согласно некоторым вариантам осуществления может быть измерено до или после введения любых из стадий, доз и/или циклов введения или во время между введением любых из стадий, доз и/или циклов введения.

[0464] Согласно некоторым вариантам осуществления бремя снижается на, или по меньшей мере на, или приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 процентов с помощью предложенных способов по сравнению с тем, что было непосредственно перед введением соединения С и иммунотерапии, например Т-клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления бремя заболевания, размер опухоли, объем опухоли, масса опухоли и/или опухолевая нагрузка или величина уменьшаются после введения иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, и соединения С, по меньшей мере на или приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с тем, что было непосредственно перед введением иммунотерапии, например Т-клеточной терапии, и/или соединения С.

[0465] Согласно некоторым вариантам осуществления снижение бремени заболевания с помощью настоящего способа содержит индукцию полной морфологической ремиссии, например, по оценке через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев или более чем 6 месяцев после введения, например начала, комбинированной терапии.

[0466] Согласно некоторым аспектам анализ минимального остаточного заболевания, например, по измерениям с помощью многопараметрической проточной цитометрии, является отрицательным, или уровень минимального остаточного заболевания составляет менее чем приблизительно 0,3%, менее чем приблизительно 0,2%, менее чем приблизительно 0,1% или менее чем приблизительно 0,05%.

[0467] Согласно некоторым вариантам осуществления частота бессобытийной выживаемости или частота общей выживаемости субъекта улучшена с помощью настоящих способов по сравнению с другими способами. Например, согласно некоторым вариантам осуществления частота бессобытийной выживаемости или вероятность для субъектов, получавших лечение с помощью настоящих способов, через 6 месяцев после способа комбинированной терапии, предложенного в настоящем документе, 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%. Согласно некоторым аспектам частота общей 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%. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, получавший лечение с помощью настоящих способов, демонстрирует бессобытийную выживаемость, безрецидивную выживаемость или выживаемость по меньшей мере до 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. Согласно некоторым вариантам осуществления улучшено время до прогрессирования, например, время до прогрессирования составляет более чем 6 месяцев или приблизительно 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

[0468] Согласно некоторым вариантам осуществления после лечения с помощью настоящего способа вероятность рецидива снижается по сравнению с другими способами. Например, согласно некоторым вариантам 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%.

[0469] В некоторых случаях фармакокинетику введенных клеток, например адоптивно перенесенных клеток, определяют для оценки доступности, например биодоступности, введенных клеток. Способы определения фармакокинетики адоптивно перенесенных клеток могут предусматривать забор периферической крови у субъектов, которым вводили сконструированные клетки, и определение количества или соотношения сконструированных клеток в периферической крови. Подходы к отбору и/или выделению клеток могут включать в себя применение специфичных к химерному антигенному рецептору (CAR) антител (например, Brentjens *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): 177ra38), белка L (Zheng *et al.*, *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29), эпитопных меток, таких как последовательности Strep-Tag, введенные непосредственно в определенные сайты CAR, благодаря чему связывающие реагенты для Strep-Tag используются для непосредственной оценки CAR (Liu *et al.* (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; публикация международной заявки на выдачу патента № WO2015095895), и моноклональных антител, которые специфически связываются с полипептидом CAR (смотри публикацию международной заявки на выдачу патента № WO2014190273). В некоторых случаях в сочетании с терапиями сконструированными клетками можно использовать гены внешних маркеров, чтобы обеспечивать детектирование или отбор клеток, а в некоторых случаях также чтобы способствовать клеточному самоубийству. Усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFRt) в некоторых случаях может экспрессироваться совместно с

представляющим интерес трансгеном (например, CAR) в трансдуцированных клетках (смотри, например, патент США № 8802374). EGFRt может содержать эпитоп, распознаваемый антителом цетуксимаб (Erbix®) или другим терапевтическим анти-EGFR антителом или связывающей молекулой, которые можно использовать для идентификации или отбора клеток, которые были сконструированы с использованием конструкции EGFRt и другого рекомбинантного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR) и/или для элиминации или отделения клеток, экспрессирующих рецептор. Смотри патент США № 8802374 и документ Liu *et al.*, Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430–434).

[0470] Согласно некоторым вариантам осуществления количество CAR+ Т-клеток в биологическом образце, полученном от пациента, например в крови, можно определять в период времени после введения клеточной терапии, например, для определения фармакокинетики клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления количество CAR+ Т-клеток, необязательно CAR+ CD8+ Т-клеток и/или CAR+ CD4+ Т-клеток, детектируемых в крови субъекта или у большинства субъектов, получавших лечение с помощью настоящего способа, составляет более 1 клетки на мкл, более 5 клеток на мкл или более 10 клеток на мкл.

IV. Токсичность и неблагоприятные исходы

[0471] Согласно вариантам осуществления предложенных способов за субъектом наблюдают в отношении токсичности или другого неблагоприятного исхода, включая связанные с лечением исходы, например развитие нейтропении, синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или нейротоксичности (NT), у субъектов, которым вводили предложенную комбинированную терапию, включающую в себя клеточную терапию (например, Т-клеточную терапию) и соединение С. Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы осуществляют для снижения риска токсического исхода или симптома, способствующего токсичности профиля, фактора или свойства, таких как симптом или исход, ассоциированный с тяжелой нейтропенией, тяжелым синдромом высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелой нейротоксичностью или указывающий на них.

[0472] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы не приводят к высокой частоте или вероятности токсичности или токсических исходов или снижают частоту или вероятность токсичности или токсических исходов, таких как тяжелая нейротоксичность (NT) или тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS), например, по сравнению с некоторыми другими клеточными терапиями. Согласно некоторым вариантам осуществления способы не приводят к риску или не повышают риск

тяжелой NT (sNT), тяжелого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, лихорадки с по меньшей мере 38 градусами Цельсия или приблизительно 38 градусами Цельсия в течение трех или более дней и уровнем CRP в плазме по меньшей мере 20 мг/дл или приблизительно 20 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления более чем или более чем приблизительно 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами, не демонстрируют какой-либо степени CRS или какой-либо степени нейротоксичности. Согласно некоторым вариантам осуществления не более чем у 50% субъектов, получавших лечение (например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших лечение), синдром высвобождения цитокинов (CRS) выше степени 2 и/или нейротоксичность выше степени 2. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом (например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших лечение), не демонстрируют тяжелый токсический исход (например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность), например не демонстрируют нейротоксичность степени 3 или выше и/или не демонстрируют тяжелый CRS, или не демонстрируют его в течение определенного периода времени после лечения, например в течение недели, двух недель или одного месяца после введения клеток.

[0473] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы не приводят к высокой частоте или вероятности токсичности или токсических исходов или снижают частоту или вероятность токсичности или токсических исходов, таких как тяжелая нейротоксичность (NT) или тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS), например, по сравнению с некоторыми другими клеточными терапиями. Согласно некоторым вариантам осуществления способы не приводят к риску или не повышают риск тяжелой NT (sNT), тяжелого CRS (sCRS), синдрома активации макрофагов, синдрома лизиса опухоли, лихорадки с по меньшей мере 38 градусами Цельсия или приблизительно 38 градусами Цельсия в течение трех или более дней и уровнем CRP в плазме по меньшей мере 20 мг/дл или приблизительно 20 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления более чем или более чем приблизительно 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% или более субъектов, получавших лечение в соответствии с предложенными способами, не демонстрируют какой-либо степени CRS или какой-либо степени нейротоксичности. Согласно некоторым вариантам осуществления не более чем у 50% субъектов, получавших лечение (например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших лечение), синдром

высвобождения цитокинов (CRS) выше степени 2 и/или нейротоксичность выше степени 2. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии со способом (например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более субъектов, получавших лечение), не демонстрируют тяжелый токсический исход (например, тяжелый CRS или тяжелую нейротоксичность), например не демонстрируют нейротоксичность степени 3 или выше и/или не демонстрируют тяжелый CRS, или не демонстрируют его в течение определенного периода времени после лечения, например в течение недели, двух недель или одного месяца после введения клеток.

А. Синдром высвобождения цитокинов (CPC) и нейротоксичность

[0474] Согласно некоторым аспектам токсический исход представляет собой, или связан, или указывает на синдром высвобождения цитокинов (CRS) или тяжелый CRS (sCRS). CRS, например sCRS, может возникать в некоторых случаях после адоптивной Т-клеточной терапии и введения субъектам других биологических продуктов. См. документы Davila *et al.*, *Sci Transl Med* 6, 224ra25 (2014); Brentjens *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra38 (2013); Grupp *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 368, 1509–1518 (2013); и Kochenderfer *et al.*, *Blood* 119, 2709–2720 (2012); Xu *et al.*, *Cancer Letters* 343 (2014) 172-78.

[0475] Обычно CRS вызывается усиленным системным иммунным ответом, опосредованным, например, Т-клетками, В-клетками, НК-клетками, моноцитами и/или макрофагами. Такие клетки могут выделять большое количество медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины. Цитокины могут вызывать острый воспалительный ответ и/или вызвать повреждение эндотелия органов, что может приводить к утечке из микрососудов, сердечной недостаточности или смерти. Тяжелый, опасный для жизни CRS может приводить к легочной инфильтрации и повреждению легких, почечной недостаточности или диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови. К другим тяжелым опасным для жизни видам токсичности могут относиться кардиотоксичность, респираторный дистресс, неврологическая токсичность и/или печеночная недостаточность. CRS можно лечить с использованием противовоспалительной терапии, такой как анти-IL-6 терапия, например анти-IL-6 антитело, например тоцилизумаб, или антибиотиков или других средств, как описано.

[0476] Исходы, признаки и симптомы CRS известны и включают описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления, в которых конкретная схема введения доз или введение влияют или не влияют на определенный CRS-ассоциированный исход, признак или симптом, могут быть указаны конкретные исходы, признаки и симптомы и/или их количество или степень.

[0477] В контексте введения CAR-экспрессирующих клеток CRS обычно возникает через 6-20 дней после инфузии клеток, которые экспрессируют CAR. Смотри документ *Xu et al., Cancer Letters* 343 (2014) 172-78. В некоторых случаях CRS возникает менее чем через 6 дней или более чем через 20 дней после инфузии CAR-T-клеток. Частота и время возникновения CRS могут быть связаны с исходным уровнем цитокинов или опухолевой нагрузкой во время инфузии. Обычно CRS включает в себя повышение уровней в сыворотке интерферона (IFN)- γ , фактора некроза опухоли (TNF)- α и/или интерлейкина (IL)-2. Другими цитокинами, которые могут быстро индуцироваться при CRS, являются IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10.

[0478] К примерам исходов, ассоциированных с CRS, относятся лихорадка, озноб, гипотензия, одышка, острый респираторный дистресс-синдром (acute respiratory distress syndrome, ARDS), энцефалопатия, повышение ALT/AST, почечная недостаточность, сердечные нарушения, гипоксия, неврологические нарушения и смерть. К неврологическим осложнениям относятся делирий, судорожная активность, спутанность сознания, трудности с подбором слов, афазия и/или оглушенность. К другим связанным с CRS исходам относятся утомляемость, тошнота, головная боль, судороги, тахикардия, миалгии, сыпь, синдром острой сосудистой утечки, нарушение функции печени и почечная недостаточность. Согласно некоторым аспектам CRS связан с увеличением одного или нескольких факторов, таких как сывороточный ферритин, d-димер, аминотрансферазы, лактатдегидрогеназа и триглицериды, или с гипофибриногемией или гепатоспленомегалией.

[0479] Согласно некоторым вариантам осуществления к исходам, ассоциированным с CRS, относятся один или несколько исходов из: устойчивой лихорадки, например лихорадки с определенной температурой, например более чем 38 градусов Цельсия или приблизительно 38 градусов Цельсия, в течение двух или более, например трех или более, например четырех или более, дней или в течение по меньшей мере трех последовательных дней; лихорадки выше чем 38 градусов Цельсия или приблизительно 38 градусов Цельсия; повышения уровня цитокинов, такого как максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере в 75 раз или приблизительно в 75 раз по сравнению с уровнями по меньшей мере двух цитокинов до лечения (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из интерферона-гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF α)) или максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере в 250 раз или приблизительно в 250 раз по меньшей мере одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере одного клинического признака токсичности, такого как гипотензия

(например, по измерениям с помощью по меньшей мере одного внутривенного вазоактивного прессора); гипоксия (например, уровни кислорода в плазме (PO₂) менее чем 90% или приблизительно 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, оглушенность и судороги).

[0480] Примерами связанных с CRS исходов служат повышенные или высокие сывороточные уровни одного или нескольких факторов, включая цитокины и хемокины и другие факторы, ассоциированные с CRS. Примерами исходов дополнительно служат увеличение синтеза или секреции одного или нескольких таких факторов. Такой синтез или секреция могут осуществляться Т-клеткой или клеткой, которая взаимодействует с Т-клеткой, такой как клетка врожденной иммунной системы или В-клетка.

[0481] Согласно некоторым вариантам осуществления к CRS-ассоциированным сывороточным факторам или связанным с CRS исходам относятся воспалительные цитокины и/или хемокины, включая интерферон-гамма (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный воспалительный белок (MIP)-1, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), IL-6 и IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, фракталкин и/или IL-5. Согласно некоторым вариантам осуществления к факторам или исходам относится С-реактивный белок (C reactive protein, CRP). Помимо того, что он является ранним и легко измеримым фактором риска развития CRS, CRP также является маркером размножения клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, такие как ≥ 15 мг/дл, имеют CRS. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекты, у которых измерены высокие уровни CRP, не имеют CRS. Согласно некоторым вариантам осуществления к показателям CRS относятся показатель CRP и другой фактор, указывающий на CRS.

[0482] Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько воспалительных цитокинов или хемокинов контролируют до, во время или после лечения CAR и/или лечения соединением С. Согласно некоторым аспектам один или несколько цитокинов или хемокинов включают IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или макрофагальный воспалительный белок (MIP). Согласно некоторым вариантам осуществления контролируют IFN- γ , TNF- α и IL-6.

[0483] Были разработаны критерии CRS, которые, по-видимому, коррелируют с началом CRS, чтобы предсказывать, какие пациенты с большей вероятностью будут подвергаться риску развития sCRS (смотри документ Davilla *et al. Science translational medicine*. 2014;6(224):224ra25). К факторам относятся лихорадки, гипоксия, гипотензия,

неврологические изменения, повышенные уровни в сыворотке воспалительных цитокинов, таких как набор из семи цитокинов (IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и GM-CSF), повышение которых, вызванное лечением, может хорошо коррелировать как с опухолевой нагрузкой до лечения, так и с симптомами sCRS. Известны и другие рекомендации по диагностике и лечению CRS (смотри, например, документ Lee *et al*, *Blood*. 2014;124(2):188-95). Согласно некоторым вариантам осуществления критерии, отражающие степень CRS, подробно описаны в таблице 3 ниже.

Таблица 3: Примеры критериев оценки CRS	
Степень	Описание симптомов
1 Легкая	Не опасен для жизни, необходимо только симптоматическое лечения, такое как жаропонижающие и противорвотные средства (например, лихорадка, тошнота, утомляемость, головная боль, миалгии, недомогание)
2 Умеренная	Требует умеренного вмешательства и отвечает на него: <ul style="list-style-type: none"> • Потребность в кислороде <40% или • Гипотензия, реагирующая на прием жидкости или низкую дозу одного вазопрессора, или • Органная токсичность 2 степени (по STCAE v4.0)
3 Тяжелая	Требует агрессивного вмешательства и отвечает на него: <ul style="list-style-type: none"> • Потребность в кислороде \geq40% или • Гипотензия, требующая высокой дозы одного вазопрессора (например, норэпинефрина \geq20 мкг/кг/мин, дофамина \geq10 мкг/кг/мин, фенилэфрина \geq200 мкг/кг/мин или эпинефрина \geq10 мкг/кг/мин), или • Гипотензия, требующая применения нескольких вазопрессоров (например, вазопрессина + одного из приведенных выше средств или комбинации вазопрессоров, эквивалентной \geq20 мкг/кг/мин норэпинефрина), или • Органная токсичность 3 степени или трансаминит 4 степени (по STCAE v4.0)
4 Опасная для жизни	Опасный для жизни: <ul style="list-style-type: none"> • Необходима аппаратная дыхательная поддержка или • Органная токсичность 4 степени (исключая трансаминит)
5	Смерть

[0484] Согласно некоторым вариантам осуществления считается, что у субъекта развивается «тяжелый CRS» («sCRS») в ответ или вторично по отношению к введению клеточной терапии или дозы ее клеток, если после введения у субъекта наблюдается: (1) лихорадка по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех дней; (2) повышение уровня цитокинов, которое включает в себя или (a) максимальное кратное изменение по меньшей мере в 75 раз по сравнению с уровнем сразу после введения для по меньшей мере двух цитокинов из следующей группы из семи цитокинов: интерферон-гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5, и/или (b) максимальное кратное изменение по меньшей мере в 250 раз по сравнению с уровнем сразу после введения для по меньшей мере одного цитокина из следующей группы из семи цитокинов: интерферон-гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкин и IL-5; и (c) по меньшей мере один клинический признак токсичности, такой как гипотензия (требуемая по крайней мере одного внутривенного вазоактивного прессора), или гипоксия (PO₂ <90%), или одно или несколько неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, оглушенность и/или судороги). Согласно некоторым вариантам осуществления к тяжелому CRS относится CRS со степенью 3 или выше, как указано в таблице 4.

[0485] Согласно некоторым вариантам осуществления к исходам, ассоциированным с тяжелым CRS или CRS степени 3 или выше, например степени 4 или выше, относятся один или несколько исходов из: устойчивой лихорадки, например лихорадки с определенной температурой, например более чем 38 градусов Цельсия или приблизительно 38 градусов Цельсия, в течение двух или более, например трех или более, например четырех или более, дней или в течение по меньшей мере трех последовательных дней; лихорадки выше чем 38 градусов Цельсия или приблизительно 38 градусов Цельсия; повышения уровня цитокинов, такого как максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере в 75 раз или приблизительно в 75 раз по сравнению с уровнями по меньшей мере двух цитокинов до лечения (например, по меньшей мере двух из группы, состоящей из интерферона-гамма (IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, фракталкина и IL-5 и/или фактора некроза опухоли альфа (TNF α)) или максимальное кратное изменение, например, по меньшей мере в 250 раз или приблизительно в 250 раз по меньшей мере одного из таких цитокинов; и/или по меньшей мере одного клинического признака токсичности, такого как гипотензия (например, по измерениям с помощью по меньшей мере одного внутривенного вазоактивного прессора); гипоксия (например, уровни кислорода в плазме

(PO₂) менее чем 90% или приблизительно 90%); и/или одного или нескольких неврологических нарушений (включая изменения психического статуса, оглушенность и судороги). Согласно некоторым вариантам осуществления к тяжелому CRS относится CRS, который требует ведения или ухода в блоке интенсивной терапии (intensive care unit, ICU).

[0486] Согласно некоторым вариантам осуществления CRS, такой как тяжелый CRS, охватывает комбинацию (1) устойчивой лихорадки (лихорадка по меньшей мере 38 градусов Цельсия в течение по меньшей мере трех дней) и (2) уровня CRP в сыворотке по меньшей мере 20 мг/дл или приблизительно 20 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления CRS охватывает гипотензию, требующую применения двух или более вазопрессоров, или дыхательную недостаточность, требующую искусственной вентиляции легких. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировку вазопрессоров увеличивают при втором или последующем введении.

[0487] Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелой CRS или CRS степени 3 охватывает повышение уровня аланинаминотрансферазы, повышение уровня аспаратаминотрансферазы, озноб, фебрильную нейтропению, головную боль, дисфункцию левого желудочка, энцефалопатию, гидроцефалию и/или тремор.

[0488] Может быть указан способ измерения или обнаружения различных исходов.

[0489] Согласно некоторым аспектам токсический исход терапии, такой как клеточная терапия, представляет собой, или связан, или указывает на нейротоксичность или тяжелую нейротоксичность. Согласно некоторым вариантам осуществления к симптомам, связанным с клиническим риском нейротоксичности, относятся спутанность сознания, делирий, выраженная афазия, оглушенность, миоклония, летаргия, изменение психического статуса, конвульсии, судорожная активность, судороги (необязательно, подтвержденные электроэнцефалограммой [EEG]), повышенные уровни бета-амилоида (A β), повышенные уровни глутамата и повышенные уровни кислородных радикалов. Согласно некоторым вариантам осуществления нейротоксичность классифицируют в зависимости от тяжести (например, с использованием шкалы 1-5 баллов (смотри, например, документы Guido Cavaletti & Paola Marmioli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute—Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4,03))).

[0490] В некоторых случаях неврологические симптомы могут быть самыми ранними симптомами sCRS. Согласно некоторым вариантам осуществления начало неврологических симптомов наблюдают через 5-7 дней после инфузии клеточной терапии. Согласно некоторым вариантам осуществления продолжительность

неврологических изменений может находиться в диапазоне от 3 до 19 дней. В некоторых случаях восстановление неврологических изменений происходит после исчезновения других симптомов sCRS. Согласно некоторым вариантам осуществления время или степень исчезновения неврологических изменений не ускоряется лечением с помощью анти-IL-6 и/или стероида(ов).

[0491] Согласно некоторым вариантам осуществления считается, что у субъекта развивается «тяжелая нейротоксичность» в ответ или вторично по отношению к введению клеточной терапии или дозы ее клеток, если после введения у субъекта наблюдаются симптомы, которые ограничивают уход за собой (например, купание, одевание и раздевание, кормление, пользование туалетом, прием лекарственных средств) из числа: 1) симптомов периферической моторной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических двигательных нервов; 2) симптомов периферической сенсорной нейропатии, включая воспаление или дегенерацию периферических сенсорных нервов, дизестезию, такую как искажение сенсорного восприятия, приводящее к ненормальным и неприятным ощущениям, невралгию, такую как сильное болезненное ощущение вдоль нерва или группы нервов, и/или парестезию, такую как функциональные нарушения сенсорных нейронов, приводящие к аномальным кожным ощущениям покалывания, онемения, давления, холода и тепла в отсутствие раздражителя. Согласно некоторым вариантам осуществления к тяжелой нейротоксичности относится нейротоксичность со степенью 3 или выше, как указано в таблице 4. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелой нейротоксичностью считается продолжительная степени 3, если симптомы или нейротоксичность степени 3 длятся 10 дней или дольше.

Таблица 4: Примеры критериев оценки нейротоксичности	
Степень	Описание симптомов
1 Бессимптомная или слабая	Легкие или бессимптомные симптомы
2 Умеренная	Наличие симптомов, ограничивающих инструментальную повседневную деятельность (activities of daily living, ADL), такую как приготовление пищи, покупка продуктов или одежды, пользование телефоном, управление деньгами
3 Тяжелая	Наличие симптомов, ограничивающих ADL по уходу за собой, такую как купание, одевание и раздевание, самостоятельное питание, пользование туалетом, прием лекарственных средств

4 Опасная для жизни	Симптомы, опасные для жизни, требующие срочного вмешательства
5 Фатальная	Смерть

[0492] Согласно некоторым вариантам осуществления способы уменьшают симптомы, ассоциированные с CRS или нейротоксичностью, по сравнению с другими способами. Согласно некоторым аспектам предложенные способы уменьшают симптомы, исходы или факторы, ассоциированные с CRS, включая симптомы, исходы или факторы, ассоциированные с тяжелым CRS или CRS степени 3 или выше, по сравнению с другими способами. Например, у субъектов, получающих лечение в соответствии с настоящими способами, могут не детектироваться и/или могут быть уменьшены симптомы, исходы или факторы CRS, например тяжелого CRS или CRS степени 3 или выше, такие как любые описанные, например приведенные в таблице 3. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъектов, получающих лечение в соответствии с настоящими способами, могут быть уменьшены симптомы нейротоксичности, такие как слабость или онемение конечностей, потеря памяти, зрения и/или интеллекта, неконтролируемое навязчивое и/или компульсивное поведение, бред, головная боль, когнитивные и поведенческие проблемы, включая потерю двигательного контроля, ухудшение когнитивных функций, дисфункцию автономной нервной системы и сексуальную дисфункцию, по сравнению с субъектами, получавшими лечение с помощью других способов. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъектов, получающих лечение в соответствии с настоящими способами, могут быть уменьшены симптомы, ассоциированные с периферической моторной невропатией, периферической сенсорной невропатией, дизестезией, невралгией или парестезией.

[0493] Согласно некоторым вариантам осуществления способы уменьшают исходы, ассоциированные с нейротоксичностью, включая повреждения нервной системы и/или головного мозга, такие как гибель нейронов. Согласно некоторым аспектам способы снижают уровень факторов, ассоциированных с нейротоксичностью, таких как бета-амилоид (A β), глутамат и кислородные радикалы.

[0494] Согласно некоторым вариантам осуществления токсический исход представляет собой дозолимитирующую токсичность (DLT). Согласно некоторым вариантам осуществления токсический исход представляет собой отсутствие дозолимитирующей токсичности. Согласно некоторым вариантам осуществления дозолимитирующая токсичность (DLT) определяется как любая токсичность степени 3

или выше, как описано или оценено с помощью любых известных или опубликованных руководств по оценке конкретной токсичности, такими как любые описанные выше, и включая Общие терминологические критерии нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE) версии 4.0 Национального института рака (National Cancer Institute, NCI). Согласно некоторым вариантам осуществления дозолимитирующую токсичность (DLT) определяют, когда после введения клеточной терапии (например, Т-клеточной терапии) и/или соединения С происходит любое из событий, рассмотренных ниже, причем к событиям относятся а) фебрильная нейтропения; б) нейтропения степени 4, продолжающаяся приблизительно 7 дней или более чем приблизительно 7 дней; с) тромбоцитопения степени 3 или 4 с клинически значимым кровотечением; и d) тромбоцитопения степени 4, продолжающаяся более 24 часов.

[0495] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные варианты осуществления приводят к низким частоте или риску развития токсичности, например CRS или нейротоксичности или тяжелых CRS или нейротоксичности, например CRS степени 3 или выше или нейротоксичности, например, наблюдаемой при введении дозы Т-клеток в соответствии с предлагаемой комбинированной терапией и/или с предложенными готовыми изделиями или композициями. В некоторых случаях это позволяет вводить клеточную терапию амбулаторно. Согласно некоторым вариантам осуществления введение клеточной терапии, например дозы Т-клеток (например, CAR+ Т-клеток) в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций, осуществляется амбулаторно или не требует госпитализации субъекта, например госпитализации, требующей ночевки.

[0496] Согласно некоторым аспектам субъектам, которым вводили клеточную терапию, например дозу Т-клеток (например, CAR+ Т-клеток) в соответствии с предложенными способами и/или с помощью предложенных готовых изделий или композиций, включая субъектов, получающих лечение амбулаторно, не проводят вмешательство для лечения какой-либо токсичности до или во время введения дозы клеток, если или до тех пор, пока субъект не проявит признак или симптом токсичности, такой как нейротоксичность или CRS.

[0497] Согласно некоторым вариантам осуществления, если у субъекта, которому вводят клеточную терапию, например дозу Т-клеток (например, CAR+ Т-клеток), включая субъектов, получающих лечение амбулаторно, наблюдается лихорадка, субъекту назначают или дают указание получать или вводить лечение для уменьшения лихорадки. Согласно некоторым вариантам осуществления лихорадка у субъекта характеризуется как температура тела субъекта, которая равна (или измерена равной) определенным

пороговым температуре или уровню или превышает их. Согласно некоторым аспектам пороговая температура представляет собой температуру, ассоциированную с лихорадкой по меньшей мере низкой степени, с по меньшей мере умеренной лихорадкой и/или с лихорадкой по меньшей мере высокой степени. Согласно некоторым вариантам осуществления пороговая температура представляет собой конкретную температуру или диапазон. Например, пороговая температура может составлять точно или приблизительно или по меньшей мере точно или приблизительно 38, 39, 40, 41 или 42 градусов Цельсия, и/или может находиться в диапазоне от или приблизительно от 38 градусов Цельсия до или приблизительно до 39 градусов Цельсия, в диапазоне от или приблизительно от 39 градусов Цельсия до или приблизительно до 40 градусов Цельсия, в диапазоне от или приблизительно от 40 градусов Цельсия до или приблизительно до 41 градуса или в диапазоне от или приблизительно от 41 градуса Цельсия до или приблизительно до 42 градусов Цельсия.

[0498] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение, предназначенное для уменьшения лихорадки, включает в себя лечение с помощью жаропонижающего средства. К жаропонижающим средствам может относиться любое средство, композиция или ингредиент, которые уменьшают лихорадку, такое как одно из любого количества средств, о которых известно, что они обладают жаропонижающим действием, таких как НПВП (такие как, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), салицилаты, такие как аспирин, салицилат холина, салицилат магния и салицилат натрия, парацетамол, ацетаминофен, метамизол, набуметон, фенаксон, антипирин, фебрифугины. Согласно некоторым вариантам осуществления жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен. Согласно некоторым вариантам осуществления ацетаминофен можно вводить в дозе 12,5 мг/кг перорально или внутривенно вплоть до каждых четырех часов. Согласно некоторым вариантам осуществления оно представляет собой или содержит ибупрофен или аспирин.

[0499] Согласно некоторым вариантам осуществления, если лихорадка представляет собой устойчивую лихорадку, субъекту вводят альтернативное лечение для лечения токсичности. Что касается субъектов, получающих лечение амбулаторно, субъект получает указание вернуться в больницу, если у субъекта есть и/или определена или должна быть устойчивая лихорадка. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть устойчивая лихорадка, и/или определено или предполагается ее наличие, если он или она демонстрируют лихорадку на уровне или выше соответствующей пороговой температуры, и если лихорадка или температура тела субъекта не уменьшаются или не уменьшаются на или более чем на определенную величину (например, более чем

на 1°C, и обычно не изменяется на приблизительно или более чем на приблизительно 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C) после определенного лечения, такого как лечение, направленное на уменьшение лихорадки, такое как лечение с помощью жаропонижающего средства, например НПВП или салицилатов, например ибупрофена, ацетаминофена или аспирина. Например, считается, что у субъекта устойчивая лихорадка, если он или она демонстрируют или определено, что он или она демонстрируют, лихорадку по меньшей мере 38 или 39 градусов Цельсия или приблизительно 38 или 39 градусов Цельсия, которая не уменьшается на или не уменьшается более чем на или приблизительно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C или на или приблизительно на 1%, 2%, 3%, 4% или 5% в течение 6 часов, в течение 8 часов, или в течение 12 часов, или в течение 24 часов даже после лечения с помощью жаропонижающего средства, такого как ацетаминофен. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка жаропонижающего средства представляет собой дозировку, обычно эффективную у такого субъекта для уменьшения лихорадки или лихорадки определенного типа, такой как лихорадка, ассоциированная с бактериальной или вирусной инфекцией, например локализованной или системной инфекцией.

[0500] Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта есть устойчивая лихорадка, и/или определено или предполагается ее наличие, если он или она демонстрируют лихорадку на уровне или выше соответствующей пороговой температуры, и если лихорадка или температура тела субъекта не изменяются приблизительно на или более чем приблизительно на 1°C и обычно не изменяются на приблизительно или более чем на приблизительно 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C. Такое отсутствие изменения выше или на определенном уровне обычно измеряют в течение определенного периода времени (например, в течение 24-часового, 12-часового, 8-часового, 6-часового, 3-часового или 1-часового периода времени, который можно измерять от первого признака лихорадки или первого повышения температуры выше указанного порога). Например, согласно некоторым вариантам осуществления считается или определяется, что субъект демонстрирует устойчивую лихорадку, если он или она демонстрируют лихорадку по меньшей мере точно или приблизительно или по меньшей мере точно или приблизительно 38 или 39 градусов Цельсия, которая не изменяется по температуре более чем на или приблизительно на 0,5°C, 0,4°C, 0,3°C или 0,2°C в течение 6 часов, в течение 8 часов, или в течение 12 часов, или в течение 24 часов.

[0501] Согласно некоторым вариантам осуществления лихорадка представляет собой устойчивую лихорадку; согласно некоторым аспектам субъект получает лечение в то время, когда у субъекта определено наличие устойчивой лихорадки, например, в

течение одного, двух, трех, четырех, пяти шести или менее часов после такого определения или первого такого определения после начальной терапии, способной вызывать токсичность, такой как клеточная терапия, такая как доза Т-клеток, например CAR+ Т-клеток.

[0502] Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько вмешательств или средств для лечения токсичности, таких как терапии, направленные на токсичность, вводят в то время, когда или сразу после того, как определено или подтверждено (например, впервые определено или подтверждено), что субъект демонстрирует устойчивую лихорадку, например, по измерениям в соответствии с любым из вышеупомянутых вариантов осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления одну или несколько терапий, направленных на токсичность, вводят в течение определенного периода времени после такого подтверждения или определения, например, в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов или 8 часов после этого.

В. Гематологическая токсичность

[0503] Согласно некоторым аспектам токсический исход представляет собой, или связан, или указывает на гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения. В некоторых случаях гематологическую токсичность, включая тромбоцитопению и нейтропению, классифицируют в соответствии с Общими терминологическими критериями нежелательных явлений (версия 4.03; US National Cancer Institute, Bethesda, MD, США). В некоторых случаях гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения, контролируют до, во время и после введения(ий) соединения С. В некоторых случаях гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения, контролируют перед каждым введением соединения С. В некоторых случаях гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения, контролируют по меньшей мере каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней после введения соединения С.

[0504] Согласно некоторым вариантам осуществления осуществляют полный анализ крови для контроля уровней лейкоцитов (белые кровяные клетки) у субъекта, включая нейтрофилы и тромбоциты. Можно использовать различные способы для выполнения анализа с подсчетом всех клеток крови (complete blood cell, CBC) и/или с дифференциальным подсчетом лейкоцитов. Согласно некоторым вариантам осуществления используют гематологический анализатор.

[0505] Нейтропения характеризуется снижением количества нейтрофилов в крови, что часто приводит к повышенной восприимчивости к бактериальным и грибковым

инфекциям. Общие симптомы нейтропении у пациентов включают, например, лихорадку, язвы во рту и ушные инфекции. Пациенты с выраженной нейтропенией часто страдают гнойными инфекциями, такими как септицемия, кожный целлюлит, абсцессы печени, фурункулез, пневмония, стоматит, гингивит, периректальное воспаление, колит, синусит и средний отит.

[0506] Согласно некоторым вариантам осуществления для определения уровня нейтропении используют абсолютное число нейтрофилов (Absolute Neutrophil Count, ANC). ANC можно рассчитывать по компонентам полного анализа крови. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжесть нейтропении классифицируют на основе абсолютного числа нейтрофилов (ANC), измеряемого в клетках, на микролитр крови: а) легкая нейтропения (1000-1500 клеток на мл); б) умеренная нейтропения (степени 3; 500-1000 клеток на мл); в) тяжелая нейтропения (степени 4; <500 клеток на мл). Согласно некоторым вариантам осуществления нейтропению можно классифицировать в соответствии с критериями, приведенными в таблице 5. Субъекты с тяжелой нейтропенией часто имеют серьезный риск инфицирования.

Таблица 5: Классификация нейтропении	
Степень	ANC
1 степень	$<2,0 \times 10^9/\text{л}$ ($< 2000/\text{мм}^3$) и $>1,5 \times 10^9/\text{л}$ ($>1500/\text{мм}^3$)
2 степень	$<1,5 \times 10^9/\text{л}$ ($<1500/\text{мм}^3$) и $>1,0 \times 10^9/\text{л}$ ($>1000/\text{мм}^3$)
3 степень	$<1,0 \times 10^9/\text{л}$ ($<1000/\text{мм}^3$) и $>0,5 \times 10^9/\text{л}$ ($>500/\text{мм}^3$)
4 степень	$<0,5 \times 10^9/\text{л}$ ($<500/\text{мм}^3$)

[0507] В некоторых случаях нейтропения представляет собой фебрильную нейтропению (также называемую нейтропенической лихорадкой или нейтропеническим сепсисом). Фебрильная нейтропения возникает, когда у пациента температура выше 38°C и низкие уровни нейтрофилов или нейтропения. Согласно некоторым вариантам осуществления фебрильная нейтропения может быть классифицирована в соответствии с критериями, приведенными в таблице 6.

Таблица 6: Примеры критериев оценки фебрильной нейтропении	
Степень	Описание симптомов
3 степень	ANC $<1000/\text{мм}^3$ и однократная температура $>38,3$ градуса C (101 градус F) или устойчивая температура ≥ 38 градусов C (100,4 градуса F) в течение более чем одного часа
4 степень	опасные для жизни последствия и показано срочное

	вмешательство
5 степень	смерть

[0508] Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта контролируют в отношении тромбоцитопении. Тромбоцитопения характеризуется количеством тромбоцитов менее 150000 клеток на микролитр (мкл). Картина тромбоцитопении, особенно у пациентов с более тяжелой степенью, может включать кровотечения, экхимозы, петехии, пурпуру и гиперспленизм. Тромбоцитопению можно охарактеризовать как тромбоцитопению степени 1 (то есть с количеством тромбоцитов от 75000 до 150000 на мкл), степени 2 (то есть с количеством тромбоцитов от 50000 до <75000 на мкл), степени 3 (с количеством тромбоцитов от 25000 до <50000 на мкл) или степени 4 (то есть с количеством тромбоцитов ниже 25000 на мкл).

[0509] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенных способов, если определено, что субъект демонстрирует гематологическую токсичность, такую как тромбоцитопения и/или нейтропения, или ее определенную степень, комбинированная терапия с соединением С может быть изменена. Согласно некоторым аспектам комбинированную терапию изменяют, если после введения соединения С субъект имеет тромбоцитопению степени 3 или выше; нейтропению степени 3; нейтропению степени 3, которая является устойчивой (например, по меньшей мере больше чем 3, 5 или 7 дней); нейтропению степени 4; фебрильную нейтропению степени 3 или выше. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С прекращают навсегда или приостанавливают до тех пор, пока признаки или симптомы токсичности не исчезнут, не уменьшатся или не снизятся. Непрерывный мониторинг субъекта может осуществляться для оценки одного или нескольких признаков или симптомов токсичности, например, с помощью СВС или дифференциального анализа лейкоцитов. В некоторых случаях, если токсичность проходит или снижается, введение соединения С можно возобновлять в той же дозе или с той же схемой введения доз перед приостановкой комбинированной терапии, в более низкой или уменьшенной дозе и/или со схемой введения доз, предусматривающей менее частое введение доз. Согласно некоторым вариантам осуществления в случаях возобновления комбинированной терапии дозу снижают или уменьшают по меньшей мере на, или по меньшей мере приблизительно на, или приблизительно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, или 60%. Согласно некоторым вариантам осуществления, если доза до приостановки клеточной терапии составляет 0,3 мг, дозу снижают до 0,2 мг. Согласно некоторым аспектам, если гематологическая

токсичность настолько тяжела, что приостановка комбинированной терапии происходит более чем на 4 недели, комбинированная терапия может быть прекращена навсегда.

[0510] Согласно некоторым вариантам осуществления одно или несколько средств можно вводить субъекту для лечения, облегчения или уменьшения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с гематологической токсичностью. В некоторых случаях миелоидные факторы роста, такие как G-CSF или GM-CSF, вводят субъекту до тех пор, пока гематологическая токсичность не улучшится. Примерами такой терапии служат филграстим или пегфилграстим. Согласно некоторым аспектам такие средства вводят субъектам, испытывающим тяжелую нейтропению или фебрильную нейтропению, включая любую нейтропению степени 3 или выше любой продолжительности.

С. Негематологическая токсичность

[0511] Согласно некоторым аспектам токсический исход представляет собой, или связан, или указывает на один или несколько видов негематологической токсичности после введения соединения С. Примерами негематологической токсичности служат, но без ограничения, реакция опухолевой вспышки, инфекции, синдром лизиса опухоли, отклонения лабораторных показателей сердца, тромбоз эмболическое(ие) явление(я) (такое как тромбоз глубоких вен и тромбоз эмболия легочной артерии) и/или пневмонит.

[0512] Согласно некоторым аспектам негематологическая токсичность представляет собой реакцию опухолевой вспышки (tumor flare reaction, TFR) (иногда также называемую псевдопрогрессированием). TFR представляет собой внезапное увеличение размеров несущих заболевание участков, включая лимфатические узлы, селезенку и/или печень, часто сопровождающееся лихорадкой низкой степени, болезненностью и отеком, диффузной сыпью и в некоторых случаях увеличением количества лимфоцитов периферической крови. Согласно некоторым вариантам осуществления TFR классифицируется в соответствии с Общими терминологическими критериями нежелательных явлений (версия 3.0; US National Cancer Institute, Bethesda, MD, США). Согласно некоторым вариантам осуществления TFR классифицируется следующим образом: степень 1, легкая боль, не нарушающая функционирование; степень 2, умеренная боль, боль или анальгетики, нарушающие функционирование, но не мешающие повседневной деятельности (ADL); степень 3, сильная боль, боль или анальгетики, нарушающие функционирование и мешающие ADL; степень 4, инвалидизация; степень 5, смерть. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекту можно вводить одно или несколько средств для лечения, облегчения или уменьшения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с TFR, например кортикостероиды, НПВП и/или наркотические анальгетики.

[0513] Согласно некоторым аспектам негематологическая токсичность представляет собой синдром лизиса опухоли (tumor lysis syndrome, TLS). Согласно некоторым вариантам осуществления TLS можно классифицировать в соответствии с критериями, установленными системой оценки Каира-Бишопа (Caigo and Bishop (2004) *Br J Haematol*, 127:3-11). Согласно некоторым вариантам осуществления субъектам можно назначать внутривенную гидратацию для снижения гиперурикемии.

[0514] Согласно некоторым вариантам осуществления субъектов можно контролировать в отношении кардиотоксичности, например, путем мониторинга ECGS, LVEF и мониторинга уровней тропонина-Т и BNP. Согласно некоторым вариантам осуществления кардиотоксичность, которая потенциально может потребовать задержки или приостановки введения соединения С, может возникать, если наблюдаются повышенные уровни тропонина-Т и/или BNP с одним или несколькими сердечными симптомами.

[0515] Согласно некоторым вариантам осуществления предложенных способов, если определено, что субъект демонстрирует негематологическую токсичность, например TFR или другую негематологическую токсичность, или ее определенную степень, комбинированная терапия с соединением С может быть изменена. Согласно некоторым аспектам комбинированную терапию изменяют, если после введения соединения С субъект имеет негематологическую токсичность степени 3 или выше, такую как TFR степени 3 или выше. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединения С прекращают навсегда или приостанавливают до тех пор, пока признаки или симптомы токсичности не исчезнут, не уменьшатся или не снизятся. Непрерывный мониторинг субъекта может осуществляться для оценки одного или нескольких признаков или симптомов токсичности. В некоторых случаях, если токсичность проходит или снижается, введение соединения С можно возобновлять в той же дозе или с той же схемой введения доз перед приостановкой комбинированной терапии, в более низкой или уменьшенной дозе и/или со схемой введения доз, предусматривающей менее частое введение доз. Согласно некоторым вариантам осуществления в случаях возобновления комбинированной терапии дозу снижают или уменьшают по меньшей мере на, или по меньшей мере приблизительно на, или приблизительно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, или 60%. Согласно некоторым вариантам осуществления, если доза до приостановки клеточной терапии составляет 0,3 мг, дозу снижают до 0,2 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления, если токсичность степени 3 снова возникает даже после снижения дозы, дозу можно снизить еще больше. Согласно некоторым вариантам осуществления, если токсичность степени 4 снова возникает даже после снижения дозы,

комбинированная терапия может быть прекращена навсегда. Согласно некоторым аспектам, если гематологическая токсичность настолько тяжела, что приостановка комбинированной терапии происходит более чем на 4 недели, комбинированная терапия может быть прекращена навсегда.

V. Готовые изделия и наборы

[0516] Также предложены готовые изделия, содержащие соединение С и компоненты для иммунотерапии, например антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или Т-клеточной терапии, например сконструированные клетки и/или их композиции. Готовые изделия могут включать в себя контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, находящийся на контейнере или связанный с ним. К подходящим контейнерам относятся, например, бутылки, флаконы, шприцы, мешки с раствором для внутривенного введения и так далее. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией эффективна для лечения, предотвращения и/или диагностики состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления контейнер имеет стерильное отверстие для доступа. Примерами контейнеров служат мешки для внутривенного раствора, флаконы, в том числе с пробками, прокалываемыми иглой для инъекций, или бутылки или флаконы для перорально вводимых средств. Этикетка или вкладыш в упаковку могут указывать на то, что композицию применяют для лечения заболевания или состояния.

[0517] Готовое изделие может включать в себя (а) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, причем композиция включает в себя сконструированные клетки, используемые для иммунотерапии, например Т-клеточной терапии; и (б) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, причем композиция включает в себя соединение С.

[0518] Согласно некоторым вариантам осуществления первый контейнер содержит первую композицию и вторую композицию, причем первая композиция содержит первую популяцию сконструированных клеток, используемых для иммунотерапии, например CD4⁺ Т-клеточной терапии, а вторая композиция содержит вторую популяцию сконструированных клеток, причем вторая популяция может быть сконструирована отдельно от первой популяции, например CD8⁺ Т-клеточная терапия. Согласно некоторым вариантам осуществления первая и вторая клеточные композиции содержат определенное соотношение сконструированных клеток, например CD4⁺ и CD8⁺ клеток (например, соотношение CAR⁺ Т-клеток CD4⁺:CD8⁺ 1:1).

[0519] Готовое изделие может дополнительно включать в себя вкладыш в упаковку, указывающий, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. Альтернативно или дополнительно, готовое изделие может дополнительно включать в себя другой или тот же контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. Оно может дополнительно включать в себя другие материалы, такие как другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и/или шприцы.

VI. Определения

[0520] Если не указано иное, предполагается, что все термины в области техники, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое обычно понятно рядовому специалисту в области техники, к которой относится заявленный предмет изобретения. В некоторых случаях термины с общепонятными значениями определены в настоящем документе для ясности и/или для удобства использования, и включение таких определений в настоящий документ не обязательно должно быть истолковано как представляющее существенное отличие от того, что обычно понимается в данной области техники.

[0521] При использовании в настоящем документе «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект, например пациент, которому вводят соединение С, сконструированные клетки или композиции, представляет собой млекопитающее, обычно примата, такого как человек. Согласно некоторым вариантам осуществления примат представляет собой обезьяну или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, несовершеннолетних, подростков, взрослых и гериатрических субъектов. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой отличное от примата млекопитающее, такое как грызун.

[0522] При использовании в настоящем документе термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «проведение лечения») относится к полному или частичному облегчению или уменьшению заболевания, или состояния, или нарушения, или симптома, нежелательного явления или исхода или ассоциированного с ними фенотипа. К желательным эффектам лечения относятся, но без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение течения заболевания и ремиссия или улучшенный прогноз.

Эти термины не подразумевают полное излечение заболевания или полное устранение любого симптома или воздействия на все симптомы или исходы.

[0523] При использовании в настоящем документе «задержка развития заболевания» означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию, подавление и/или отдаление развития заболевания (такого как В-клеточное злокачественное новообразование). Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории заболевания и/или индивидуума, подвергаемого лечению. Как очевидно, достаточная или значительная задержка может, по сути, охватывать предупреждение, при котором у индивидуума заболевание не развивается. Например, В-клеточная лимфома на поздней стадии, такой как развитие метастазов, может быть задержана.

[0524] Термин «предупреждение» при использовании в настоящем документе включает обеспечение профилактики возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не диагностировано. Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные клетки и композиции используют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

[0525] При использовании в настоящем документе «подавление» функции или активности означает снижение функции или активности по сравнению с теми же условиями, за исключением представляющего 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 этих клеток.

[0526] Термин «эффективное количество» средства, например сконструированных клеток или анти-PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтического состава или композиции, в контексте введения относится к количеству, эффективному в дозировках/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

[0527] Термин «терапевтически эффективное количество» средства, например сконструированных клеток или анти-PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтического состава или композиции, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, например для лечения заболевания, состояния или нарушения и/или фармакокинетического или фармакодинамического эффекта лечения. Терапевтически эффективное количество может изменяться в соответствии с такими

факторами, как течение заболевания, возраст, пол и вес субъекта, и вводимые иммуномодулирующие полипептиды или сконструированные клетки. Согласно некоторым вариантам осуществления предложенные способы предусматривают введение соединения С, сконструированных клеток (например, клеточной терапии) или композиций в эффективных количествах, например терапевтически эффективных количествах.

[0528] Термин «профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическая доза применяется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

[0529] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, содержащегося в нем, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

[0530] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

[0531] При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают в себя ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Например, «один» или «одна» означает «по меньшей мере один» или «один или несколько». Следует понимать, что аспекты и варианты, описанные в настоящем документе, охватывают аспекты и варианты, «состоящие» и/или «состоящие по существу из».

[0532] В настоящем раскрытии различные аспекты заявленного предмета изобретения представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема заявленного предмета изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения внутри этого диапазона. Например, если предоставлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в этом установленном диапазоне

включено в заявленный предмет изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, а также охватываться заявленным предметом изобретения, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если заявленный диапазон включает в себя один или оба предела, в заявленный предмет изобретения также включены диапазоны, исключающие один или оба включенных предела. Это применимо независимо от величины диапазона.

[0533] Термин «приблизительно» при использовании в настоящем документе относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «приблизительно» значение или параметр в настоящем документе охватывает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся к этому значению или параметру как таковому. Например, описание, ссылающееся на «приблизительно X», охватывает описание «X».

[0534] При использовании в настоящем документе утверждение, что положения нуклеотидов или аминокислот «соответствуют» положениям нуклеотидов или аминокислот в раскрытой последовательности, такой как приведенная в перечне последовательностей, относится к положениям нуклеотидов или аминокислот, идентифицированным при выравнивании с раскрытой последовательностью для максимизации идентичности с использованием стандартного алгоритма выравнивания, такого как алгоритм GAP. Выравнивая последовательности, специалист в данной области техники может идентифицировать соответствующие остатки, например, используя консервативные и идентичные аминокислотные остатки в качестве ориентиров. В общем, для идентификации соответствующих положений последовательности аминокислот выравнивают так, чтобы получить самое высокое совпадение порядка (смотри, например, документы 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; and 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).

[0535] Термин «вектор» при использовании в настоящем документе относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Этот термин охватывает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в

которую он был введен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии». Среди векторов есть вирусные векторы, такие как ретровирусные, например гаммаретровирусные и лентивирусные векторы.

[0536] Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», к которым относятся первично трансформированная клетка и полученное из нее потомство, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновой кислоты родительской клетке, но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое характеризуется той же функцией или биологической активностью, по которым проводили скрининг или отбор исходно трансформированной клетки, включено в настоящий документ.

[0537] При использовании в настоящем документе утверждение, что клетка или популяция клеток является «положительной» по конкретному маркеру, относится к детектируемому присутствию на или в клетке конкретного маркера, обычно поверхностного маркера. Применительно к поверхностному маркеру этот термин относится к наличию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с данным маркером, и детектирования упомянутого антитела, причем окрашивание можно детектировать с помощью проточной цитометрии на уровне, по существу более высоком, чем окрашивание, детектируемое при проведении той же процедуры с изотипически соответствующим контролем в условиях, в остальном идентичных, и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клетки, о которой известно, что она является положительной по данному маркеру, и/или на уровне, по существу более высоком, чем для клетки, о которой известно, что она отрицательна по данному маркеру.

[0538] При использовании в настоящем документе утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» по конкретному маркеру, относится к отсутствию существенного обнаруживаемого присутствия на или в клетке конкретного маркера, обычно поверхностного маркера. Применительно к поверхностному маркеру этот термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с данным маркером, и детектирования упомянутого антитела,

причем окрашивание не детектируется с помощью проточной цитометрии на уровне, по существу более высоком, чем окрашивание, детектируемое при проведении той же процедуры с изотипически соответствующим контролем в условиях, в остальном идентичных, и/или на уровне, по существу более низком, чем для клетки, о которой известно, что она является положительной по данному маркеру, и/или на уровне, по существу аналогичном по сравнению с уровнем для клетки, о которой известно, что она отрицательна по данному маркеру.

[0539] При использовании в настоящем документе «процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» и «процент идентичности» при использовании по отношению к аминокислотной последовательности (эталонной полипептидной последовательности) определяются как процентная доля аминокислотных остатков в последовательности-кандидате (например, рассматриваемом антителе или фрагменте), которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, доступными специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определять подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

[0540] К аминокислотной замене может относиться замена одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену. Аминокислотные замены могут быть введены в представляющую интерес связывающую молекулу, например антитело, а продукты подвергнуты скринингу в отношении желаемой активности, например сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения ADCC или CDC.

[0541] Аминокислоты обычно можно группировать в соответствии со следующими общими свойствами боковой цепи:

(1) гидрофобные : Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0542] Согласно некоторым вариантам осуществления консервативные замены могут включать замену члена одного из этих классов на другой член того же класса. Согласно некоторым вариантам осуществления неконсервативные аминокислотные замены могут включать замену члена одного из этих классов на член другого класса.

[0543] При использовании в настоящем документе композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, нацеленных на цереброны, включая клетки. Она может представлять собой раствор, суспензию, жидкость, порошок, пасту, водный, неводный или любую их комбинацию.

[0544] При использовании в настоящем документе «субъект» представляет собой млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно представляет собой человека.

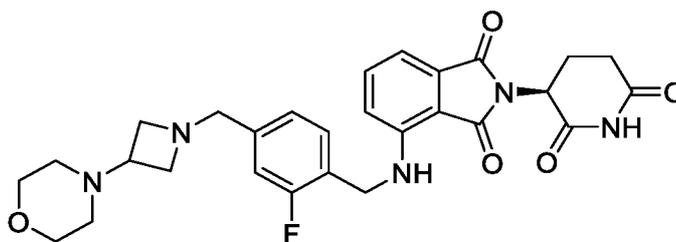
VII. Примеры вариантов осуществления

[0545] К предложенным вариантам осуществления относятся:

1. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, комбинированной терапии, включающей в себя:

(i) клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем данную клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

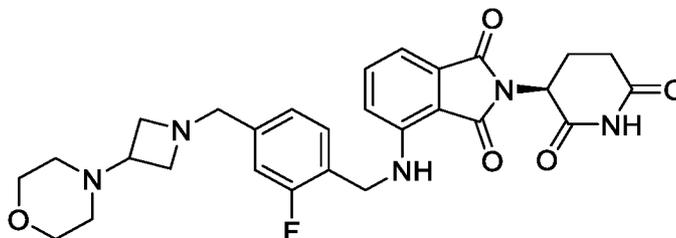
(ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно

0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно, причем введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

2. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно, и причем введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

3. Способ согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, в котором введение соединения начинают между днем 1 и днем 22 включительно.

4. Способ согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, в котором введение соединения начинают между днем 1 и днем 15 включительно.

5. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4, в котором введение соединения начинают между днем 8 и днем 15 включительно.

6. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4, в котором введение соединения начинают в день 1 или приблизительно в день 1.

7. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, в котором введение соединения начинают в день 8 или приблизительно в день 8.

8. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, в котором введение соединения начинают в день 15 или приблизительно в день 15.

9. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-8, в котором все дозы из нескольких прерывистых доз являются одинаковыми.

10. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-9, в котором соединение вводят один раз в неделю.

11. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-10, в котором соединение вводят один раз каждые 7 дней (Q7D).

12. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-9, в котором соединение вводят один раз каждые две недели.

13. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-9 и 12, в котором соединение вводят один раз каждые 14 дней (Q14D).

14. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-13, в котором соединение вводят в течение по меньшей мере 12 недель после введения клеточной терапии.

15. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-13, в котором соединение вводят в течение вплоть до 12 недель после введения клеточной терапии.

16. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-4, 6, 9-11, 14 и 15, в котором соединение вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

17. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, 7, 9-11, 14 и 15, в котором соединение вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

18. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, 8-11, 14 и 15, в котором соединение вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

19. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-5, 7, 9 и 12-15, в котором соединение вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78.

20. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-19, в котором доза соединения составляет от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг включительно.

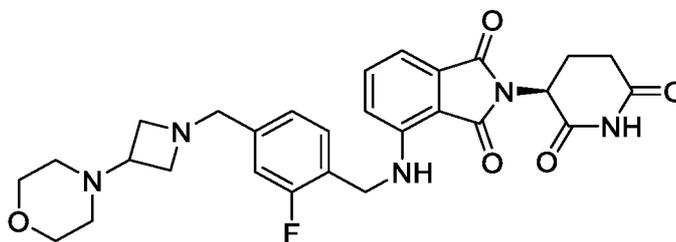
21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-20, в котором доза соединения составляет 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг.

22. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-20, в котором доза соединения составляет менее чем 0,4 мг.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-20 и 22, в котором доза соединения составляет 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг.

24. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-20 и 22, в котором доза соединения составляет 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг.

25. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:

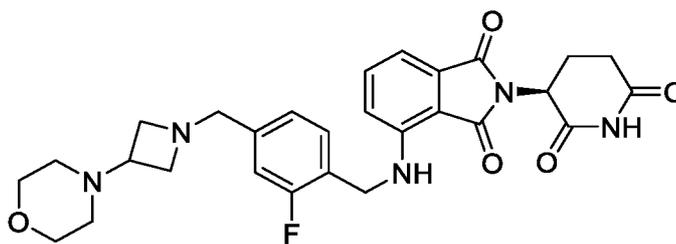


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

26. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:

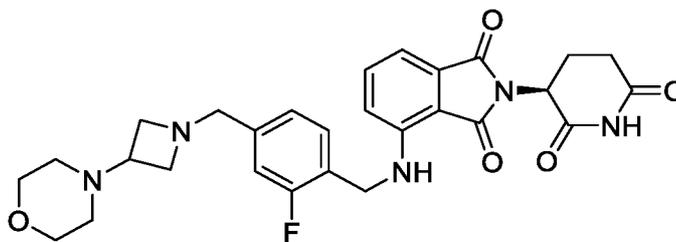


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

27. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:

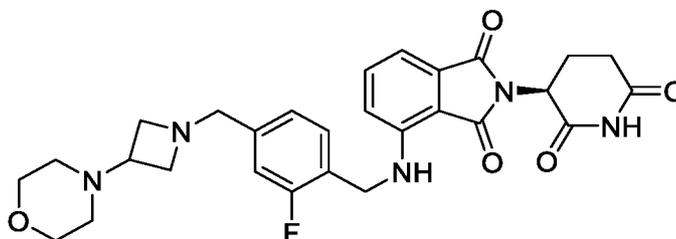


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

28. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



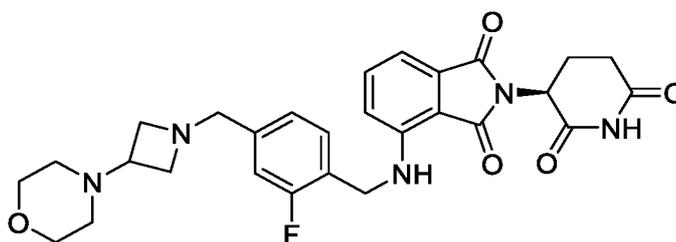
или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки,

экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,4 мг.

29. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:

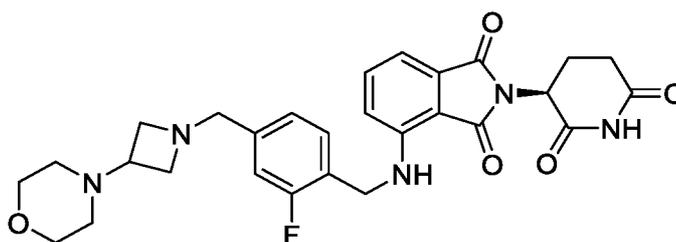


или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые 14 дней (Q14D), и вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

30. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион, имеющий следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемые соль, сольват, гидрат, сокристалл, клатрат или полиморф, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,2 мг.

31. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-30, в котором соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона.

32. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-30, в котором соединение представляет собой или содержит гидрат (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона.

33. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-30, в котором соединение представляет собой или содержит сольват (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона.

34. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-30, в котором соединение представляет собой или содержит (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-34, в котором во время начала введения соединения у субъекта не проявляется тяжелая токсичность после введения клеточной терапии.

36. Способ согласно варианту осуществления 35, причем:

тяжелая токсичность представляет собой тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно CRS степени 3 или выше, продолжительный CRS степени 3 или выше, CRS степени 4 или CRS степени 5; и/или

тяжелая токсичность представляет собой тяжелую нейротоксичность, необязательно нейротоксичность степени 3 или выше, продолжительную нейротоксичность степени 3 или выше, нейротоксичность степени 4 или нейротоксичность степени 5.

37. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-36, в котором введение соединения приостанавливают и/или дозу соединения модифицируют, необязательно снижают, если у субъекта проявляется токсичность после введения соединения, необязательно гематологическая токсичность.

38. Способ согласно варианту осуществления 37, причем токсичность представляет собой тяжелую тромбоцитопению, необязательно тромбоцитопению степени 4 или продолжительную тромбоцитопению степени 4.

39. Способ согласно варианту осуществления 37, причем токсичность представляет собой тяжелую нейтропению, необязательно нейтропению степени 4, продолжительную нейтропению степени 4, или фебрильную нейтропению, необязательно фебрильную нейтропению степени 3 или выше или продолжительную фебрильную нейтропению степени 3 или выше.

40. Способ согласно любому из вариантов осуществления 37-39, в котором введение соединения возобновляют после того, как у субъекта перестает проявляться токсичность.

41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-40, причем лимфома представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

42. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-41, причем лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL), причем, необязательно, NHL включает агрессивную NHL; диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL); DLBCL-NOS, необязательно трансформированную индолентную; EBV-положительную DLBCL-NOS; богатую Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому; первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому (PMBCL); фолликулярную лимфому (FL), необязательно фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В); и/или В-клеточную лимфому высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (с двумя/тремя генетическими изменениями).

43. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-42, в котором CD19 представляет собой человеческий CD19.

44. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-43, в котором химерный антигенный рецептор (CAR) содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с CD19, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

45. Способ согласно варианту осуществления 44, в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), необязательно человеческой цепи CD3-дзета.

46. Способ согласно варианту осуществления 44 или варианту осуществления 45, в котором химерный антигенный рецептор (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

47. Способ согласно варианту осуществления 46, в котором костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен из CD28 или 4-1BB, необязательно человеческого CD28 или человеческого 4-1BB.

48. Способ согласно варианту осуществления 46 или варианту осуществления 47, в котором костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен человеческого 4-1BB.

49. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-48, в котором:

CAR содержит scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, которая, необязательно, представляет собой или содержит 4-1BB, необязательно человеческий 4-1BB; и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета, необязательно сигнальный домен CD3-дзета человека; и причем, необязательно, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv.

50. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-48, в котором:

CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB, необязательно сигнальный домен 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой сигнальный домен CD3-дзета, необязательно сигнальный домен CD3-дзета человека.

51. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-48, в котором CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; спейсер; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, который, необязательно, представляет собой сигнальный домен 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной

содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета.

52. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-51, в котором спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир или его модифицированный вариант или состоит из него или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее.

53. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-52, в котором спейсер содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно шарнир IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него и/или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее.

54. Способ согласно варианту осуществления 52 или варианту осуществления 53, в котором спейсер имеет длину 12 аминокислот или приблизительно 12 аминокислот и/или содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него

55. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-54, в котором спейсер имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1, последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, или вариант любой из вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, или состоит из них.

56. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-55, в котором цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, содержит SEQ ID NO: 12 или ее вариант, характеризующийся идентичностью последовательности с ней по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

57. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-56, в котором цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, содержит SEQ ID NO: 13, или 14, или 15, характеризующиеся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-57, в котором scFv содержит последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36), и/или последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37), и/или последовательность CDRH1 DYGVV (SEQ

ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYYNNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40).

59. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-58, в котором scFv содержит переменную область тяжелой цепи из FMC63 и переменную область легкой цепи из FMC63 и/или последовательность CDRL1 из FMC63, последовательность CDRL2 из FMC63, последовательность CDRL3 из FMC63, последовательность CDRH1 из FMC63, последовательность CDRH2 из FMC63 и последовательность CDRH3 из FMC63, и в котором, необязательно, scFv содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 41, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под ID NO: 42.

60. Способ согласно любому из вариантов осуществления 49-58, в котором scFv имеет последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 43.

61. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-60, в котором доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 1×10^5 до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток или от 5×10^7 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, все включительно.

62. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-61, в котором доза сконструированных клеток содержит по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^5$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^6$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^8 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих клеток или по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^8 CAR-экспрессирующих клеток.

63. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-62, в котором доза сконструированных клеток содержит 1×10^8 или приблизительно 1×10^8 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

64. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-63, в котором дозу сконструированных клеток вводят парентерально, необязательно внутривенно.

65. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-64, в котором Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

66. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-65, в котором Т-клетки являются аутологичными для субъекта.

67. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-64, в котором Т-клетки являются аллогенными для субъекта.

68. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-67, в котором доза сконструированных клеток содержит CD4+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и введение данной дозы предусматривает введение нескольких отдельных композиций, причем упомянутые несколько отдельных композиций содержат первую композицию, содержащую один тип клеток из CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другой тип клеток из CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток.

69. Способ согласно варианту осуществления 68, в котором:

первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов или в котором введение первой композиции и введение второй композиции осуществляют в один и тот же день, осуществляют с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 12 часов, с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 6 часов или с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 2 часов; и/или

начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом от приблизительно 1 минуты до приблизительно 1 часа или с интервалом от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут.

70. Способ согласно варианту осуществления 68 или варианту осуществления 69, в котором первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час, не более чем 30 минут, не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут.

71. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-70, в котором первая композиция содержит CD4+ Т-клетки.

72. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-70, в котором первая композиция содержит CD8+ Т-клетки.

73. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-72, в котором первую композицию вводят до второй композиции.

74. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-73, в котором перед введением клеточной терапии субъекта подвергают предварительному кондиционированию с помощью лимфодеплецирующей терапии, включающей в себя введение флударабина и/или циклофосфамида.

75. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-73, дополнительно предусматривающий непосредственно перед введением клеточной терапии введение субъекту лимфодеплецирующей терапии, включающей в себя введение флударабина и/или циклофосфамида.

76. Способ согласно варианту осуществления 74 или варианту осуществления 75, в котором лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве приблизительно 200-400 мг/м², необязательно 300 мг/м² или приблизительно 300 мг/м², включительно, и/или флударабина в количестве приблизительно 20-40 мг/м², необязательно 30 мг/м², ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно в течение 3 дней, или в котором лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве приблизительно 500 мг/м².

77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 74-76, в котором:

лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве 300 мг/м² или приблизительно 300 мг/м² и флударабина в количестве приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней; и/или

лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве 500 мг/м² или приблизительно 500 мг/м² и флударабина в количестве приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней.

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-77, в котором субъект является человеком.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-78, причем:

по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают полного ответа (CR), который является устойчивым или является устойчивым по меньшей мере у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR, в течение 6 месяцев или более 6 месяцев или 9 месяцев или более 9 месяцев; и/или

причем по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR к шести месяцам, сохраняют ответ, сохраняют CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение 3 месяцев или более 3 месяцев, и/или 6 месяцев или более 6 месяцев, и/или более девяти месяцев; и/или

по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают объективного ответа (OR), причем, необязательно, OR является устойчивым или является устойчивым по меньшей мере у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR, в течение 6 месяцев или более 6 месяцев или 9 месяцев или более 9 месяцев; и/или

причем по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, сохраняют ответ или выживание в течение 3 месяцев или более 3 месяцев и/или 6 месяцев или более 6 месяцев.

80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 42-79, причем во время введения дозы сконструированных клеток или непосредственно перед этим у субъекта наблюдается рецидив после ремиссии после лечения с помощью одной или нескольких предшествующих терапий NHL, необязательно одной, двух или трех предшествующих терапий, отличных от еще одной дозы сконструированных клеток, экспрессирующих CAR, или он становится рефрактерным к этим терапиям.

81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 42-80, причем во время введения дозы сконструированных клеток или перед этим:

у субъекта выявлена или была идентифицирована лимфома с двумя/тремя генетическими изменениями;

у субъекта выявлена или была идентифицирована хеморефрактерная лимфома, необязательно хеморефрактерная DLBCL; и/или

субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию.

82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-81, в котором введение соединения:

обращает фенотип истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта;

предотвращает, ингибирует или задерживает возникновение фенотипа истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта;

снижает уровень или степень фенотипа истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта; или

снижает у субъекта процентную долю или общее количество CAR-экспрессирующих Т-клеток, которые характеризуются фенотипом истощения.

83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-82, в котором начало введения соединения осуществляют после введения Т-клеточной терапии, и после введения соединения или его начала у субъекта наблюдается возобновление или восстановление антигенспецифической или опухолеспецифической активности или функции CAR-экспрессирующих Т-клеток у упомянутого субъекта, причем,

необязательно, упомянутые возобновление, восстановление и/или начало введения упомянутого соединения происходит в момент времени после того, как CAR-экспрессирующие Т-клетки у субъекта или в крови субъекта продемонстрировали истощенный фенотип.

84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-83, в котором введение соединения предусматривает введение в количестве, с частотой и/или с продолжительностью, эффективными для:

(a) обеспечения повышения у субъекта антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности наивных или неистощенных Т-клеток, которые, необязательно, содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, после воздействия на Т-клетки антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения; или

(b) предотвращения, ингибирования или задержки у субъекта возникновения фенотипа истощения в наивных или неистощенных Т-клетках, которые, необязательно, содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, после воздействия на Т-клетки антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения; или

(c) обращения у субъекта фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно содержащих Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутому субъекту.

85. Способ согласно варианту осуществления 84, в котором введение соединения предусматривает введение в количестве, с частотой и/или с продолжительностью, эффективными (i) для обеспечения упомянутого повышения активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или задержки упомянутого возникновения упомянутого фенотипа истощения и/или обращения упомянутого фенотипа истощения.

86. Способ согласно варианту осуществления 84 или варианту осуществления 85, в котором Т-клетки у субъекта содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, и/или упомянутый антиген представляет собой CD19.

87. Способ согласно любому из вариантов осуществления 82-86, в котором фенотип истощения применительно к Т-клетке или популяции Т-клеток, содержит:

повышение уровня или степени поверхностной экспрессии на Т-клетке или Т-клетках, или процентной доли упомянутой популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностную экспрессию, одного или нескольких маркеров истощения, необязательно

2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях; или

снижение уровня или степени активности, проявляемой упомянутыми Т-клетками или популяцией Т-клеток при воздействии антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях.

88. Способ согласно варианту осуществления 87, в котором повышение уровня, степени или процентной доли происходит более чем в 1,2 раза или приблизительно в 1,2 раза, в 1,5 раза или приблизительно в 1,5 раза, в 2,0 раза или приблизительно в 2,0 раза, в 3 раза или приблизительно в 3 раза, в 4 раза или приблизительно в 4 раза, в 5 раз или приблизительно в 5 раз, в 6 раз или приблизительно в 6 раз, в 7 раз или приблизительно в 7 раз, в 8 раз или приблизительно в 8 раз, в 9 раз или приблизительно в 9 раз, в 10 раз или приблизительно в 10 раз или более.

89. Способ согласно варианту осуществления 87, в котором снижение уровня, степени или процентной доли происходит более чем в 1,2 раза или приблизительно в 1,2 раза, в 1,5 раза или приблизительно в 1,5 раза, в 2,0 раза или приблизительно в 2,0 раза, в 3 раза или приблизительно в 3 раза, в 4 раза или приблизительно в 4 раза, в 5 раз или приблизительно в 5 раз, в 6 раз или приблизительно в 6 раз, в 7 раз или приблизительно в 7 раз, в 8 раз или приблизительно в 8 раз, в 9 раз или приблизительно в 9 раз, в 10 раз или приблизительно в 10 раз или более.

90. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-89, в котором эталонная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, о которых известно, что они характеризуются неистощенным фенотипом, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно от того же субъекта или того же вида, что и субъект, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения.

91. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-90, в котором эталонная популяция Т-клеток (а) представляет собой соответствующую субъекту популяцию, содержащую массу Т-клеток, выделенных из крови субъекта, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения, причем, необязательно, масса Т-клеток не экспрессирует CAR, и/или (b) получена от субъекта, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения, до введения дозы Т-клеток, экспрессирующих CAR.

92. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-91, в котором эталонная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеточной терапии, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие CAR, до их введения субъекту, причем, необязательно, композиция представляет собой криоконсервированный образец.

93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-92, в котором один или несколько маркеров истощения представляют собой ингибирующий рецептор.

94. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-93, в котором один или несколько маркеров истощения выбраны из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

95. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-94, в котором активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продукции одного воспалительного цитокина или их комбинации, причем, необязательно, один цитокин или их комбинация выбраны из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

96. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-95, в котором воздействие упомянутого антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства предусматривает инкубацию с антигеном CD19 или специфическим к антигенному рецептору средством, необязательно средством, которое связывает антигенсвязывающий домен CAR.

97. Способ согласно варианту осуществления 96, в котором воздействие антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства предусматривает воздействие на Т-клетки экспрессирующих антиген CD19 клеток-мишеней, необязательно клеток В-клеточного злокачественного новообразования.

VIII. Примеры

[0546] Следующие примеры включены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Деградация транскрипционных факторов Aiolos и Ikaros в анти-CD19 CAR-T-клетках под действием соединения С

[0547] Оценивали способность (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона (соединение С) вызывать деградацию транскрипционных факторов Aiolos и Ikaros в стимулированных анти-CD19 CAR-T-клетках.

[0548] Композиции Т-клеток, содержащие анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки, получали из образцов лейкофереза от пяти здоровых взрослых доноров-людей с помощью способа, который предусматривал отбор Т-клеток на основе иммуноаффинности путем отдельного отбора CD4⁺ и CD8⁺ клеток из образцов, что приводило к двум композициям, обогащенным CD4⁺ и CD8⁺ клетками, соответственно, на одного донора. Клетки обогащенных CD4⁺ и CD8⁺ композиций по отдельности активировали с помощью анти-CD3/анти-CD28 гранул и подвергали лентивирусной трансдукции с помощью вектора, кодирующего анти-CD19 CAR. Анти-CD19 CAR содержал анти-CD19 одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), происходящий от мышинового антитела (вариабельная область происходила от FMC63), спейсер иммуноглобулинового происхождения, трансмембранный домен, происходящий от CD28, костимулирующую область, происходящую от 4-1BB, и внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета. Экспрессионная конструкция в вирусном векторе дополнительно содержала последовательности, кодирующие суррогатный поверхностный маркер экспрессии CAR, который был отделен от кодирующей CAR последовательности с помощью последовательности рибосомного пропуска T2A. Трансдуцированные популяции затем отдельно инкубировали в присутствии стимулирующих реагентов для размножения клеток. Размноженные CD4⁺ и CD8⁺ клетки составляли, криоконсервировали по отдельности и хранили.

[0549] Перед использованием криоконсервированные композиции сконструированных CD4⁺ и CD8⁺ клеток размораживали и объединяли при соотношении CD4:CD8 приблизительно 1:1 для каждого донора. Затем клетки объединенной композиции стимулировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов с помощью 30 мкг/мл CAR-специфического антиидиотипического антитела (смотри, например, WO2018/023100). Эта стимуляция имела место в присутствии контрольного носителя или в присутствии соединения С; (S)-3-[4-(4-морфолин-4-илметилбензилокси)-1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (соединение 2); или 3-(5-амино-2-метил-4-оксо-4Н-хиназолин-3-ил)пиперидин-2,6-диона (соединение 1) в концентрациях в диапазоне от приблизительно 10⁻¹ до 10⁴ нМ.

[0550] После инкубации стимулированные клетки окрашивали с помощью антител и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки внутриклеточных уровней Ikaros и Aiolos в CAR⁺ Т-клетках по измерениям по медианной интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity, MFI). Значения MFI для Ikaros и Aiolos нормализовывали и рассчитывали в процентах относительно контрольного носителя.

[0551] Наблюдали зависимое от концентрации снижение внутриклеточной экспрессии Ikaros и Aiolos в CAR-экспрессирующих стимулированных Т-клетках после инкубации с соединением С, соединением 2 и соединением 1 (**фиг. 1**). При всех протестированных уровнях концентраций соединений экспрессия Ikaros и Aiolos была ниже в клетках, обработанных соединением С, чем соединением 2 или соединением 1. Кроме того, рассчитывали значения EC50 для снижения экспрессии Aiolos и Ikaros для соединения С, соединения 2 и соединения 1 как концентрации соединений, которые снижают MFI Aiolos и Ikaros до 50% от их MFI в отсутствие соединений. Эти значения EC50 показаны в таблице **E1** как средние значения (95% доверительные интервалы для пяти доноров показаны в скобках). Результаты показывают, что соединение С сильнее вызывает деградацию Ikaros и Aiolos в анти-CD19 CAR-Т-клетках, чем соединением 2 или соединением 1.

Таблица E1: Средние значения EC50 (95% доверительный интервал)			
	Соединение С	Соединение 2	Соединение 1
Aiolos	0,25 (0,17-0,34)	2,50 (1,55-3,90)	52,66 (41,7-66,54)
Ikaros	0,31 (0,23-0,40)	4,02 (2,98-5,40)	59,33 (47,56-74,06)

Пример 2: Влияние соединения С на функцию CAR-Т-клеток

[0552] Оценивали Т-клеточную функцию анти-CD19 CAR-Т-клеток, обработанных соединением С.

[0553] Композиции анти-CD19 CAR-экспрессирующих Т-клеток получали от трех разных здоровых доноров, как описано в примере 1. Перед использованием криоконсервированные композиции сконструированных CD4⁺ и CD8⁺ клеток размораживали и объединяли при соотношении CD4:CD8 приблизительно 1:1.

А. Инкубация с антиидиотипическим антителом и соединением С

[0554] Для оценки жизнеспособности, пролиферации, фазы клеточного цикла и продукции цитокинов объединенные композиции CD4⁺ и CD8⁺ CAR-экспрессирующих Т-клеток инкубировали с прикрепленным к CAR-специфическим антиидиотипическим антителом (смотри, например, WO2018/023100) и инкубировали при 37°C в присутствии соединения С, соединения 2 или соединения 1. После инкубации стимулированные CAR-Т-клетки собирали, дважды промывали в среде и оценивали.

[0555] Жизнеспособность оценивали в день 3 культивирования с помощью проточной цитометрии с использованием красителя живых/мертвых клеток. Как показано на **фиг. 2А** для трех доноров (среднее ± SEM), соединения не влияли на жизнеспособность

клеток при стимуляции или с помощью 3 мкг/мл антиидиотипического антитела (левая панель), или с помощью 30 мкг/мл антиидиотипического антитела (правая панель).

[0556] За пролиферацией Т-клеток во время культивирования с прикрепленным к планшету антиидиотипическим антителом наблюдали в течение семи дней с использованием системы анализа живых клеток IncuCyte® (Essen BioScience Inc.), и количество удвоений клеток, стимулированных с помощью 30 мкг/мл антиидиотипического антитела, показано на **фиг. 2В** и **фиг. 2С** для трех доноров (среднее \pm SEM). Как показано на **фиг. 2В**, присутствие соединений во время CAR-специфической стимуляции с помощью антиидиотипического антитела уменьшало величину пролиферации CAR-Т-клеток. Клетки, обработанные соединением С, характеризовались наибольшим снижением удвоения при всех протестированных дозах. Как показано на **фиг. 2С**, пролиферация снижалась в присутствии 1 нМ соединения С (***) $P < 0,001$) и дополнительно снижалась в присутствии 10 нМ соединения С (****) $P < 0,0001$).

[0557] Фазы клеточного цикла CAR-Т-клеток, обработанных соединениями во время CAR-специфической стимуляции с помощью связанного с планшетом антиидиотипического антитела, определяли с использованием включения EDU в течение двух часов после трех дней стимуляции. Для включения EDU CAR-Т-клетки метили с использованием набора для исследования пролиферации клеток с помощью EdU Click-iT™ (Thermo Fisher Scientific), после чего подготовленные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты на **фиг. 2D** (левая панель: стимуляция с помощью 3 мкг/мл антиидиотипического антитела; правая панель: стимуляция с помощью 30 мкг/мл антиидиотипического антитела) показывают, что обработка более высокими дозами соединений увеличивала процентную долю CAR-Т-клеток в фазе G1 клеточного цикла. Соединение С оказывало наибольшее влияние на процентную долю клеток в фазе G1 при всех протестированных дозах, с аналогичным влиянием на процентную долю клеток в фазе G1 клеточного цикла при дозе, в десять или сто раз меньшей, по сравнению с другими протестированными соединениями. Как показано на **фиг. 2E**, процентная доля клеток в фазе G1 увеличивалась в присутствии как 1 нМ, так и 10 нМ соединения С (***) $P < 0,001$). Без ограничения теорией, накопление CAR-Т-клеток в фазе G1 может объяснять один из механизмов, с помощью которого соединения могут ограничивать наступление истощения во время хронической стимуляции, как показано в примере 3 ниже.

[0558] Определяли внутриклеточные уровни цитокинов в CAR-Т-клетках, которые стимулировали в течение 72 часов с помощью 30 мкг/мл антиидиотипического антитела. Для этого супернатанты собирали из стимулированных CAR-Т-клеток и анализировали на содержание интерферона- γ (IFN- γ) и интерлейкина-2 (IL-2) с использованием

мультиплексного электрохемилюминесцентного анализа. Для окрашивания внутриклеточных цитокинов, включая перфорин и гранзим В, клетки фиксировали и пермеабелизировали с использованием набора буферов для окрашивания Foxp3/транскрипционных факторов (Thermo Fisher Scientific). Затем с помощью проточной цитометрии определяли внутриклеточные уровни цитокинов IFN γ , перфорина, гранзима В и IL-2. Как показано на **фиг. 2F**, обработка клеток соединениями увеличивала внутриклеточную экспрессию эффекторных цитокинов (IFN γ , перфорин, гранзим В) при определении по кратному изменению MFI по сравнению со стимуляцией с помощью антиидиотипического антитела в присутствии перфорина, но не оказывала значительного воздействия на продукцию IL-2. Значения log₂ кратности изменения больше нуля обозначены знаком «+» на **фиг. 2F**. Аналогичные результаты наблюдались при измерении процентной доли, клеток положительных по цитокинам.

В. Инкубация с CD19+ опухолевыми клетками и соединением С

[0559] Для оценки воздействия соединения С на цитолитическую функцию CAR-T-клеток анти-CD19 CAR-T-клетки совместно культивировали с резистентными к CAR-T-клеткам SELMoD-чувствительными CD19+ опухолевыми клетками RL при соотношении эффектор:мишень (E:T) 1:1 и в присутствии различных концентраций соединения С или соединения 2. Для этого CAR-T-клетки высевали на планшеты с поли-D-лизином. Затем CD19+ опухолевые клетки, трансдуцированные IncuCyte® NucLight Red (Essen BioScience Inc.), добавляли к CAR-T-клеткам в дополнение к соединению С или контрольному носителю. Количество опухолевых клеток измеряли в течение нескольких дней.

[0560] На **фиг. 2G** и **2H** показано количество клеток опухолевых клеток RL, обработанных анти-CD19 CAR-T-клетками и соединением С или соединением 2, соответственно (левая панель: соединение в концентрации 0,001 мкМ; средняя панель: соединение в концентрации 0,01 мкМ; правая панель: соединение в концентрации 0,1 мкМ). Обработка CAR-T-клетками в комбинации с любым иммуномодулирующим соединением приводило к более низкому количеству опухолевых клеток, чем только CAR-T-клетками или только соединениями. Как показано на **фиг. 2G**, количество опухолевых клеток было ниже для всех уровней концентрации, предложенных для соединения С, включая 0,001 мкМ ($P < 0,0001$) и 0,01 мкМ ($P < 0,0001$). Как показано на **фиг. 2H**, количество опухолевых клеток было ниже с соединением 2 при уровнях концентрации 0,01 мкМ и 0,1 мкМ, но не 0,001 мкМ.

С. Вывод

[0561] В совокупности эти результаты показывают, что, не влияя на жизнеспособность CAR-T-клеток, обработка соединением С снижает пролиферацию

CAR-T-клеток, увеличивает количество клеток в фазе G1 и увеличивает выработку определенных цитокинов. Более того, влияние на пролиферацию и клеточный цикл CAR-T-клеток было более выраженным для соединения С по сравнению с соединением 2 или соединением 1, и цитолиз улучшался при более низких дозах соединения С по сравнению с соединением 2.

Пример 3: Оценка хронически стимулированных CAR-T-клеток, одновременно обработанных соединением С

[0562] Оценивали способность соединения С блокировать или снижать истощение в хронически стимулированных CAR-T-клетках.

[0563] Чтобы имитировать условия хронической стимуляции, анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные, как описано в примере 1, инкубировали со связанным с планшетом CAR-специфическим антиидиотипическим антителом (смотри, например, WO2018/023100) и инкубировали при 37°C в течение шести дней. Было показано, что эта шестидневная стимуляция вызывает гипofункциональное состояние у стимулированных CAR-T-клеток. Например, CAR-T-клетки, на которые повторно воздействовали CD19+ опухолевыми клетками, после шестидневной стимуляции снижали продукцию цитокинов IFN γ и IL-2 (**фиг. 3А**) и снижали цитолитическую функцию (**фиг. 3В**) по сравнению со свежеразмороженными CAR-T-клетками, не подвергавшимися шестидневной стимуляции.

[0564] Оценивали способность соединения С блокировать или снижать гипofункциональность этих CAR-T-клеток после хронической стимуляции. Для этого сконструированные CAR-T-клетки одновременно обрабатывали соединением С, соединением 2 или контрольным носителем во время шестидневной стимуляции. Затем стимулированные CAR-T-клетки собирали, дважды промывали в среде подвергали повторному воздействию с помощью опухолевых сфероидов лимфомы Granta-519 (которые были трансдуцированы с помощью IncuCyte NucLight Red) в отсутствие соединения С, после чего цитолитическую активность оценивали по потере красной флуоресценции с течением времени и с помощью усредненного измерения размера опухолевых сфероидов в различные моменты времени после совместного культивирования с CAR-T-клетками. Также оценивали продукцию цитокинов, экспрессию I κ B α и экспрессию генов CAR-T-клеток.

[0565] На **фиг. 3С** показаны репрезентативные изображения опухолевых сфероидов Granta-519 в день 9 совместного культивирования с CAR-T-клетками, которые были стимулированы в присутствии соединения С. На **фиг. 3D** и **3E** показан объем опухолевых сфероидов, совместно культивированных с CAR-T-клетками, которые были

стимулированы в присутствии соединения С после хронической стимуляции. Как показано на **фиг. 3D** и **фиг. 3E**, цитолитическая активность во время повторного воздействия улучшалась при обработке соединением С в концентрации 1 нМ во время стимуляции (**** $P < 0,0001$). Как показано на **фиг. 3E**, обработка с помощью 10 нМ соединения С во время стимуляции также приводила к уменьшению размера опухоли в день 9 совместного культивирования (* $P < 0,05$), хотя и в меньшей степени, чем обработка с помощью 1 нМ соединения С (**** $P < 0,0001$). Также оценивали продукцию цитокина IFN γ в супернатанте совместно культивированных клеток через пять дней после повторного воздействия опухолевых клеток, и соединение С в концентрации 1 нМ, присутствующее одновременно во время хронической стимуляции, также улучшало продукцию IFN γ в обработанных CAR-T-клетках при повторном воздействии (**фиг. 3F**, **** $P < 0,0001$). Обработка с помощью 10 нМ соединения С во время стимуляции также увеличивала продукцию IFN γ (** $P < 0,001$), хотя и в меньшей степени, чем с помощью 1 нМ соединения С.

[0566] На **фиг. 3G** показана экспрессия Ikaros в CAR-T-клетках после шести дней хронической стимуляции в присутствии соединения С или соединения 2, определенная по MFI. Как показано, экспрессия Ikaros была самой низкой для CAR-T-клеток, обработанных соединением С в более высоких концентрациях (например, 0,01 мкМ и 0,1 мкМ).

[0567] Через пять дней после повторного воздействия CAR-T-клетки отделяли от опухолевых сфероидов и анализировали экспрессию генов посредством секвенирования (RNA-seq). Библиотеки для RNA-seq секвенировали, и чтения картировали по эталонному геному человека Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38). Уровни экспрессии генов определяли количественно, и осуществляли дифференциальную экспрессию с использованием DESeq2. Экспрессию генов сравнивали между хронически стимулированными CAR-T-клетками, обработанными соединением С во время стимуляции, и необработанными хронически стимулированными CAR-T-клетками, а также между необработанными хронически стимулированными CAR-T-клетками и нестимулированными CAR-T-клетками. Дифференциальную экспрессию рассчитывали на основе эффектов от обработки с помощью 1 нМ и 10 нМ соединений. Пороги дифференциального выбора локуса составляли $q \leq 0,05$ и \log_2 абсолютной кратности изменения $\geq 0,5$.

[0568] Как показано на **фиг. 3H**, обработка соединением С во время хронической стимуляции приводила к изменению экспрессии генов в хронически стимулированных CAR-T-клетках по сравнению с необработанными хронически стимулированными CAR-T-

клетками. Для того же набора генов на **фиг. 3I** показано, как различались уровни экспрессии между обработанными и необработанными хронически стимулированными CAR-T-клетками (ось y) и между необработанными хронически стимулированными и нестимулированными CAR-T-клетками (ось x). Как показано, гены, повышающе отрегулированные обработкой соединением С во время стимуляции, были понижающе отрегулированы хронической стимуляцией (верхний левый квадрант), и гены, понижающе отрегулированные обработкой соединением С во время стимуляции, были повышающе отрегулированы хронической стимуляцией (нижний правый квадрант).

[0569] Также проводили анализ путей данных RNA-seq CAR-T с использованием Киотской энциклопедии генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) с использованием clusterProfiler. Пути, повышающая регуляция которых хронической стимуляцией была предотвращена или уменьшена обработкой соединением С, показаны на **фиг. 3J**, и к ним относятся специфические пути пролиферации клеток. Соотношения генов, как показано на **фиг. 3J**, рассчитывали как процент значимых генов от общего числа генов в данном пути.

[0570] В совокупности эти результаты указывают на то, что присутствие соединения С даже в относительно низких концентрациях в условиях хронической стимуляции может ограничивать или уменьшать истощение в хронически стимулированных CAR-T-клетках. Эти результаты также показали, что экспрессия Ikaros в CAR-T-клетках снижается при обработке более высокими концентрациями соединения С, и что пути, участвующие в функции Т-клеток, обогащаются после хронической стимуляции и могут быть обращены соединением С при одновременной обработке во время хронической стимуляции.

[0571] Эти результаты также показали, что обработка более высокой концентрацией (10 нМ) соединения С во время хронической стимуляции приводила к меньшему улучшению цитолитической активности и продукции цитокинов CAR-T-клетками по сравнению с обработкой с помощью 1 нМ соединения С. Без ограничения теорией, обработка более высокими концентрациями соединения С может приводить к устойчивой или чрезмерной деградации Ikaros и Aiolos, что приводит к дисфункции CAR-T-клеток, что ограничивает преимущества от обработки соединением С во время хронической стимуляции. Напротив, более низкие концентрации соединения С могут улучшать функцию CAR-T-клеток без вредных эффектов устойчивой или чрезмерной деградации Aiolos и Ikaros.

Пример 4: Оценка хронически стимулированных CAR-T-клеток после восстанавливающей обработки соединением С

[0572] Оценивали способность соединения С восстанавливать хронически стимулированные CAR-T-клетки от истощения.

[0573] Анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные, как описано в примере 1, хронически стимулировали, как описано в примере 3, но в отсутствие соединения С во время стимуляции. Вместо этого хронически стимулированные CAR-T-клетки обрабатывали соединением С во время повторного воздействия опухолевых сфероидов лимфомы Granta-519 или опухолевых сфероидов A549, после чего оценивали цитолитическую активность, продукцию цитокинов и экспрессию генов в CAR-T-клетках.

[0574] На **фиг. 4А** показаны репрезентативные изображения опухолевых сфероидов Granta-519 и A549 в день 9 совместного культивирования с CAR-T-клетками в присутствии соединения С. На **фиг. 4В** и **4С** показан объем опухолевых сфероидов, совместно культивированных с анти-CD19 CAR-T-клетками в присутствии соединения С. Как показано на **фиг. 4В**, объем опухоли уменьшался в большей степени при одновременной обработке CAR-T-клетками и соединением С (1 нМ или 10 нМ), чем при обработке только хронически стимулированными CAR-T-клетками или только соединением С ($P < 0,0001$ для обеих концентраций). На **фиг. 4С** показаны аналогичные результаты на основе размера опухоли в день 9 совместного культивирования ($*** P < 0,001$ для 1 нМ; $** P < 0,01$ для 10 нМ). Продукцию цитокинов также оценивали через пять дней после повторного воздействия опухолевых клеток, и присутствие соединения С во время повторного воздействия также улучшало продукцию IFN γ в хронически стимулированных CAR-T-клетках по сравнению с одними только хронически стимулированными CAR-T-клетками (контроль; **фиг. 4D**). Продукция цитокинов была самой высокой для CAR-T-клеток, на которые повторно воздействовали в присутствии соединения С в концентрации 1 нМ ($P < 0,0001$), и также увеличивалась для CAR-T-клеток, на которые повторно воздействовали в присутствии соединения в концентрации 10 нМ ($P < 0,05$).

[0575] Экспрессию генов хронически стимулированных CAR-T-клеток также анализировали с помощью секвенирования РНК, как в примере 3. Экспрессию генов сравнивали между хронически стимулированными CAR-T-клетками, обработанными соединением С во время повторного воздействия, и необработанными хронически стимулированными CAR-T-клетками, а также между необработанными хронически стимулированными CAR-T-клетками и нестимулированными CAR-T-клетками. Как показано на **фиг. 4Е**, обработка соединением С во время повторного воздействия приводила к изменению экспрессии генов в хронически стимулированных CAR-T-клетках по сравнению с необработанными хронически стимулированными CAR-клетками. Как

показано на **фиг. 4F**, гены, повышающе отрегулируемые обработкой соединением С во время повторного воздействия, были понижающе отрегулированы хронической стимуляцией (верхний левый квадрант), и гены, понижающе отрегулируемые обработкой соединением С во время повторного воздействия, были повышающе отрегулированы хронической стимуляцией (нижний правый квадрант). Пути, повышающая регуляция которых хронической стимуляцией обращена обработкой соединением С во время повторного воздействия, показаны на **фиг. 4G**.

[0576] В совокупности эти результаты указывают на то, что присутствие соединения С даже в относительно низких концентрациях может восстанавливать или возвращать уже хронически стимулированные CAR-T-клетки от истощенного фенотипа. Аналогично результатам с одновременной стимуляцией, описанным в примере 3, результаты показали, что пути, участвующие в функции Т-клеток, обогащаются после хронической стимуляции и могут быть обращены соединением С при восстанавливающей обработке.

Пример 5: Оценка хронически стимулированных CAR-T-клеток, обработанных соединением С при различных уровнях концентрации

[0577] Различные концентрации соединения С тестировали в отношении их воздействия на цитолитическую функцию CAR-T-клеток после хронической стимуляции. CAR-T-клетки обрабатывали различными концентрациями соединения С или во время, или после хронической стимуляции.

[0578] Анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные, как описано в примере 1, хронически стимулировали, как описано в примере 3 (в присутствии соединения С во время хронической стимуляции), затем на них повторно воздействовали опухолевыми сфероидами лимфомы Granta-519 в отсутствие соединения С (группа одновременной обработки). Кроме того, анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки хронически стимулировали, как описано в примере 4 (в отсутствие соединения С во время хронической стимуляции), затем на них повторно воздействовали опухолевыми сфероидами лимфомы Granta-519 в присутствии соединения С (группа восстанавливающей обработки). Во время повторного воздействия оценивали цитолитическую активность по количеству опухолевых клеток в различные моменты времени во время совместного культивирования с CAR-T-клетками.

[0579] На **фиг. 5A** показано количество опухолевых клеток во время повторного воздействия на CAR-T-клетки, хронически стимулированные в присутствии соединения С (одновременная обработка). На **фиг. 5B** показано количество опухолевых клеток во время повторного воздействия на CAR-T-клетки в присутствии соединения С

(восстанавливающая обработка). В обоих условиях обработки количество опухолевых клеток было снижено по сравнению с контрольными условиями для CAR-T-клеток, обработанных соединением С в концентрации 0,001 мкМ. Также в обеих группах обработки количество опухолевых клеток было выше по сравнению с контрольными условиями для CAR-T-клеток, обработанных соединением С в концентрациях 0,01 мкМ и 0,1 мкМ.

[0580] Эти результаты позволяют предположить, что обработка более высокими концентрациями соединения С может ухудшать цитолитическую активность хронически стимулированных CAR-T-клеток. Без ограничения теорией, это ухудшение может быть вызвано устойчивой или чрезмерной деградацией Ikaros под действием соединения С при более высоких концентрациях, например, как показано в примере 3.

Пример 6: Оценка схемы прерывистого введения доз соединения С

[0581] В связи с сильным влиянием соединения С на деградацию Ikaros и Aiolos, при чем чрезмерное или продолжительное лечение может отрицательно влиять на функцию CAR-T-клеток и/или вызывать нейтропению, вторичную по отношению к остановке созревания нейтрофилов, оценивали схему прерывистого введения доз для лечения с помощью соединения С в отношении ее способности вызывать глубокую, но временную деградацию Ikaros. Для этого моделировали фармакокинетику еженедельной (Q7D) дозы 0,3 мг соединения С. На основании этих результатов определяли деградацию в CAR-T-клетках после кратковременного (24 часа) и хронического (шесть дней) воздействия соединения С. Также моделировали эффекты еженедельной дозы 0,3 мг соединения С на развитие нейтрофилов.

[0582] На **фиг. 6А** показаны ожидаемые уровни концентрации в плазме соединения С на основе схемы введения доз Q7D. Как показано, фармакокинетическое моделирование выявило двухфазную элиминацию соединения С с высоким временным начальным пиком до C_{\max} 20 нМ, за которым следует продолжительная конечная элиминация и C_{\min} в день 7 приблизительно 1 нМ.

[0583] На **фиг. 6В** и **6С** показаны уровни Ikaros в анти-CD19 CAR-T-клетках, полученных, как описано в примере 1, после 24-часового (**фиг. 6В**) или шестидневного воздействия (**фиг. 6С**) соединения С. Как показано на **фиг. 6В**, такие низкие уровни дозы соединения С, как 0,01 мкМ, приводят к деградации Ikaros, что позволяет предположить, что доза 0,3 мг соединения С (с C_{\max} 20 нМ) приведет к существенной деградации Ikaros через 24 часа. Как показано на **фиг. 6С**, шестидневное воздействие 0,001 мкМ соединения С не влияло на уровни Ikaros, что позволяет предположить, что, поскольку концентрации

соединения С в плазме снижаются с течением времени между дозами, уровни Ikaros могут иметь возможность возвращаться к исходным уровням после первоначальной деградации.

[0584] На **фиг. 6D** показаны прогнозируемые профили абсолютного числа нейтрофилов (ANC), полученные с использованием четырех различных фармакодинамических моделей. Эти профили были получены, для того чтобы оценить влияние еженедельной дозы 0,3 мг соединения С на развитие нейтрофилов, в том числе для оценки того, приведет ли еженедельная доза 0,3 мг к низкому числу нейтрофилов (например, нейтропении). Для всех моделей прогнозировали, что средний минимальный уровень ANC будет выше приблизительно $2,2 \times 10^9$ клеток на л при еженедельном приеме дозы 0,3 мг.

[0585] В совокупности эти результаты позволяют предположить, что схема прерывистого введения доз соединения С в комбинации с CAR-T-клеточной терапией позволит осуществить глубокую, но временную деградацию Ikaros в CAR-T-клетках без существенного влияния на развитие нейтрофилов или отрицательного влияния на функцию CAR-T-клеток. Без ограничения теорией, фармакокинетическая элиминация соединения С при еженедельных дозах может позволять уровням Ikaros возвращаться к исходным значениям между дозами, тем самым предотвращая дисфункцию CAR-T-клеток или остановку созревания нейтрофилов из-за устойчивой деградации Ikaros.

Пример 7: Оценка схемы прерывистого введения доз соединения С в хронически стимулированных CAR-T-клетках

[0586] Оценивали влияние схемы прерывистого введения доз соединения С на CAR-T-клетки. Для имитации двухфазной элиминации соединения С при еженедельных дозах, как показано в примере 6, CAR-T-клетки хронически стимулировали в присутствии соединения С в течение одного дня при высокой концентрации соединения С, затем в течение пяти дней при низкой концентрации соединения С.

[0587] Анти-CD19 CAR-экспрессирующие Т-клетки, полученные, как описано в примере 1, хронически стимулировали, как описано в примере 3, в присутствии соединения С. Во время хронической стимуляции соединение С присутствовало в концентрации (i) 50 нМ в течение одного дня и 1 нМ в течение оставшихся пяти дней, (ii) 25 нМ в течение одного дня и 0,5 нМ в течение оставшихся пяти дней, (iii) 10 нМ в течение одного дня и отсутствовало в течение оставшихся пяти дней или (iv) 1 нМ в течение всех шести дней. Стимулированные CAR-T-клетки затем повторно подвергали воздействию сфероидов опухоли лимфомы Raji в отсутствие соединения С, после чего оценивали цитолитическую активность.

[0588] На **фиг. 7А** показано количество опухолевых клеток во время повторного воздействия на CAR-T-клетки, хронически стимулированные в присутствии соединения С, как описано, а также свежие (не хронически стимулированные) CAR-T-клетки. Как показано, присутствие соединения С при высокой концентрации в течение одного дня с последующей низкой концентрацией в течение пяти дней во время хронической стимуляции (50 нМ в течение одного дня и 1 нМ в течение оставшихся пяти дней или 25 нМ в течение одного дня и 0,5 нМ в течение оставшихся пяти дней) приводило к наибольшему увеличению цитолитической активности хронически стимулированных CAR-T-клеток.

[0589] Аналогичные результаты показаны на **фиг. 7В** для отдельного эксперимента, в котором CAR-T-клетки хронически стимулировали в течение 7 дней в присутствии или в отсутствие соединения С. В этом эксперименте соединение С присутствовало в концентрации (i) 50 нМ в течение одного дня и 1 нМ в течение оставшихся шести дней стимуляции, (ii) 25 нМ в течение одного дня и 0,5 нМ в течение оставшихся шести дней стимуляции, (iii) 10 нМ в течение всех семи дней стимуляции или (iv) 1 нМ в течение всех семи дней стимуляции. На стимулированные CAR-T-клетки затем повторно воздействовали опухолевыми сфероиды лимфомы Raji в отсутствие соединения С, после чего цитолитическую активность оценивали в течение четырехдневного периода. Как показано на **фиг. 7В**, присутствие соединения С в концентрации 50 нМ в течение одного дня и 1 нМ в течение оставшихся шести дней стимуляции улучшало цитолитическую активность хронически стимулированных CAR-T-клеток (**** $P < 0,0001$). Присутствие соединения С в концентрации 25 нМ в течение одного дня и 0,5 нМ в течение оставшихся шести дней стимуляции также улучшало цитолитическую активность (**** $P < 0,0001$). CAR-T-клетки, стимулированные в течение семи дней в присутствии или в отсутствие соединения С, также анализировали на фенотипические маркеры Т-клеток памяти с использованием проточной цитометрии после хронической стимуляции. Как показано на **фиг. 7С**, в CAR-экспрессирующих CD8 Т-клетках, стимулированных в присутствии соединения С, была более высокая процентная доля CD27+/CCR7+ клеток, чем в клетках, стимулированных в отсутствие соединения С. Экспрессия CD27/CCR7, который представляет собой маркер менее дифференцированных подобных наивным Т-клеток, была самой высокой в CAR-экспрессирующих CD8 Т-клетках, стимулированных в присутствии соединения С в концентрации 50 нМ в течение одного дня и 1 нМ в течение оставшихся шести дней стимуляции (* $P < 0,05$).

[0590] Эти результаты позволяют предположить, что еженедельные дозы соединения С, например, как часть схемы прерывистого введения доз соединения С, будут

улучшать цитолитическую активность CAR-T-клеток, вводимых в комбинации с соединением С. Эти результаты также указывают на то, что схема прерывистого введения доз соединения С будет приводить к сохранению менее дифференцированного фенотипа памяти в CAR-T-клетках.

Пример 8: Лечение рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований с помощью анти-CD19 CAR-T-клеток и соединения С

[0591] Комбинированную терапию, которая включает в себя соединение С и терапевтические композиции CAR-T-клеток, содержащие аутологичные Т-клетки, экспрессирующие CAR, специфические к CD19, вводили субъектам с рецидивирующей/рефрактерной агрессивной В-клеточной неходжкинской лимфомой (NHL).

[0592] В частности, аутологичные направленные против CD19 терапевтические Т-клеточные композиции получали, как описано в примере 1, из образцов лейкофереза от взрослых субъектов-людей с агрессивной В-клеточной NHL, определяемой как DLBCL NOS, включая трансформированную индолентную NHL; фолликулярной лимфомой степени 3В; богатой Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточной В-клеточной лимфомой; EBV-положительной DLBCL, NOS; первичной медиастинальной (тимической) крупноклеточной В-клеточной лимфомой; или В-клеточной лимфомой высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (лимфома с двумя/тремя генетическими изменениями). Агрессивная В-клеточная NHL была гистологически подтверждена при последнем рецидиве, в противном случае требовалась новая биопсия опухоли.

[0593] У соответствующих критериям участия субъектов был рецидив, или они были рефрактерными к по меньшей мере двум предыдущим линиям системной терапии, которые включали в себя нацеленное на CD20 средство и антрациклин. Что касается субъектов с трансформированным заболеванием, для соответствия критериям участия субъект должен был пройти как минимум две линии системной терапии трансформированного заболевания (то есть DLBCL). К предыдущим линиям терапии не относятся те, которые применялись при ранее индолентном состоянии (например, фолликулярной лимфоме или CLL). Субъектам не обязательно было получать антрациклин для их DLBCL, если они получали антрациклин для индолентного заболевания. Субъекты ранее не получали лечение с помощью соединения С.

[0594] У соответствующих критериям участия субъектов было положительное по позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) (то есть 4 или 5 баллов по шкале Deauville) и

измеримое с помощью компьютерной томографии (КТ) заболевание согласно классификации Лугано. У соответствующих критериям участия субъекты сумма произведений перпендикулярных диаметров (sum of product of perpendicular diameters, SPD) вплоть до шести индексных очагов превышала или была равна 25 см^2 в соответствии со сканированием с помощью КТ.

[0595] Для получения аутологичных композиций анти-CD19 CAR-T-клеток образцы лейкофереза получали у субъектов приблизительно за четыре недели до запланированного введения CAR-T-клеток. Затем субъекты получали лимфодеплецирующую химиотерапию с помощью флударабина (Flu, 30 мг/м^2) и циклофосфида (Cy, 300 мг/м^2) в течение трех дней. Через два-семь дней после завершения лимфодеплецирующей химиотерапии субъекты получали дозу CAR-экспрессирующих Т-клеток (например, 1×10^6 всех Т-клеток) в день 1 комбинированной терапии.

[0596] Субъектов распределяли в одну из семи субкогорт по дозам для введения соединения С. Пациенты, отнесенные к субкогорте А, получали схему введения доз $0,3 \text{ мг}$ соединения С один раз в неделю, начиная с дня 8. Для субъектов с CRS или NT степени 3 или выше при запланированном начале введения соединения С начало введения соединения С может быть отсрочено на вплоть до трех дней. В зависимости от безопасности и переносимости схемы введения доз для субкогорты А можно оценивать другие схемы введения доз. Субкогорты В получает схему введения доз $0,3 \text{ мг}$ соединения С один раз в неделю, начиная с дня 1. Субкогорты С получает схему введения доз $0,3 \text{ мг}$ соединения С один раз в неделю, начиная с дня 15. Субкогорты D получает схему введения доз $0,4 \text{ мг}$ соединения С один раз в неделю, начиная с дня 8. Субкогорты E получает схему введения доз $0,3 \text{ мг}$ соединения С один раз каждые две недели, начиная с дня 8. Субкогорты F получает схему введения доз $0,2 \text{ мг}$ соединения С один раз в неделю, начиная с дня 8. Субкогорты G получает схему введения доз $0,6 \text{ мг}$ соединения С один раз в неделю, начиная с дня 8. Для всех субкогорт введение соединения С продолжают до дня 85 комбинированной терапии.

[0597] Субъектов контролировали в отношении безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики и клинического ответа. Определение клинического ответа на лечение включало в себя оценку того, демонстрировал ли субъект прогрессирование заболевания (PD), частичный ответ (PR), полный ответ (CR) и/или стабилизацию заболевания.

[0598] Не предполагается, что настоящее изобретение ограничено в объеме конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые представлены, например, для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения. Различные модификации

описанных композиций и способов будут очевидными из настоящего описания и идей настоящего документа. Такие варианты могут быть реализованы без отклонения от истинного объема и сущности настоящего раскрытия, и предполагается, что они попадают в объем настоящего раскрытия.

Последовательности

№	Последовательность	Примечание
1	ESKYGPPCPPCP	спейсер (шарнир IgG4) (а. к.)
2	gaatctaagtagcgaccgcccctgcccccttgcct	спейсер (шарнир IgG4) (нукл.)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Спейсер шарнир-CH3
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Спейсер шарнир-CH2-CH3
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGE EKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLR DKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSN GSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPQLPPQRLMALREPA AQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLED QREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYT CVVSHEDSRLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-шарнир-Fc
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLINATNI KHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEI TGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTK IISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRG RECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGP	tEGFR

	DNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVC HLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVV ALGIGLFM	
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 153-179 из № доступа P10747)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (аминокислоты 114-179 из № доступа P10747)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (аминокислоты 180-220 из P10747)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (замена LL на GG)
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (аминокислоты 214-255 из Q07011.1)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3-дзета
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3-дзета
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	CD3-дзета
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRG DSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFEN LEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNK NLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALC	tEGFR

	SPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENS ECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCP AGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP TNGPKPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM	
17	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P-, где P представляет собой пролин, G представляет собой глицин и S представляет собой серин	Линкер
23	GSADDAKKDAAKKDGKS	Линкер
24	atgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctctgatccca	Сигнальная последовательно сть альфа-цепи GMCSFR
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	Сигнальная последовательно сть альфа-цепи GMCSFR
26	MALPVTALLLPLALLLHA	Сигнальный пептид CD8- альфа
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCP	Шарнир
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	Шарнир
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	Шарнир
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2

37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQE SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPG QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLS GLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQ SPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADY FCQQYNRYPYTSGGGKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкер
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPG QGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLS GLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGGS GGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTI	scFv

	TNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgacatca gctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctgaactggatcagcagaagcccgacggcac cgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccggttagcggca gggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatgccacctac tttggcagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcgggaacaaagctggaaatcaccgg cagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaag ctgcaggaaagcggccctggcctggggccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtga gcggcgtgagcctgcccactacggcgtgagctggatccggcagccccaggaagggcctgg aatggctgggctgatctggggcagcgagaccactactacaacagcgcctgaagagccggct gaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgtcctgaagatgaacagcctgcagaccgac gacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactgg ggccagggcaccagcgtgacctgagcagc	Последовательно сть, кодирующая scFv
58	X ₁ PPX ₂ P X ₁ представляет собой глицин, цистеин или аргинин X ₂ представляет собой цистеин или треонин	Шарнир
59	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Линкер

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, экспрессирующего CD19, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, экспрессирующий CD19, комбинированной терапии, включающей в себя:

(i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленный против данного рака, причем данную Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

(ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, комбинированной терапии, включающей в себя:

(i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем данную Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

(ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором введение соединения начинают после введения Т-клеточной терапии.

4. Способ лечения рака, экспрессирующего CD19, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, экспрессирующий CD19, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), направленный против данного

рака, причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии и введение соединения начинают после введения Т-клеточной терапии.

5. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии и введение соединения начинают после введения Т-клеточной терапии.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором соединение вводят в виде нескольких доз, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю.

9. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, комбинированной терапии, включающей в себя:

(i) Т-клеточную терапию, включающую в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем данную Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

(ii) соединение, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем соединение вводят в виде нескольких

прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно, причем введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

10. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых не чаще чем один раз в неделю, причем каждая доза составляет от 0,1 мг или приблизительно 0,1 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно, и причем введение соединения начинают между днем 1 и днем 29 включительно комбинированной терапии.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором введение соединения начинают между днем 1 и днем 22 включительно.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором введение соединения начинают между днем 1 и днем 15 включительно.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором введение соединения начинают между днем 8 и днем 15 включительно.

14. Способ по любому из пп. 1-12, в котором введение соединения начинают в день 1 или приблизительно в день 1.

15. Способ по любому из пп. 1-13, в котором введение соединения начинают в день 8 или приблизительно в день 8.

16. Способ по любому из пп. 1-13, в котором введение соединения начинают в день 15 или приблизительно в день 15.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором все дозы из нескольких прерывистых доз являются одинаковыми.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором соединение вводят один раз в неделю.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором соединение вводят один раз каждые 7 дней (Q7D).

20. Способ по любому из пп. 1-17, в котором соединение вводят один раз каждые две недели.

21. Способ по любому из пп. 1-17 и 20, в котором соединение вводят один раз каждые 14 дней (Q14D).

22. Способ по любому из пп. 1-21, в котором соединение вводят в течение по меньшей мере 12 недель после введения Т-клеточной терапии.

23. Способ по любому из пп. 1-21, в котором соединение вводят в течение вплоть до 12 недель после введения Т-клеточной терапии.

24. Способ по любому из пп. 1-12, 14, 17-19, 22 и 23, в котором соединение вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

25. Способ по любому из пп. 1-13, 15, 17-19, 22 и 23, в котором соединение вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

26. Способ по любому из пп. 1-13, 16-19, 22 и 23, в котором соединение вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85.

27. Способ по любому из пп. 1-13, 15, 17 и 20-23, в котором соединение вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78.

28. Способ по любому из пп. 1-27, в котором доза соединения составляет от 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг до 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг включительно.

29. Способ по любому из пп. 1-28, в котором доза соединения составляет 0,6 мг или приблизительно 0,6 мг.

30. Способ по любому из пп. 1-27, в котором доза соединения составляет от 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг до 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг включительно.

31. Способ по любому из пп. 1-28 и 30, в котором доза соединения составляет 0,4 мг или приблизительно 0,4 мг.

32. Способ по любому из пп. 1-28 и 30, в котором доза соединения составляет менее чем 0,4 мг.

33. Способ по любому из пп. 1-28, 30 и 32, в котором доза соединения составляет 0,3 мг или приблизительно 0,3 мг.

34. Способ по любому из пп. 1-28, 30 и 32, в котором доза соединения составляет 0,2 мг или приблизительно 0,2 мг.

35. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

36. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

37. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

38. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки,

экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,4 мг.

39. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые 14 дней (Q14D), и вводят в дни 8, 22, 36, 50, 64 и 78, причем каждая доза составляет 0,3 мг.

40. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,2 мг.

41. Способ лечения лимфомы, причем данный способ предусматривает введение субъекту, имеющему рак, который представляет собой лимфому, соединения, которое представляет собой (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион или его фармацевтически приемлемую соль, причем:

соединение вводят в комбинированной терапии с Т-клеточной терапией, включающей в себя дозу сконструированных клеток, содержащую Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), который связывает кластер дифференцировки 19 (CD19), причем Т-клеточную терапию вводят в день 1 комбинированной терапии; и

соединение вводят в виде нескольких прерывистых доз, вводимых один раз каждые семь дней (Q7D), и вводят в дни 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85, причем каждая доза составляет 0,6 мг.

42. Способ по любому из пп. 1-41, в котором соединение представляет собой или содержит фармацевтически приемлемую соль (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-диона.

43. Способ по любому из пп. 1-41, в котором соединение представляет собой или содержит (S)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-фтор-4-((3-морфолиноазетидин-1-ил)метил)бензил)амино)изоиндолин-1,3-дион.

44. Способ по любому из пп. 1-43, в котором во время начала введения соединения у субъекта не проявляется тяжелая токсичность после введения Т-клеточной терапии.

45. Способ по п. 44, причем:

тяжелая токсичность представляет собой тяжелый синдром высвобождения цитокинов (CRS), необязательно CRS степени 3 или выше, продолжительный CRS степени 3 или выше, CRS степени 4 или CRS степени 5; и/или

тяжелая токсичность представляет собой тяжелую нейротоксичность, необязательно нейротоксичность степени 3 или выше, продолжительную нейротоксичность степени 3 или выше, нейротоксичность степени 4 или нейротоксичность степени 5.

46. Способ по любому из пп. 1-45, в котором введение соединения приостанавливают и/или дозу соединения модифицируют, необязательно снижают, если у субъекта проявляется токсичность после введения соединения, необязательно гематологическая токсичность.

47. Способ по п. 46, причем токсичность представляет собой тяжелую тромбоцитопению, необязательно тромбоцитопению степени 4 или продолжительную тромбоцитопению степени 4.

48. Способ по п. 46, причем токсичность представляет собой тяжелую нейтропению, необязательно нейтропению степени 4, продолжительную нейтропению степени 4, или фебрильную нейтропению, необязательно фебрильную нейтропению степени 3 или выше или продолжительную фебрильную нейтропению степени 3 или выше.

49. Способ по любому из пп. 46-48, в котором введение соединения возобновляют после того, как у субъекта перестает проявляться токсичность.

50. Способ по любому из пп. 1-49, причем рак представляет собой В-клеточное злокачественное новообразование.

51. Способ по любому из пп. 1-50, причем рак представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL), причем, необязательно, NHL включает агрессивную NHL; диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL); DLBCL-NOS, необязательно трансформированную индолентную; EBV-положительную DLBCL-NOS; богатую Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому; первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому (PMBCL); фолликулярную лимфому (FL), необязательно фолликулярную лимфому степени 3В (FL3В); и/или В-клеточную лимфому высокой степени с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6 с гистологией DLBCL (с двумя/тремя генетическими изменениями).

52. Способ по любому из пп. 1-51, в котором CD19 представляет собой человеческий CD19.

53. Способ по любому из пп. 1-52, в котором химерный антигенный рецептор (CAR) содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с CD19, и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM.

54. Способ по п. 53, в котором внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен цепи CD3-дзета (CD3 ζ), необязательно человеческой цепи CD3-дзета.

55. Способ по п. 53 или п. 54, в котором химерный антигенный рецептор (CAR) дополнительно содержит костимулирующую сигнальную область.

56. Способ по п. 55, в котором костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен из CD28 или 4-1BB, необязательно человеческого CD28 или человеческого 4-1BB.

57. Способ по п. 55 или п. 56, в котором костимулирующая сигнальная область содержит сигнальный домен человеческого 4-1BB.

58. Способ по любому из пп. 1-57, в котором CAR содержит scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, которая, необязательно, представляет собой или содержит 4-1BB, необязательно человеческий 4-1BB; и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета, необязательно сигнальный домен CD3-дзета человека; и причем, необязательно, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv.

59. Способ по любому из пп. 1-57, в котором CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; трансмембранный домен; цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен 4-1BB, необязательно сигнальный домен 4-1BB человека; и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой сигнальный домен CD3-дзета, необязательно сигнальный домен CD3-дзета человека; и причем, необязательно, CAR дополнительно содержит спейсер между трансмембранным доменом и scFv.

60. Способ по любому из пп. 1-57, в котором CAR содержит, по порядку, scFv, специфический к CD19; спейсер; трансмембранный домен, цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, который, необязательно, представляет собой сигнальный домен 4-1BB, и цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, который, необязательно, представляет собой или содержит сигнальный домен CD3-дзета.

61. Способ по любому из пп. 58-60, в котором спейсер представляет собой полипептидный спейсер, который содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир или его модифицированный вариант или состоит из него или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее.

62. Способ по любому из пп. 58-61, в котором спейсер содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно шарнир IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него и/или содержит приблизительно 15 аминокислот или менее.

63. Способ по любому из пп. 58-62, в котором спейсер имеет длину 12 аминокислот или приблизительно 12 аминокислот и/или содержит полностью или частично иммуноглобулиновый шарнир, необязательно IgG4, или его модифицированный вариант или состоит из него.

64. Способ по любому из пп. 58-63, в котором спейсер имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1; последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34; или вариант любой из вышеперечисленных, характеризующийся идентичностью последовательности с ними по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, или состоит из них.

65. Способ по любому из пп. 58-64, в котором цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, содержит последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 12, или ее вариант, характеризующийся идентичностью последовательности с ней по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

66. Способ по любому из пп. 58-65, в котором цитоплазматический сигнальный домен, происходящий от первичной сигнальной содержащей ITAM молекулы, содержит последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 13-15 или ее вариант, характеризующийся идентичностью последовательности с ней по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

67. Способ по любому из пп. 58-66, в котором scFv содержит:

последовательность CDRL1 RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35), последовательность CDRL2 SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) и/или последовательность CDRL3 GNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37); и/или

последовательность CDRH1 DYGVVS (SEQ ID NO: 38), последовательность CDRH2 VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) и/или последовательность CDRH3 YAMDYWG (SEQ ID NO: 40).

68. Способ по любому из пп. 58-67, в котором scFv содержит:

вариабельную область тяжелой цепи из FMC63 и вариабельную область легкой цепи из FMC63; и/или

последовательность CDRL1 из FMC63, последовательность CDRL2 из FMC63, последовательность CDRL3 из FMC63, последовательность CDRH1 из FMC63, последовательность CDRH2 из FMC63 и последовательность CDRH3 из FMC63; и

причем, необязательно, scFv содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 41, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 42.

69. Способ по любому из пп. 58-68, в котором scFv имеет последовательность аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 43.

70. Способ по любому из пп. 1-69, в котором доза сконструированных клеток содержит от или от приблизительно 1×10^5 до 5×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^6 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 5×10^6 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, от 1×10^7 до $2,5 \times 10^8$ всех CAR-экспрессирующих Т-клеток или от 5×10^7 до 1×10^8 всех CAR-экспрессирующих Т-клеток, все включительно.

71. Способ по любому из пп. 1-70, в котором доза сконструированных клеток содержит по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^5$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^5 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^6$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^6 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^7$ CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^7 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^8 CAR-экспрессирующих клеток, по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно $2,5 \times 10^8$ CAR-экспрессирующих клеток или по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 5×10^8 CAR-экспрессирующих клеток.

72. Способ по любому из пп. 1-71, в котором доза сконструированных клеток содержит 1×10^8 или приблизительно 1×10^8 CAR-экспрессирующих Т-клеток.

73. Способ по любому из пп. 1-72, в котором дозу сконструированных клеток вводят парентерально, необязательно внутривенно.

74. Способ по любому из пп. 1-73, в котором Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки, полученные от субъекта.

75. Способ по любому из пп. 1-74, в котором Т-клетки являются аутологичными для субъекта.

76. Способ по любому из пп. 1-73, в котором Т-клетки являются аллогенными для субъекта.

77. Способ по любому из пп. 1-76, в котором доза сконструированных клеток содержит CD4+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CAR, и введение данной дозы предусматривает введение нескольких отдельных композиций, причем упомянутые несколько отдельных композиций содержат первую

композицию, содержащую один тип клеток из CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток, и вторую композицию, содержащую другой тип клеток из CD4+ Т-клеток и CD8+ Т-клеток.

78. Способ по п. 77, в котором:

первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом от 0 до 12 часов, с интервалом от 0 до 6 часов или с интервалом от 0 до 2 часов или в котором введение первой композиции и введение второй композиции осуществляют в один и тот же день, осуществляют с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 12 часов, с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 6 часов или с интервалом от приблизительно 0 до приблизительно 2 часов; и/или

начало введения первой композиции и начало введения второй композиции осуществляют с интервалом от приблизительно 1 минуты до приблизительно 1 часа или с интервалом от приблизительно 5 минут до приблизительно 30 минут.

79. Способ по п. 77 или п. 78, в котором первую композицию и вторую композицию вводят с интервалом не более чем 2 часа, не более чем 1 час, не более чем 30 минут, не более чем 15 минут, не более чем 10 минут или не более чем 5 минут.

80. Способ по любому из пп. 77-79, в котором первая композиция содержит CD4+ Т-клетки.

81. Способ по любому из пп. 77-79, в котором первая композиция содержит CD8+ Т-клетки.

82. Способ по любому из пп. 77-81, в котором первую композицию вводят до второй композиции.

83. Способ по любому из пп. 1-82, в котором перед введением Т-клеточной терапии субъекта подвергают предварительному кондиционированию с помощью лимфодеплецирующей терапии, включающей в себя введение флударабина и/или циклофосфида.

84. Способ по любому из пп. 1-82, дополнительно предусматривающий непосредственно перед введением Т-клеточной терапии введение субъекту

лимфодеплецирующей терапии, включающей в себя введение флударабина и/или циклофосфамида.

85. Способ по п. 83 или п. 84, в котором лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве приблизительно 200-400 мг/м² включительно, необязательно 300 мг/м² или приблизительно 300 мг/м², и/или флударабина в количестве приблизительно 20-40 мг/м², необязательно 30 мг/м², ежедневно в течение 2-4 дней, необязательно в течение 3 дней, или в котором лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве приблизительно 500 мг/м².

86. Способ по любому из пп. 83-85, в котором:

лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве 300 мг/м² или приблизительно 300 мг/м² и флударабина в количестве приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней; и/или

лимфодеплецирующая терапия включает в себя введение циклофосфамида в количестве 500 мг/м² или приблизительно 500 мг/м² и флударабина в количестве приблизительно 30 мг/м² ежедневно в течение 3 дней.

87. Способ по любому из пп. 1-86, в котором субъект является человеком.

88. Способ по любому из пп. 1-87, причем:

по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают полного ответа (CR), который является устойчивым или является устойчивым по меньшей мере у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR, в течение 6 месяцев или более 6 месяцев или 9 месяцев или более 9 месяцев; и/или

по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших CR к шести месяцам, сохраняют ответ, сохраняют CR и/или выживают или выживают без прогрессирования в течение 3 месяцев или более 3 месяцев, и/или 6 месяцев или более 6 месяцев, и/или девяти месяцев или более девяти месяцев; и/или

по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% субъектов, получавших лечение в соответствии с данным способом, достигают объективного ответа (OR), причем, необязательно, OR является устойчивым или является устойчивым по

меньшей мере у 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR, в течение 6 месяцев или более 6 месяцев или 9 месяцев или более 9 месяцев; и/или

по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% субъектов, достигших OR к шести месяцам, сохраняют ответ или выживание в течение 3 месяцев или более 3 месяцев и/или 6 месяцев или более 6 месяцев.

89. Способ по любому из пп. 1-88, причем во время введения дозы сконструированных клеток или непосредственно перед этим у субъекта наблюдается рецидив после ремиссии после лечения с помощью одной или нескольких предшествующих терапий лимфомы, необязательно одной, двух или трех предшествующих терапий, отличных от еще одной дозы сконструированных клеток, экспрессирующих CAR, или он становится рефрактерным к этим терапиям.

90. Способ по любому из пп. 1-89, причем во время введения дозы сконструированных клеток или перед этим:

у субъекта выявлена или была идентифицирована лимфома с двумя/тремя генетическими изменениями;

у субъекта выявлена или была идентифицирована хеморефрактерная лимфома, необязательно хеморефрактерная DLBCL; и/или

субъект не достиг полной ремиссии (CR) в ответ на предшествующую терапию.

91. Способ по любому из пп. 1-90, в котором введение соединения:

обращает фенотип истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта;

предотвращает, ингибирует или задерживает возникновение фенотипа истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта;

снижает уровень или степень фенотипа истощения в CAR-экспрессирующих Т-клетках у субъекта; или

снижает у субъекта процентную долю или общее количество CAR-экспрессирующих Т-клеток, которые характеризуются фенотипом истощения.

92. Способ по любому из пп. 1-91, в котором начало введения соединения осуществляют после введения Т-клеточной терапии, и после введения соединения или его начала у субъекта наблюдается возобновление или восстановление антигенспецифической или опухолеспецифической активности или функции CAR-экспрессирующих Т-клеток у упомянутого субъекта, причем, необязательно, упомянутые возобновление,

восстановление и/или начало введения упомянутого соединения происходит в момент времени после того, как CAR-экспрессирующие Т-клетки у субъекта или в крови субъекта продемонстрировали истощенный фенотип.

93. Способ по любому из пп. 1-92, в котором введение соединения предусматривает введение в количестве, с частотой и/или с продолжительностью, эффективными для:

(а) обеспечения повышения у субъекта антигенспецифической или управляемой антигенным рецептором активности наивных или неистощенных Т-клеток, которые, необязательно, содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, после воздействия на Т-клетки антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения; или

(b) предотвращения, ингибирования или задержки у субъекта возникновения фенотипа истощения в наивных или неистощенных Т-клетках, которые, необязательно, содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, после воздействия на Т-клетки антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения; или

(с) обращения у субъекта фенотипа истощения в истощенных Т-клетках, необязательно содержащих Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, по сравнению с отсутствием упомянутого введения упомянутого соединения.

94. Способ по п. 93, в котором введение соединения предусматривает введение в количестве, с частотой и/или с продолжительностью, эффективными (i) для обеспечения упомянутого повышения активности и (ii) для предотвращения, ингибирования или задержки упомянутого возникновения упомянутого фенотипа истощения и/или обращения упомянутого фенотипа истощения.

95. Способ по пп. 93 или п. 94, в котором Т-клетки у субъекта содержат Т-клетки, экспрессирующие упомянутый CAR, и/или воздействие представляет собой воздействие антигена CD19.

96. Способ по любому из пп. 91-95, в котором фенотип истощения применительно к Т-клетке или популяции Т-клеток, содержит:

повышение уровня или степени поверхностной экспрессии на Т-клетке или Т-клетках, или процентной доли упомянутой популяции Т-клеток, демонстрирующих поверхностную экспрессию, одного или нескольких маркеров истощения, необязательно 2, 3, 4, 5 или 6 маркеров истощения, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях; или

снижение уровня или степени активности, проявляемой упомянутыми Т-клетками или популяцией Т-клеток при воздействии антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства, по сравнению с эталонной популяцией Т-клеток в тех же условиях.

97. Способ по п. 96, в котором повышение уровня, степени или процентной доли происходит более чем в 1,2 раза или приблизительно в 1,2 раза, в 1,5 раза или приблизительно в 1,5 раза, в 2,0 раза или приблизительно в 2,0 раза, в 3 раза или приблизительно в 3 раза, в 4 раза или приблизительно в 4 раза, в 5 раз или приблизительно в 5 раз, в 6 раз или приблизительно в 6 раз, в 7 раз или приблизительно в 7 раз, в 8 раз или приблизительно в 8 раз, в 9 раз или приблизительно в 9 раз, в 10 раз или приблизительно в 10 раз или более.

98. Способ по п. 96, в котором снижение уровня, степени или процентной доли происходит более чем в 1,2 раза или приблизительно в 1,2 раза, в 1,5 раза или приблизительно в 1,5 раза, в 2,0 раза или приблизительно в 2,0 раза, в 3 раза или приблизительно в 3 раза, в 4 раза или приблизительно в 4 раза, в 5 раз или приблизительно в 5 раз, в 6 раз или приблизительно в 6 раз, в 7 раз или приблизительно в 7 раз, в 8 раз или приблизительно в 8 раз, в 9 раз или приблизительно в 9 раз, в 10 раз или приблизительно в 10 раз или более.

99. Способ по любому из пп. 96-98, в котором эталонная популяция Т-клеток представляет собой популяцию Т-клеток, о которых известно, что они характеризуются неистощенным фенотипом, представляет собой популяцию наивных Т-клеток, представляет собой популяцию центральных Т-клеток памяти или представляет собой популяцию стволовых центральных Т-клеток памяти, необязательно от того же субъекта или того же вида, что и субъект, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения.

100. Способ по любому из пп. 96-99, в котором эталонная популяция Т-клеток (а) представляет собой соответствующую субъекту популяцию, содержащую массу Т-клеток, выделенных из крови субъекта, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения, причем, необязательно, масса Т-клеток не экспрессирует CAR, и/или (b) получена от субъекта, из которого получены Т-клетка или Т-клетки, характеризующиеся фенотипом истощения, до введения дозы Т-клеток, экспрессирующих CAR.

101. Способ по любому из пп. 96-100, в котором эталонная популяция Т-клеток представляет собой композицию, содержащую образец Т-клеток, экспрессирующих CAR, или фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, экспрессирующие CAR, до их введения субъекту, причем, необязательно, композиция представляет собой криоконсервированный образец.

102. Способ по любому из пп. 96-101, в котором один или несколько маркеров истощения представляют собой ингибирующий рецептор.

103. Способ по любому из пп. 96-102, в котором один или несколько маркеров истощения выбраны из PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, 2B4, CD160, CD39, VISTA и TIGIT.

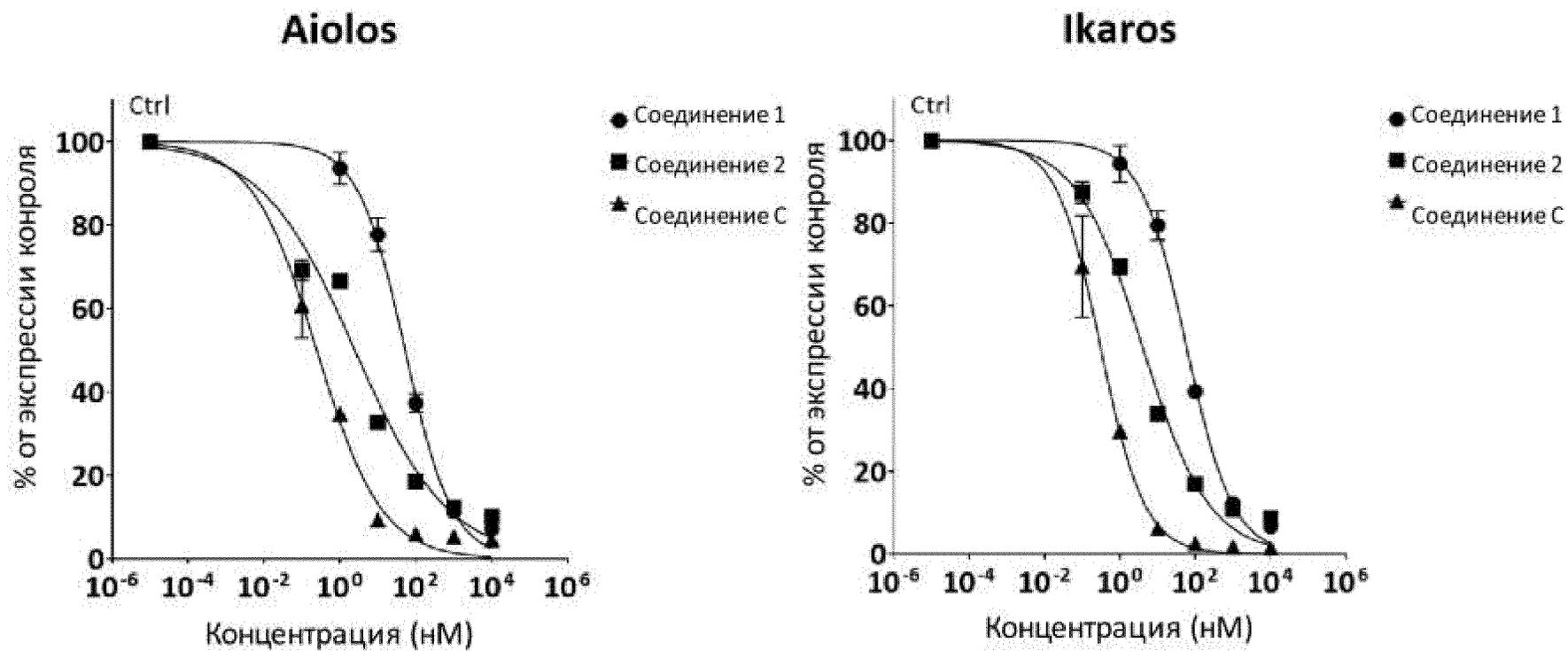
104. Способ по любому из пп. 96-103, в котором активность представляет собой одну или несколько активностей из пролиферации, цитотоксичности или продукции одного воспалительного цитокина или их комбинации, причем, необязательно, один цитокин или их комбинация выбраны из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа.

105. Способ по любому из пп. 96-104, в котором воздействие упомянутого антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства предусматривает инкубацию с антигеном CD19 или специфическим к антигенному рецептору средством, необязательно средством, которое связывает антигенсвязывающий домен CAR.

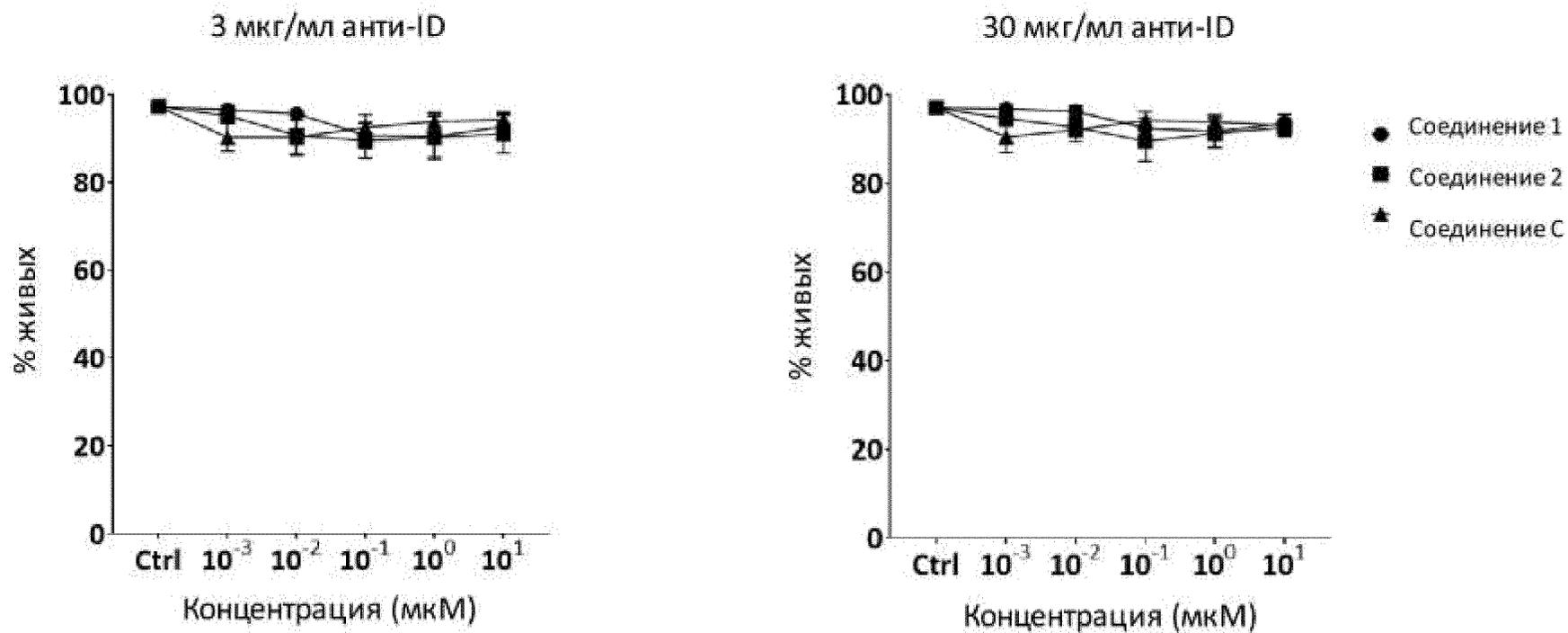
106. Способ по п. 105, в котором воздействие антигена CD19 или специфического к антигенному рецептору средства предусматривает воздействие на Т-клетки

экспрессирующих антиген CD19 клеток-мишеней, необязательно клеток В-клеточного злокачественного новообразования.

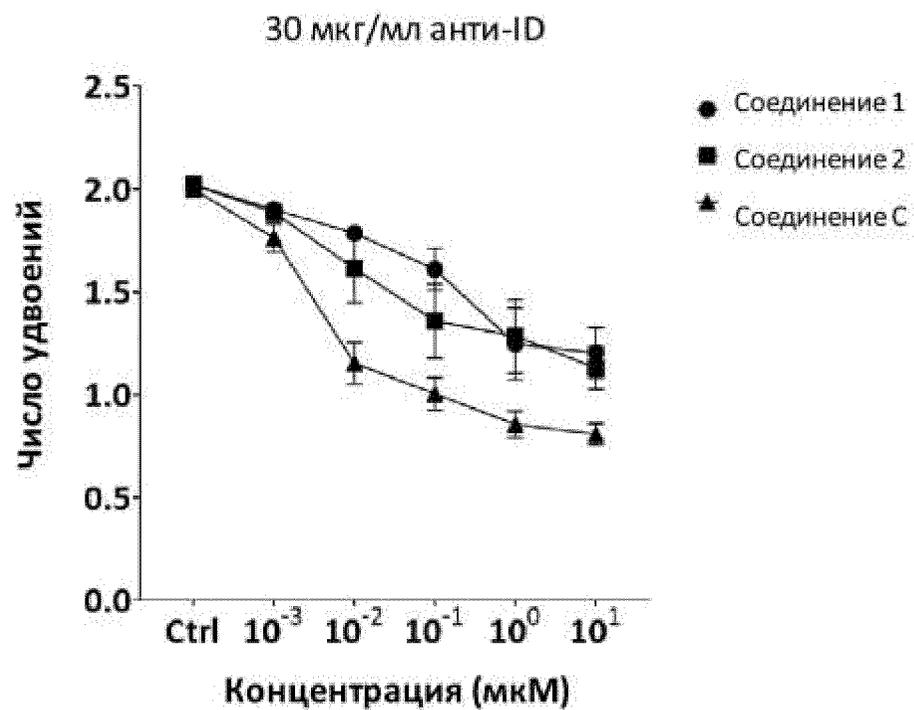
Фиг. 1



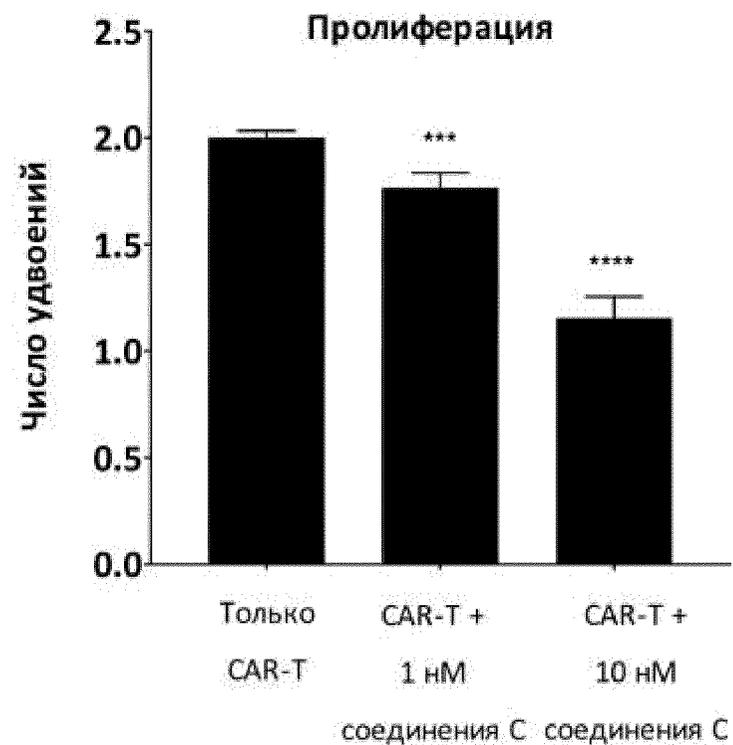
Фиг. 2А



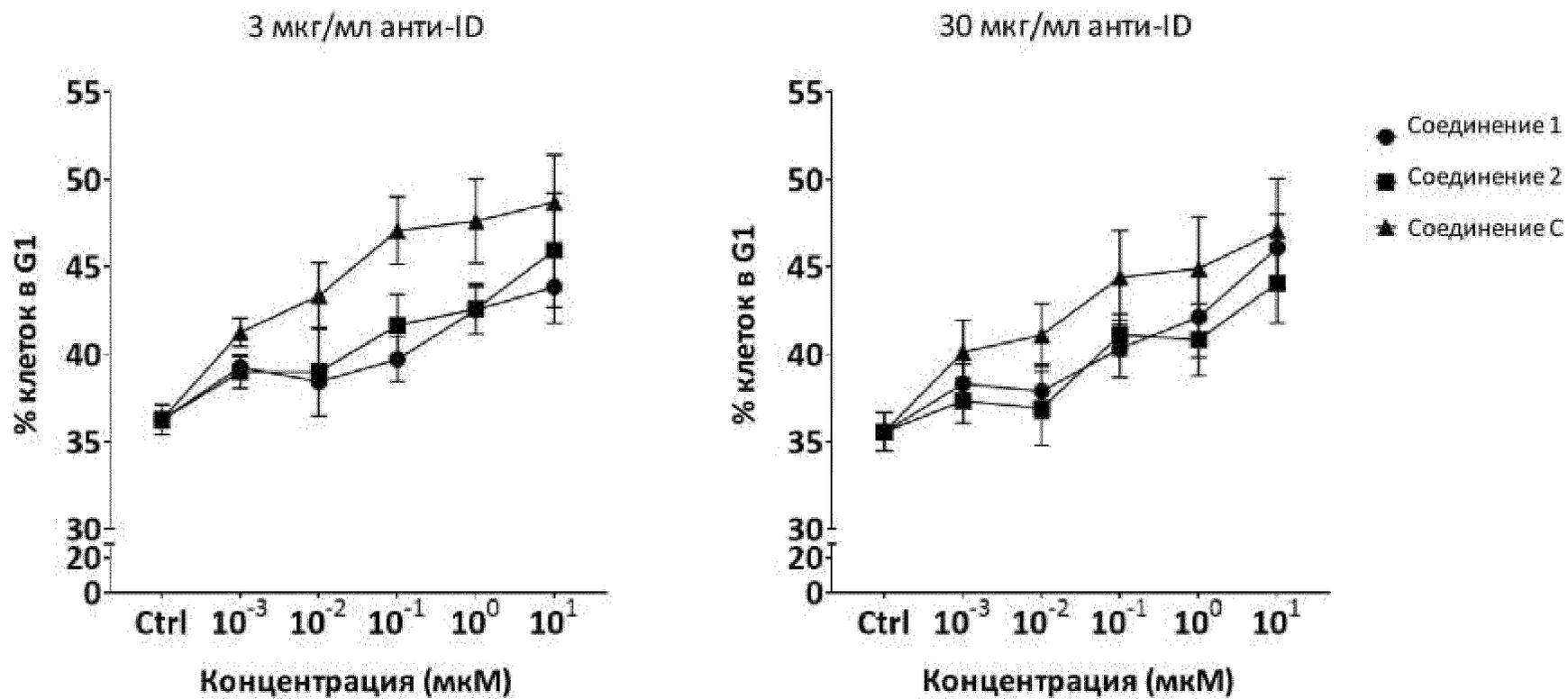
Фиг. 2В



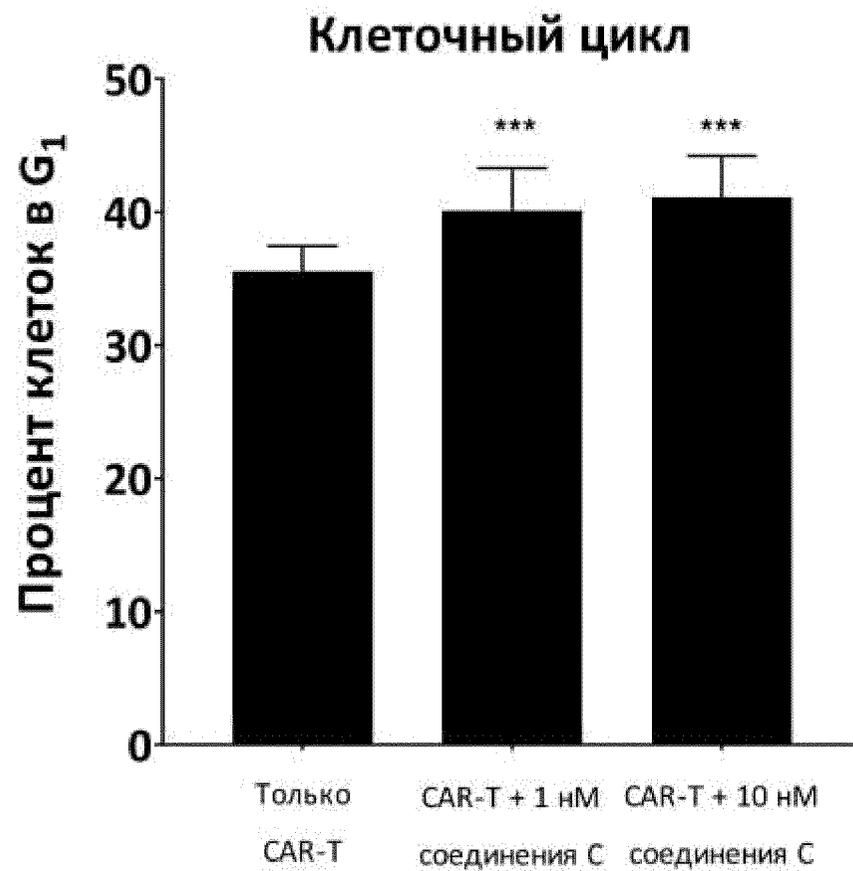
Фиг. 2С



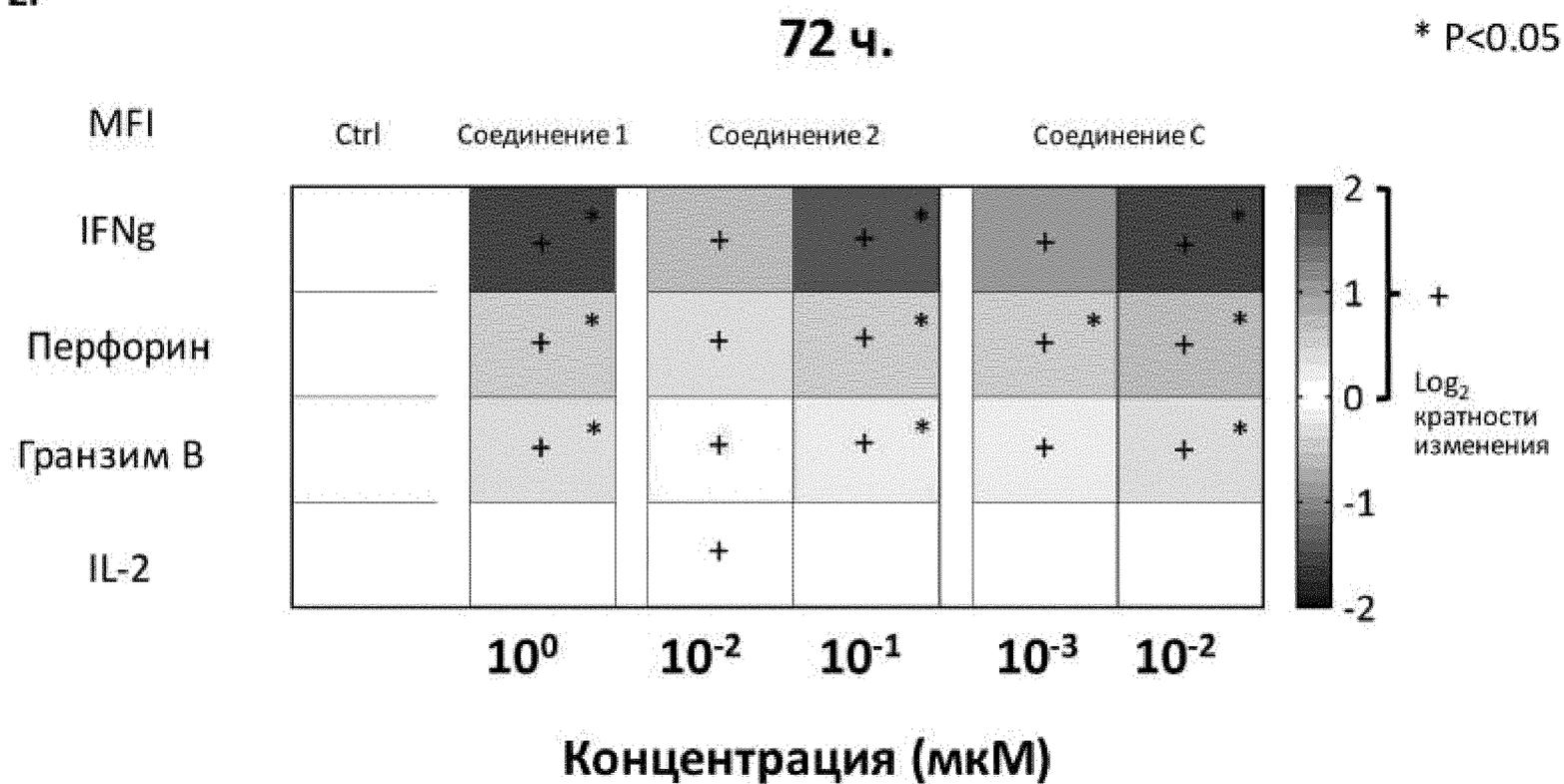
Фиг. 2D



Фиг. 2Е

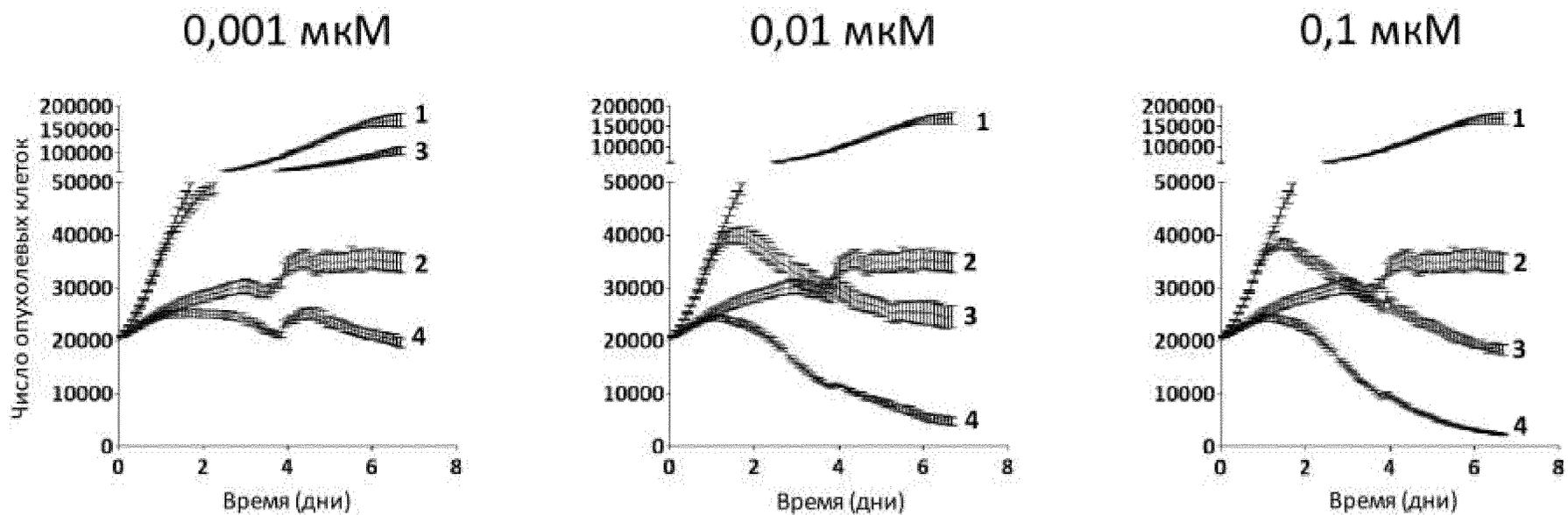


Фиг. 2F



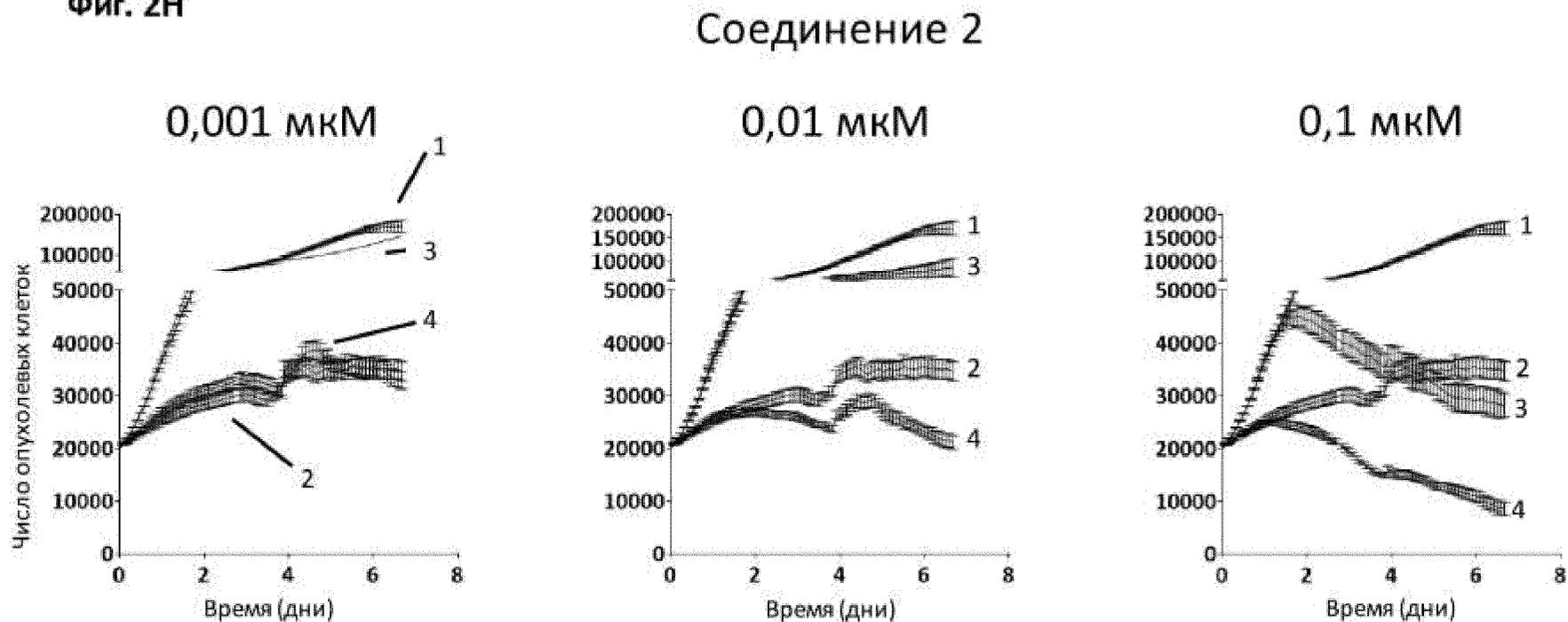
Фиг. 2G

Соединение С

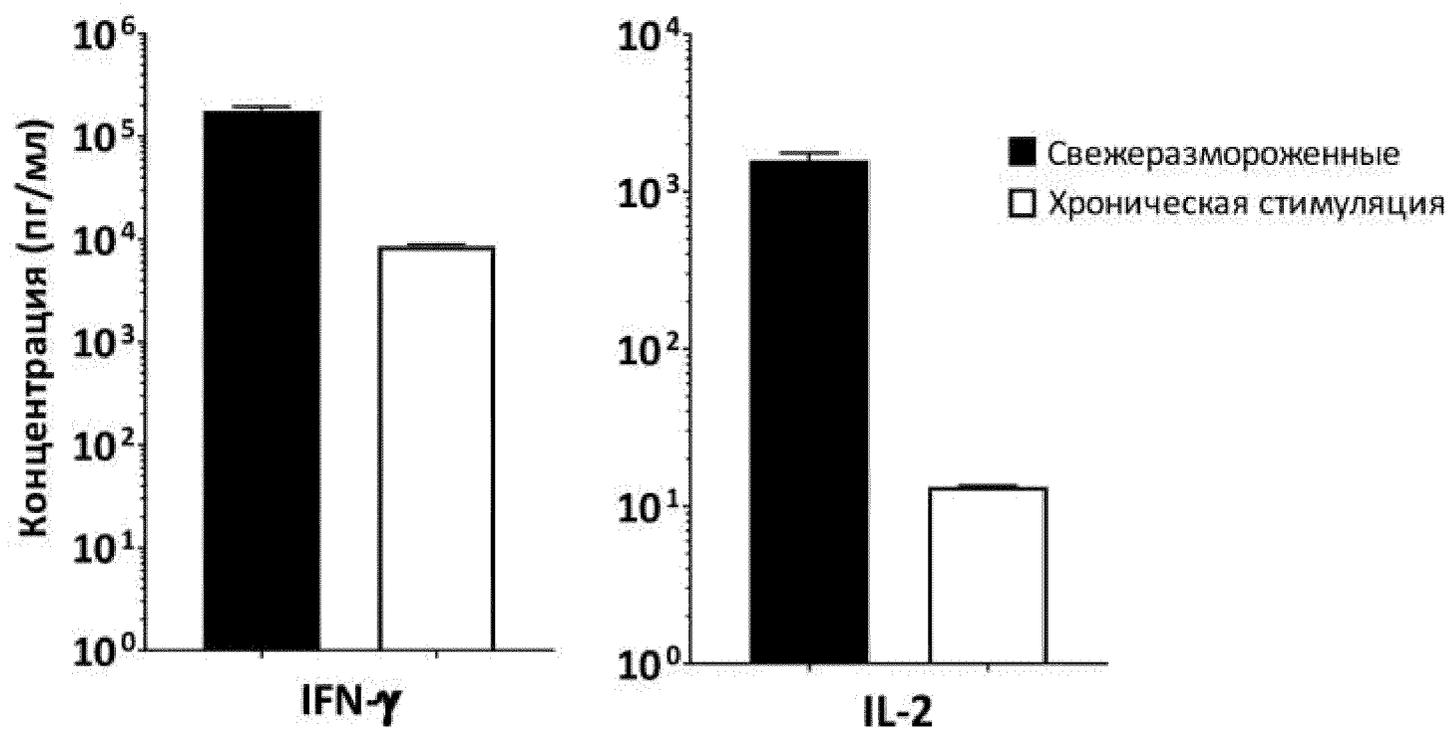


1 - только опухоль, 2 - только CAR-T, 3 - только соединение С, 4 - CAR-T + соединение С

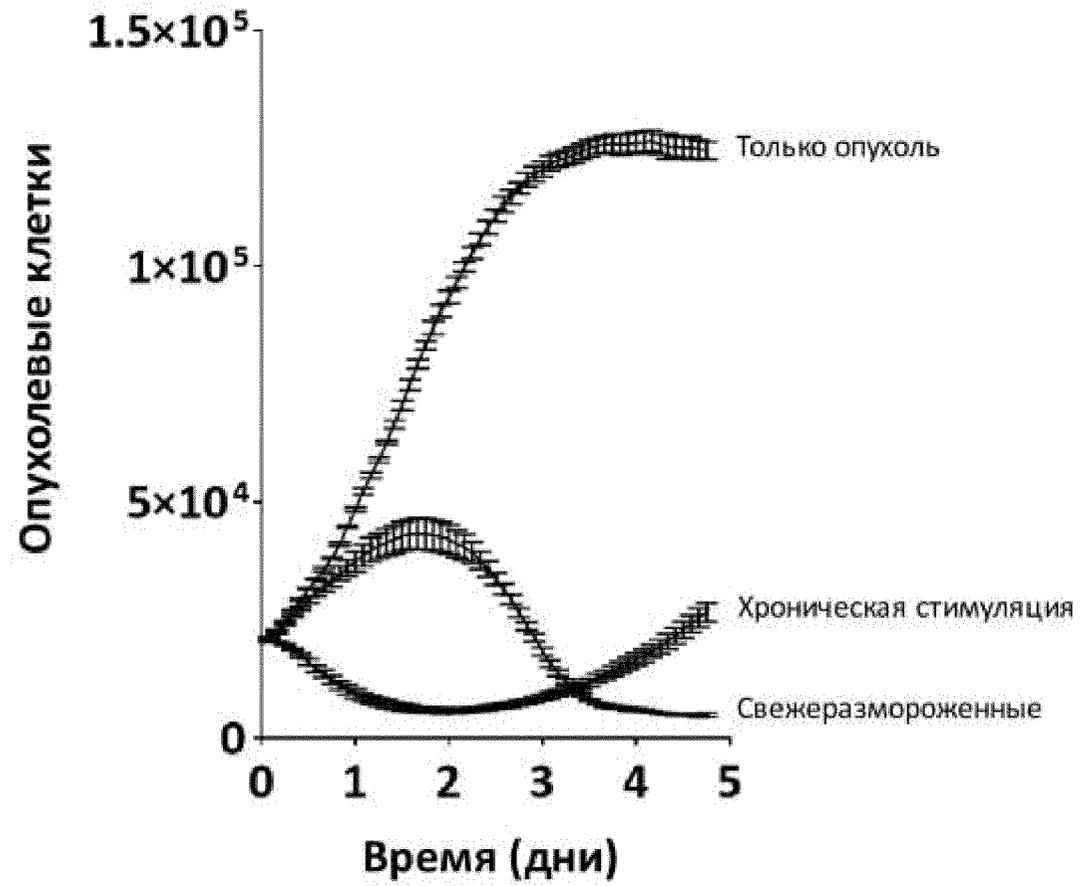
Фиг. 2Н



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С

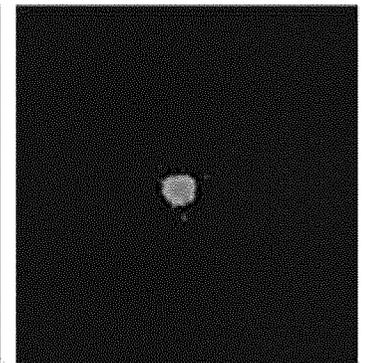
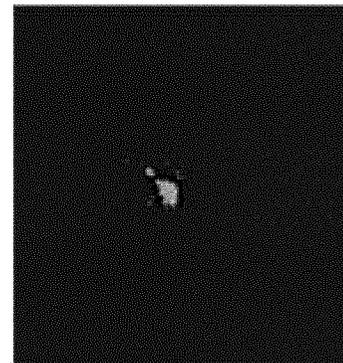
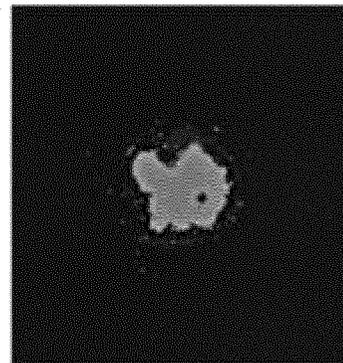
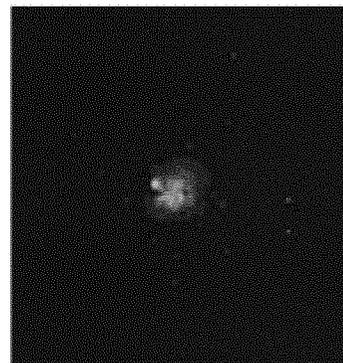
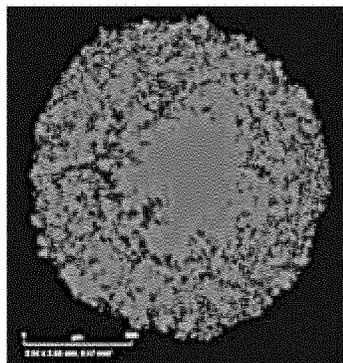
Только опухоль
Granta-519

+ свежеразмороженные
CAR-T

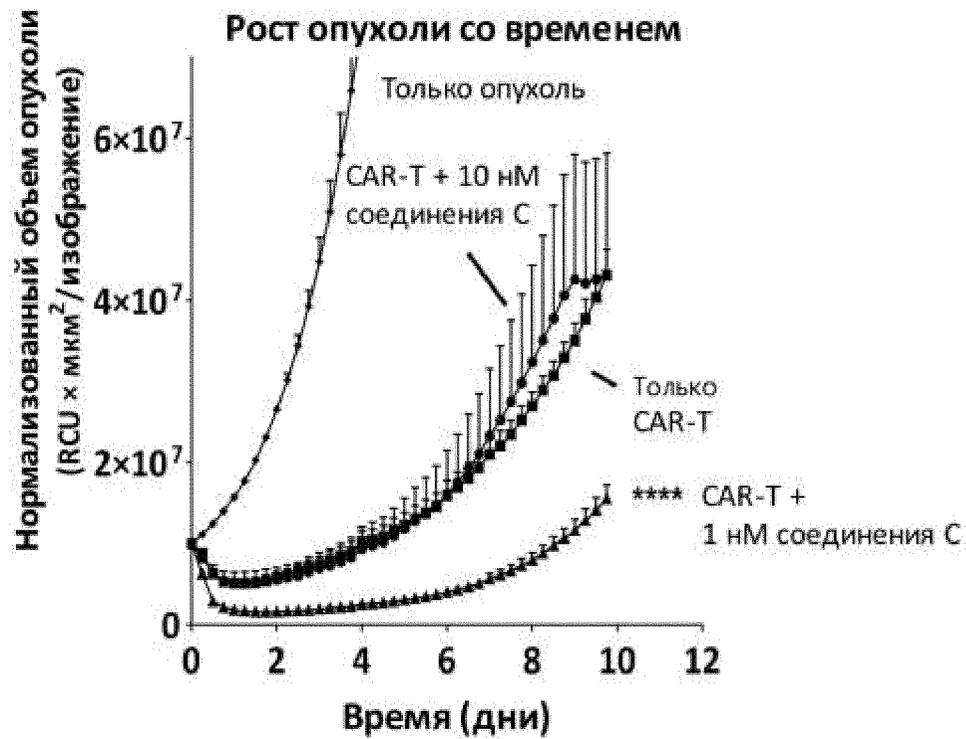
+ хроническая стим.
CAR-T

+ хронич. стим. CAR-T
+ соединение С 1 нМ

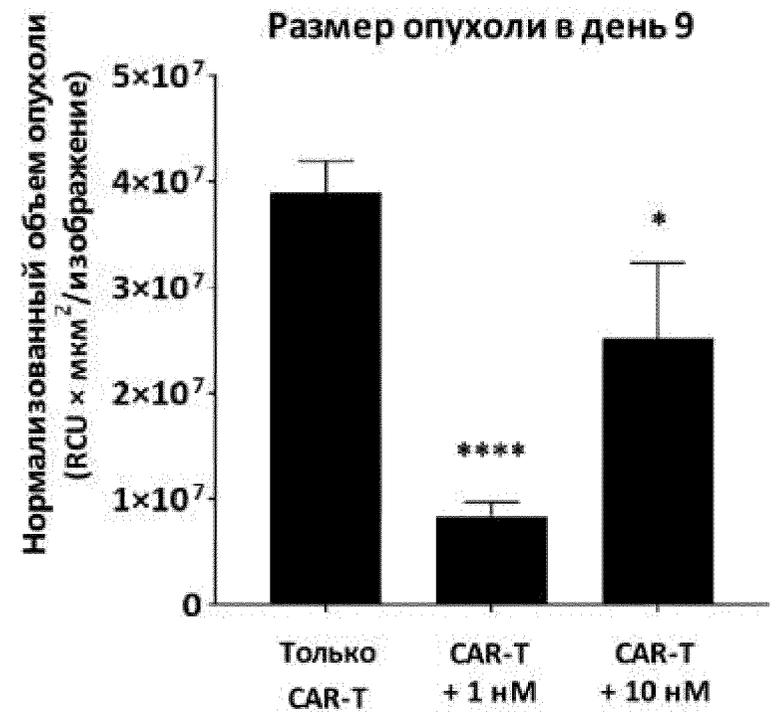
+ хронич. стим. CAR-T
+ соединение С 10 нМ



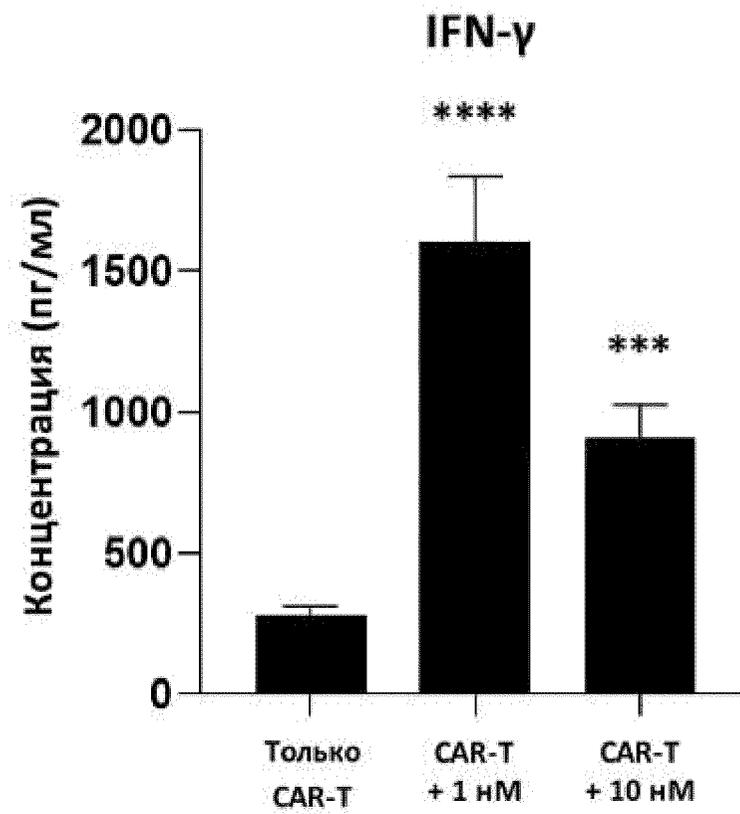
Фиг. 3D



Фиг. 3E

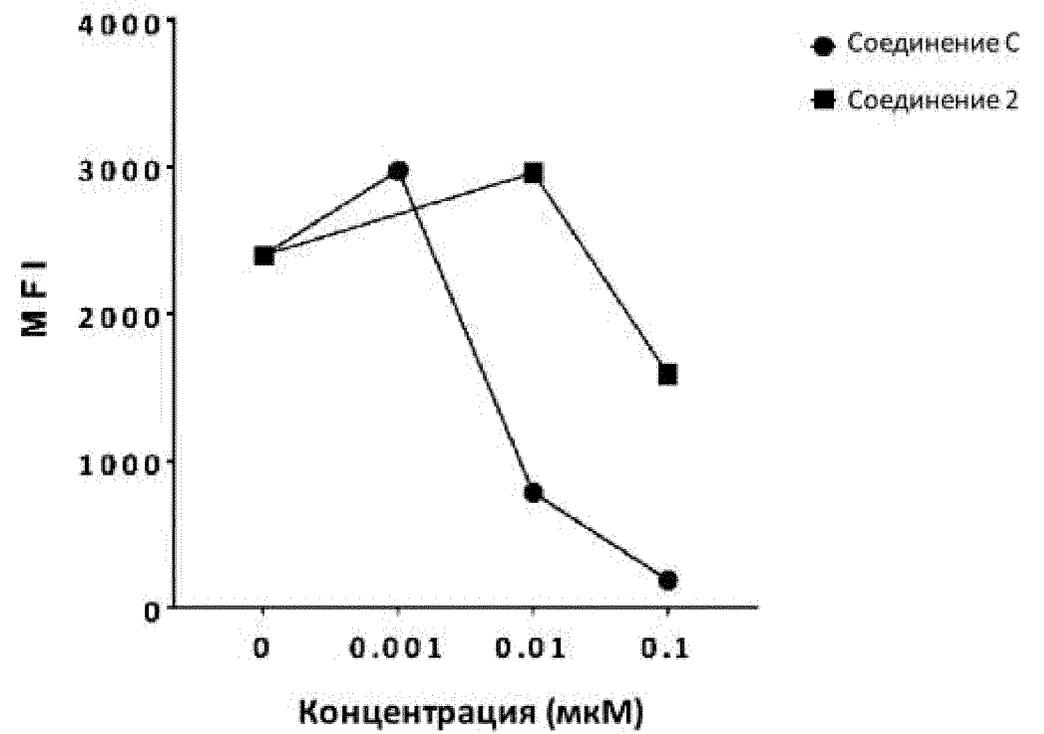


Фиг. 3F

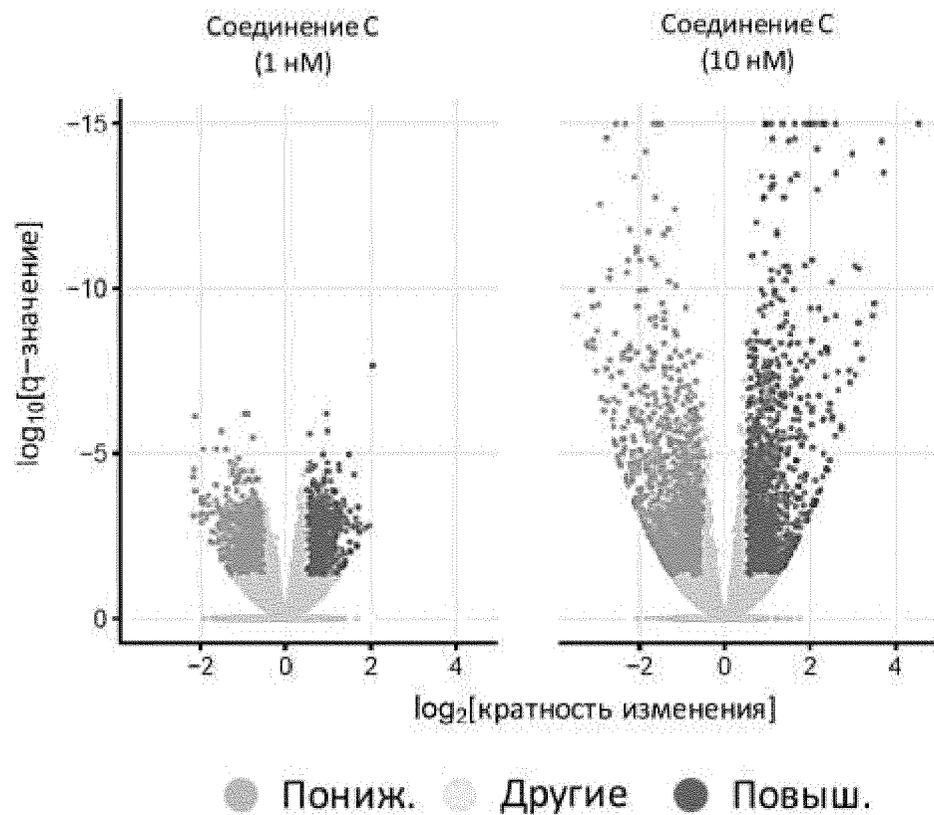


Фиг. 3G

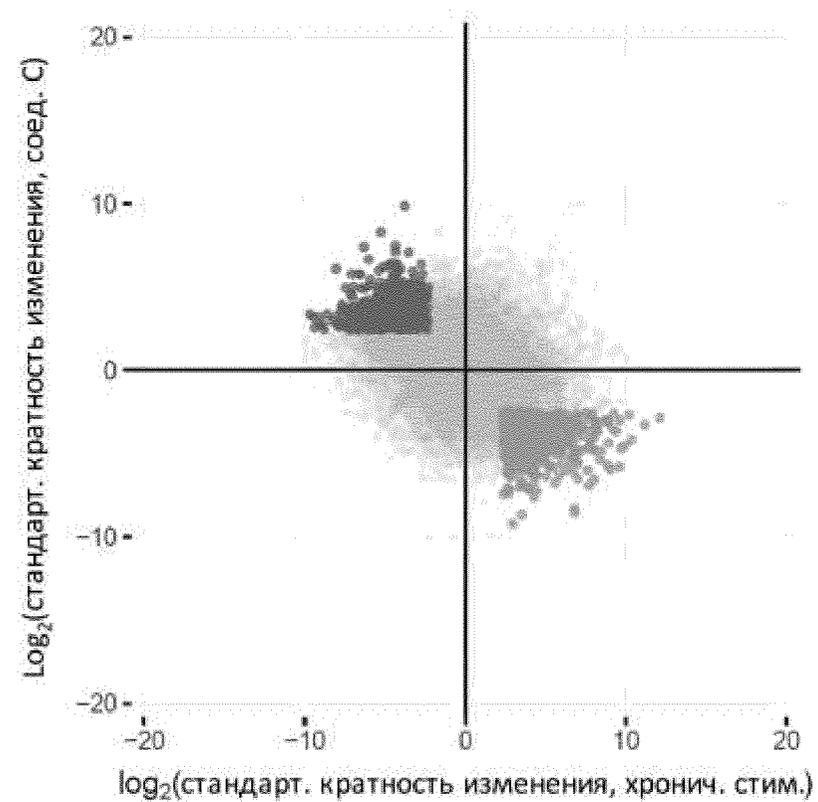
Экспрессия Ikaros после хронической стимуляции



Фиг. 3H

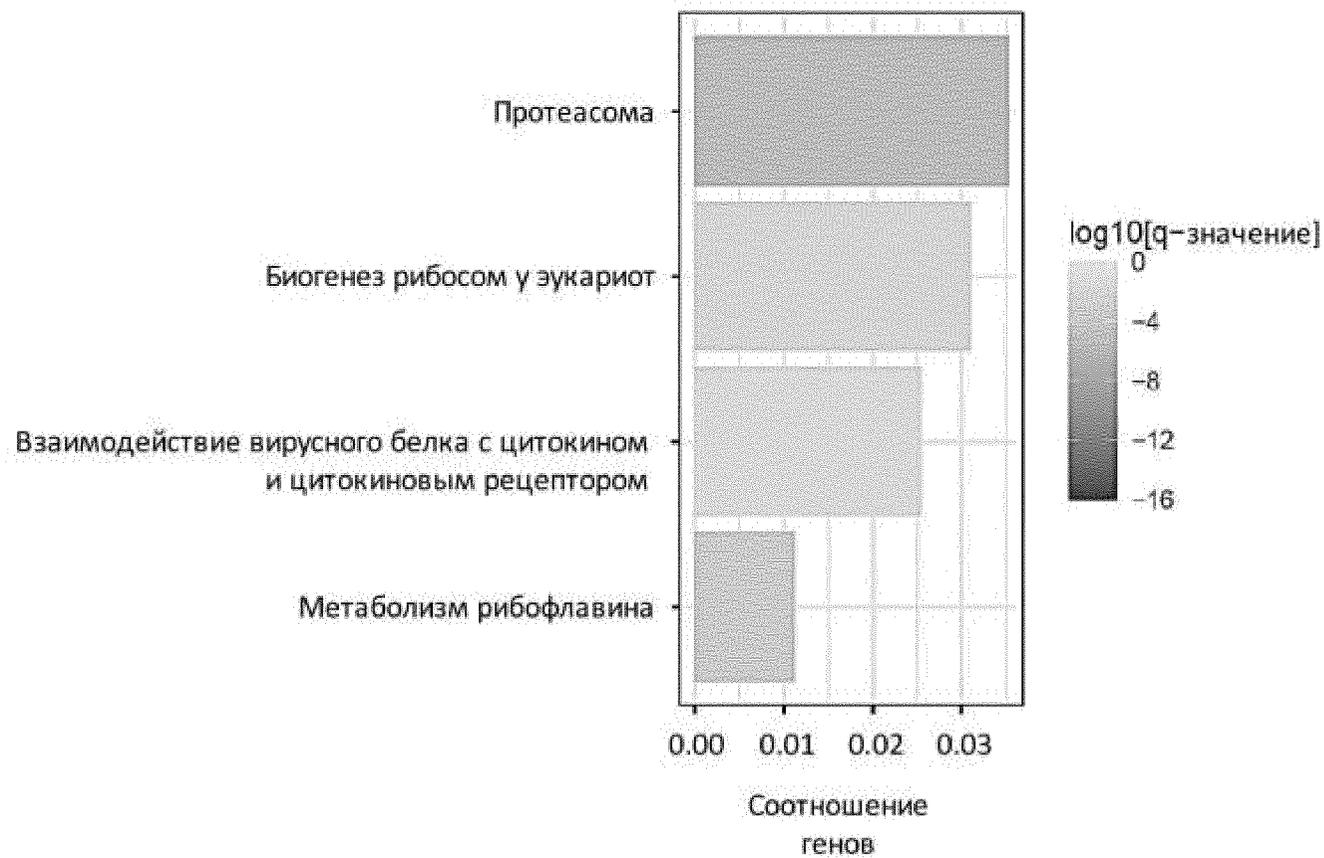


Фиг. 3I

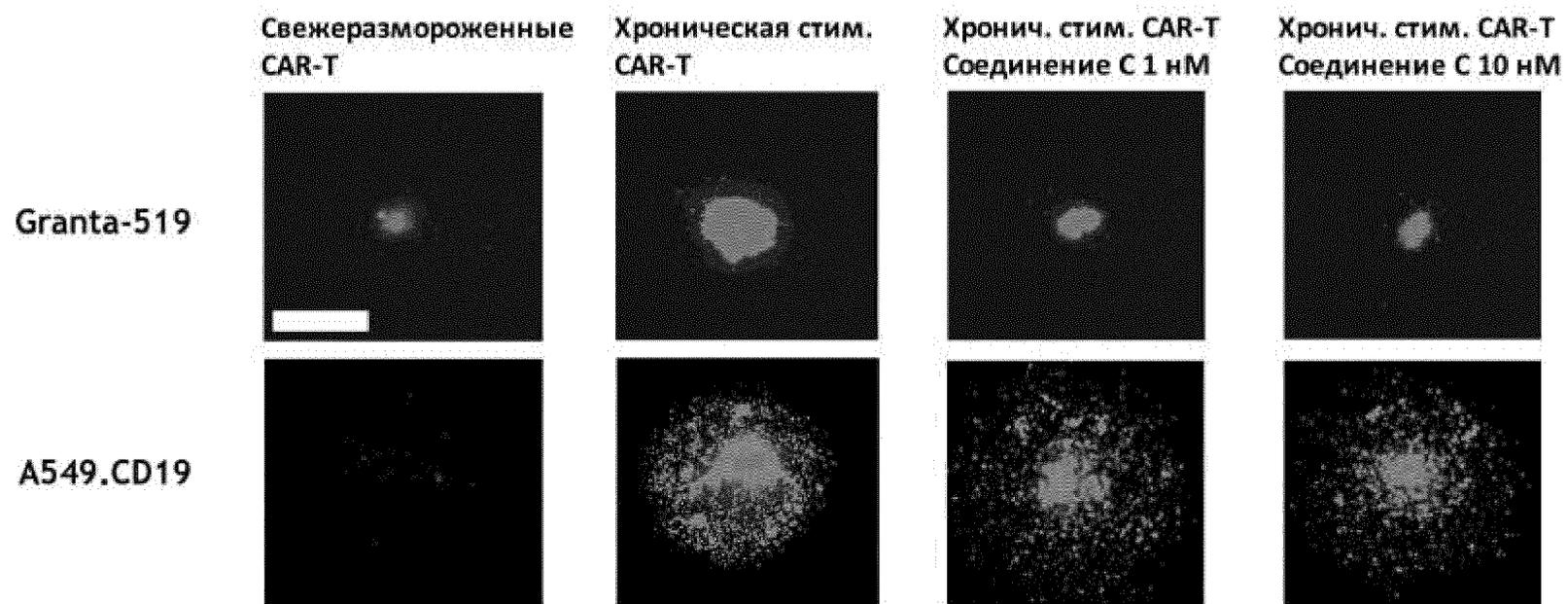


Фиг. 3J

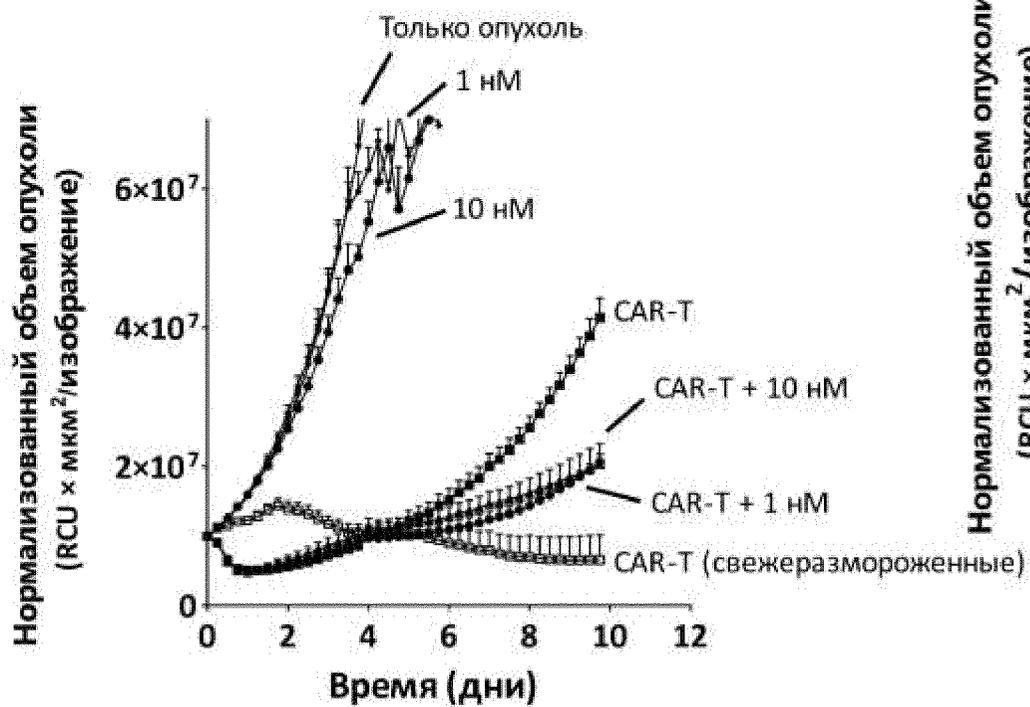
Путь по KEGG



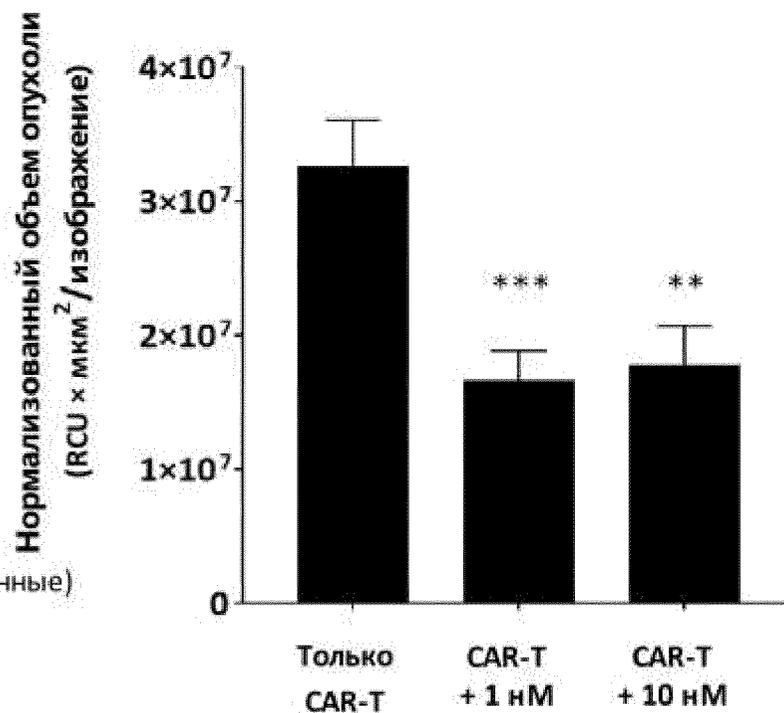
Фиг. 4А



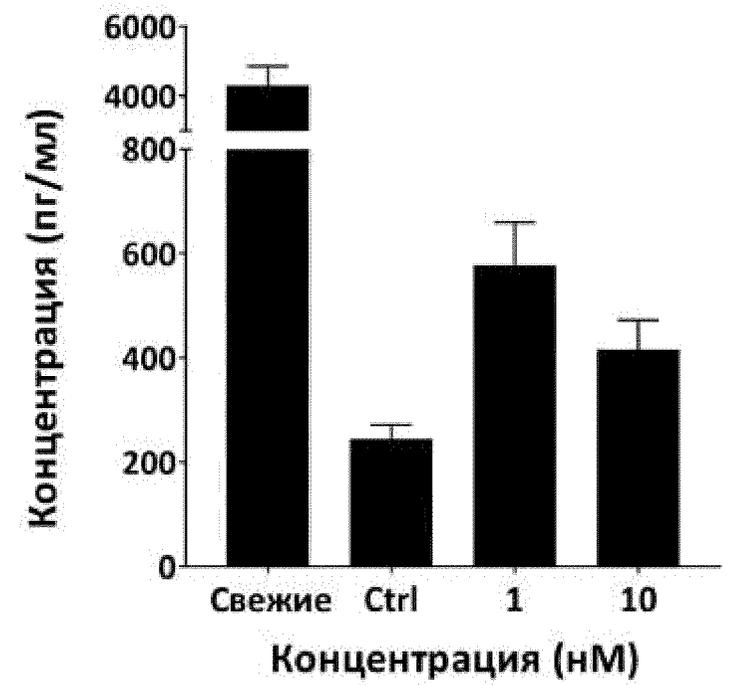
Фиг. 4В



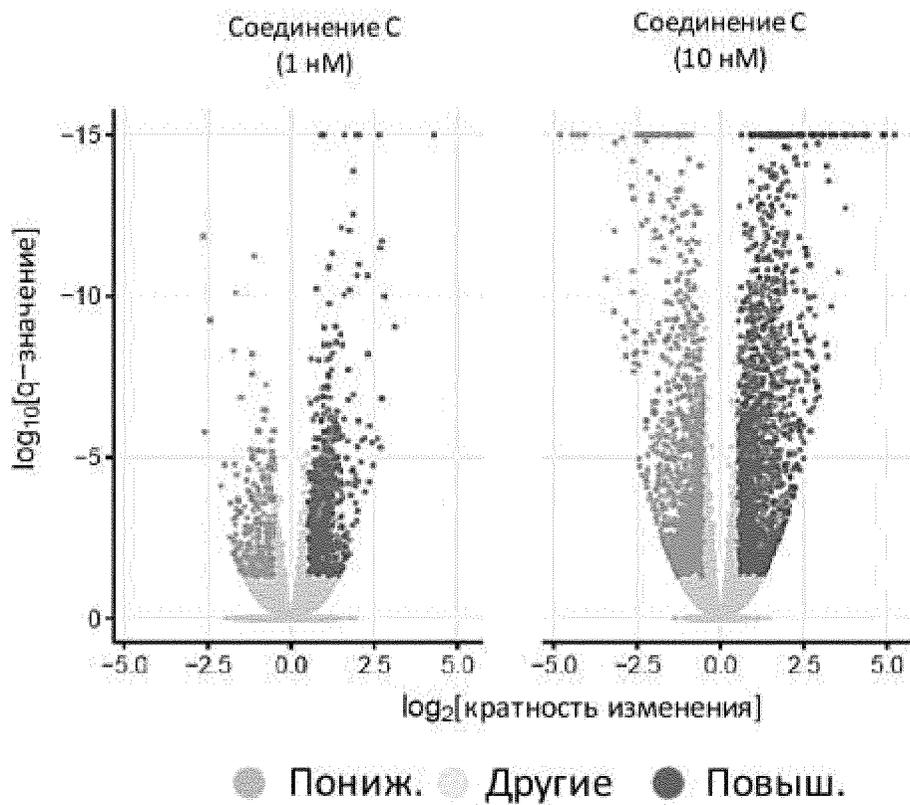
Фиг. 4С



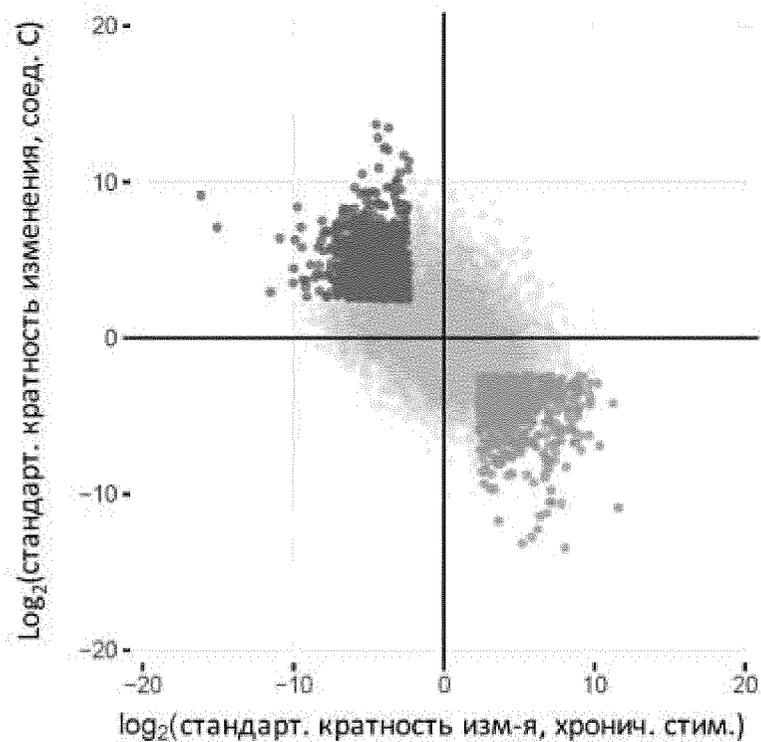
Фиг. 4D



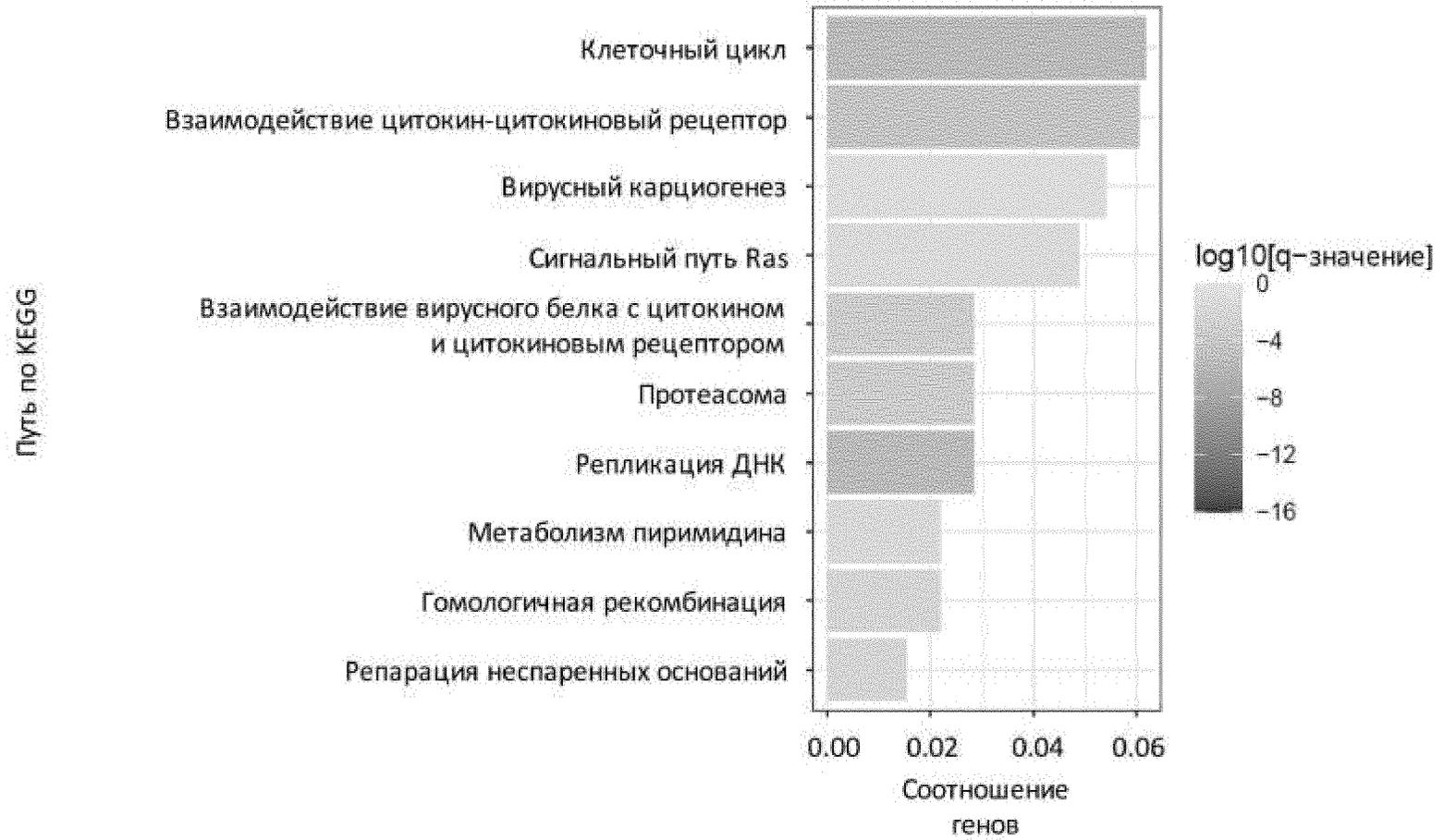
Фиг. 4Е



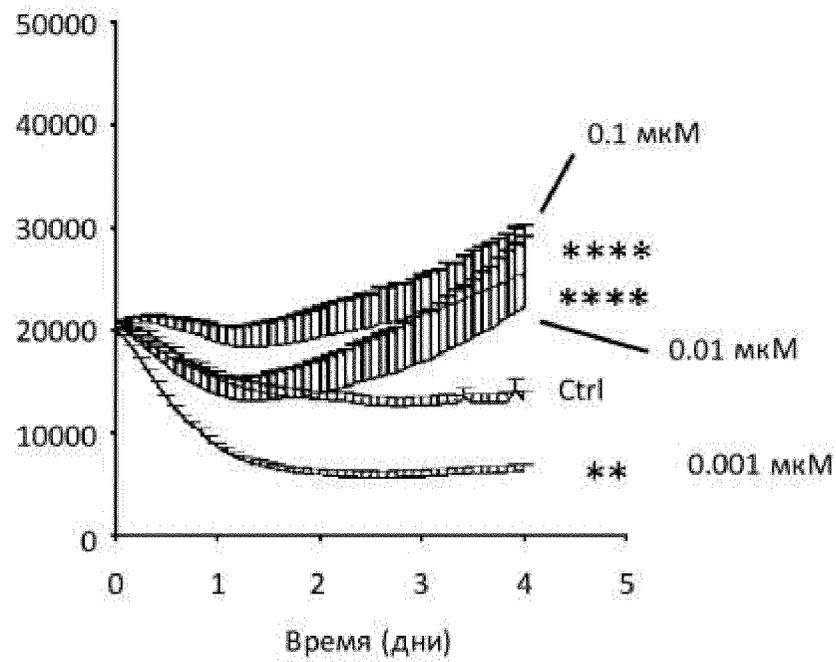
Фиг. 4F



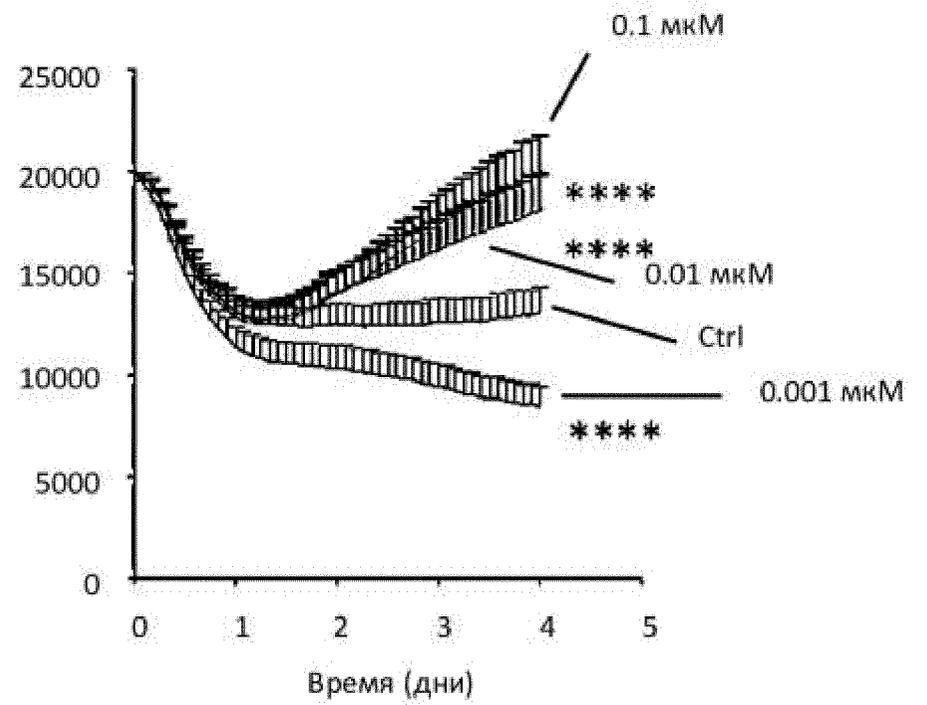
Фиг. 4G



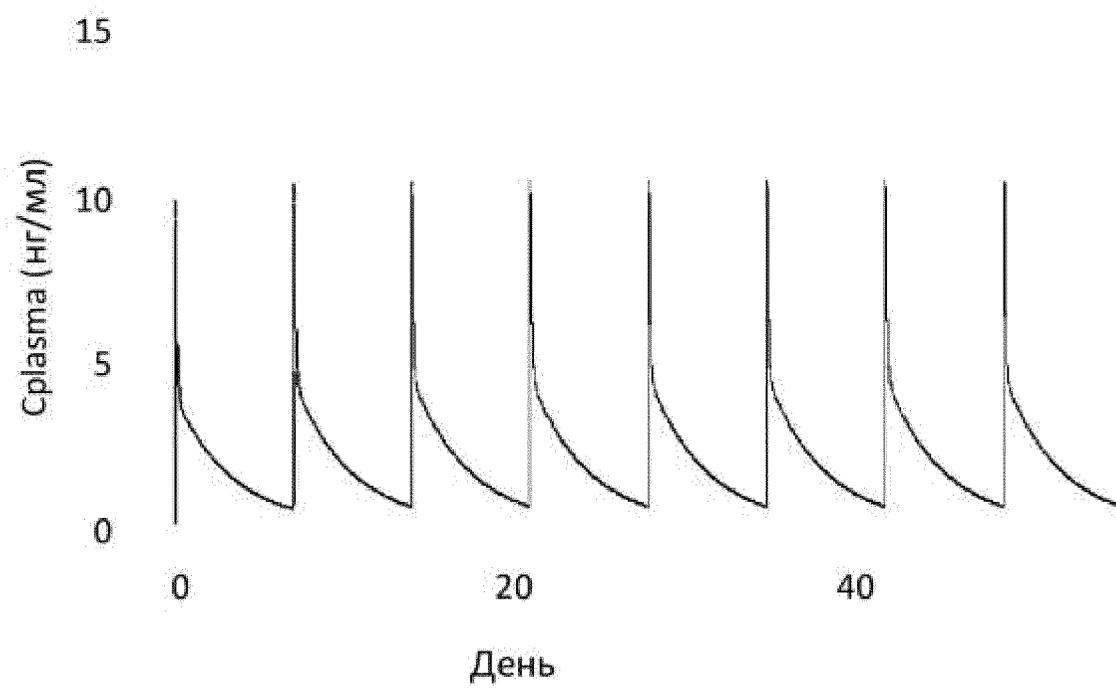
Фиг. 5А



Фиг. 5В

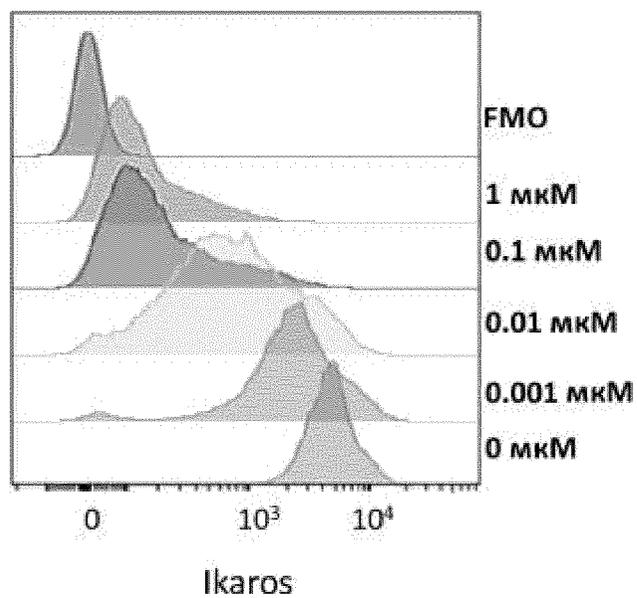


Фиг. 6А



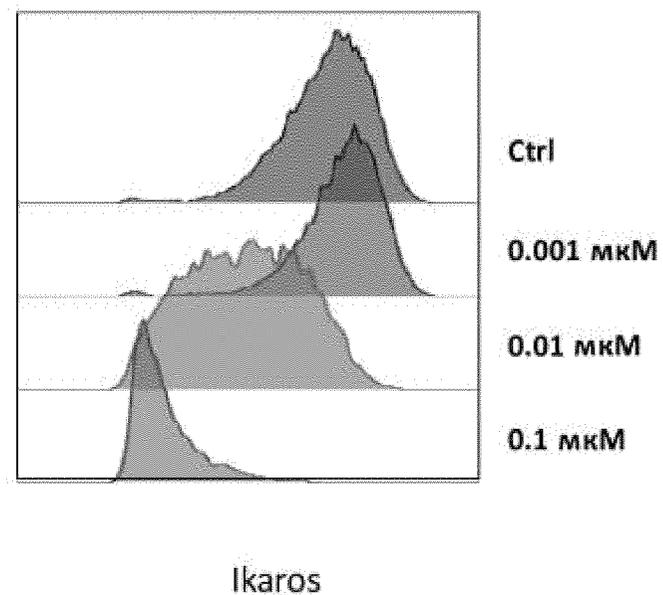
Фиг. 6В

Деградация Ikaros после
краквоременного (24 ч.) воздействия

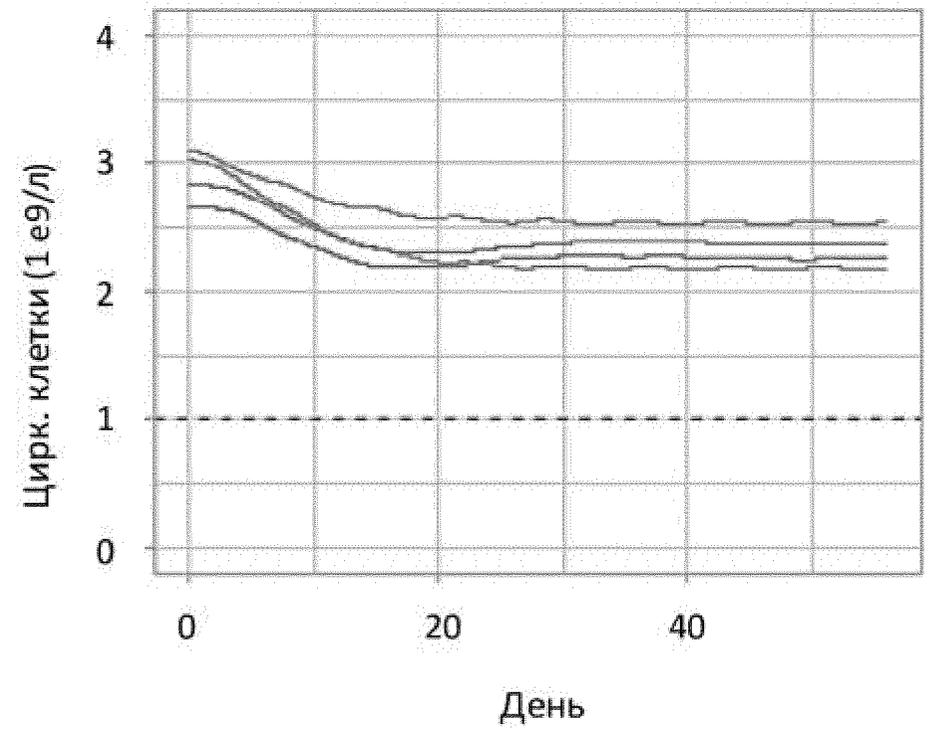


Фиг. 6С

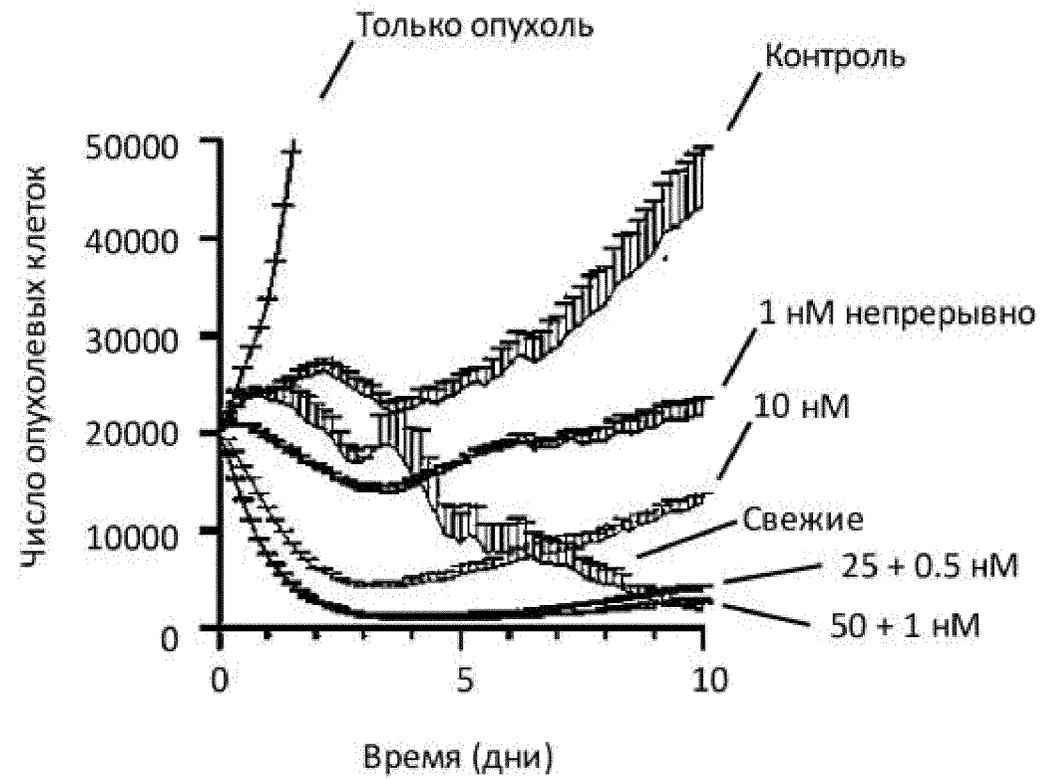
Деградация Ikaros после хронического
(6 дней) воздействия



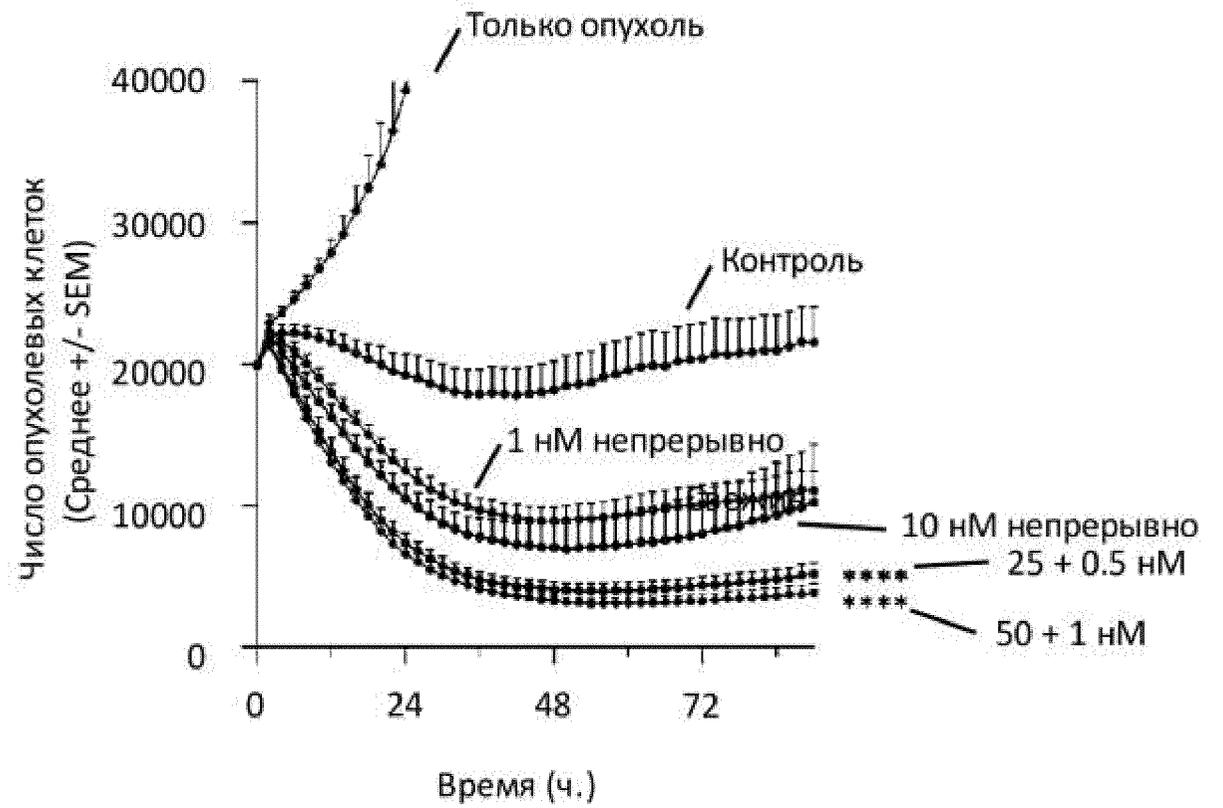
Фиг. 6D



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 7С

Экспрессия маркеров фенотипа Т-клеток памяти
(CAR+ CD8+ CD27+/CCR7+)

