

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490222** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.06.28**

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 37/06* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2013.07.12**

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ CART19 ДЛЯ ИСТОЩЕНИЯ НОРМАЛЬНЫХ В-КЛЕТОК ДЛЯ  
ИНДУКЦИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ**

---

(31) **61/671,508**

(32) **2012.07.13**

(33) **US**

(62) **201992742; 2013.07.12**

(71) Заявитель:  
**ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к способам лечения или предотвращения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD) у индивидуума. Изобретение включает введение генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующий сигнальный участок и сигнальный домен CD3 зета.

**202490222**

**A1**

**A1**

**202490222**

**ПРИМЕНЕНИЕ CART19 ДЛЯ ИСТОЩЕНИЯ НОРМАЛЬНЫХ В-КЛЕТОК ДЛЯ  
ИНДУКЦИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/671508, зарегистрированной 13 июля 2012 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ

Посредством применения способов переноса генов Т-клетки можно генетически модифицировать для стабильной экспрессии связывающих доменов антител на их поверхности, которые предоставляют новую специфичность к антигенам, независимую от главного комплекса гистосовместимости (МНС). Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой применение этого подхода и совмещают антиген-распознающий домен специфичного антитела с внутриклеточным доменом цепи CD3-z или белка FcγRI в едином химерном белке (Gross et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10024-10028; Irving et al., 1991 Cell 64: 891-901). В настоящее время в ряде медицинских центров проходят испытания CAR (Kohn et al. 2011 Mol. Ther. 19: 432-438; Jena et al., 2010 Blood 116: 1035-1044). Для большинства злокачественных опухолей опухолеспецифичные антигены пока не определены, однако для злокачественных новообразований с участием В-клеток CD19 является эффективной опухолевой мишенью. Экспрессия CD19 ограничена нормальными и злокачественными В-клетками (Uckun et al., 1988 Blood 71: 13-29), и CD19 широко применяют как мишень для безопасного тестирования CAR. Хотя CAR могут вызывать активацию Т-клеток способом, сходным с действием эндогенного Т-клеточного рецептора, основным затруднением для клинического применения этого способа до сих пор оставалась ограниченная экспансия CAR+Т-клеток *in vivo*, быстрое исчезновение клеток после инфузии и низкая клиническая активность (Jena et al., 2010 Blood 116: 1035-1044; Sadelain et al., 2009 Curr. Opin. Immunol.

21: 215-223).

CAR-опосредованные ответы Т-клеток можно далее усиливать посредством добавления костимулирующих доменов. В доклинической модели показано, что включение сигнального домена CD137 (4-1BB) значительно повышает противоопухолевую активность и выживаемость CAR *in vivo* по сравнению с включением только цепи CD3-z (Milone et al., 2009 Mol. Ther. 17, 1453-1464; Carpenito et al., 2009 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 3360-3365). Для оценки безопасности и возможности применения для адоптивного переноса Т-клеток, генетически модифицированных для экспрессии таких CAR, было проведено пилотное клиническое испытание с применением аутологичных Т-клеток, экспрессирующих анти-CD19 CAR, содержащие как CD3-z, так и костимулирующий домен 4-1BB (клетки CART19), для воздействия на CD19+ злокачественные новообразования. Согласно такому протоколу провели лечение трех пациентов. Некоторые из результатов, полученные от одного из этих пациентов, описаны в (Porter et al., 2011 N. Engl. J. Med. 365: 8), где сообщается, что результаты этого лечения привели к регрессии опухоли, сохранению клеток CART19 и неожиданному возникновению отложенного синдрома распада опухоли. Также показано, что клетки CART19 оказали сильный клинический противоопухолевый эффект у всех трех проходивших лечение пациентов. В среднем каждая введенная Т-клетка CAR и/или ее потомки уничтожали более чем 1000 лейкозных клеток *in vivo* у пациентов с поздней стадией устойчивого к химиотерапии хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL). Клетки CART19 подвергались активной экспансии Т-клеток *in vivo*, сохранялись в крови и костном мозге (BM) на высоком уровне в течение по меньшей мере 6 месяцев, продолжали экспрессировать функциональные рецепторы на клетках с фенотипом клеток памяти и поддерживали анти-CD19 функцию *in vivo*. Однако до сих пор остается непонятным, каким образом клетки CART19 избегают отторжения организмом человека-хозяина, учитывая то, что конструкции CAR19 содержат как последовательности мыши (детерминант антитела), так и уникальные соединительные фрагменты между различными компонентами конструкции CAR19.

Таким образом, в данной области до сих пор сохраняется необходимость в механизме, обеспечивающем длительное сохранение клеток CART19 и объясняющего, почему эти клетки не отторгаются организмом человека-хозяина. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способу истощения В-клеток у индивидуума. В одном из вариантов осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимулирующий сигнальный участок и сигнальный домен CD3-зета, где антигенсвязывающий домен воздействует на поверхностный В-клеточный маркер, тем самым истощая В-клетки индивидуума.

Изобретение относится к способу стимулирования толерантности у индивидуума. В одном из вариантов осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимулирующий сигнальный участок и сигнальный домен CD3-зета, где антигенсвязывающий домен воздействует на В-клеточный поверхностный маркер, тем самым стимулируя толерантность у индивидуума.

В одном из вариантов осуществления толерантность представляет собой толерантность к трансплантируемой ткани.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированная клетка истощает В-клетки.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную клетку вводят одновременно с трансплантируемой тканью.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную клетку вводят перед введением трансплантируемой ткани.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную клетку вводят после введения трансплантируемой ткани.

Изобретение относится к способу лечения реакции

"трансплантат против хозяина" (GVHD). В одном из вариантов осуществления способ включает введение клетки, генетически модифицированной для экспрессии CAR, нуждающемуся в этом индивидууму, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимулирующий сигнальный участок и сигнальный домен CD3-зета, где антигенсвязывающий домен воздействует на В-клеточный поверхностный маркер, тем самым обеспечивая лечение GVHD у индивидуума.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированная клетка истощает В-клетки.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную клетку вводят одновременно с трансплантируемой тканью.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную клетку вводят перед введением трансплантируемой ткани.

В одном из вариантов осуществления генетически модифицированную клетку вводят после введения трансплантируемой ткани.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет более понятным, если читать его в сочетании с прилагаемыми чертежами. С целью иллюстрации изобретения в рисунках представлены варианты осуществления, которые в настоящее время являются предпочтительными. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными конструкциями и способами вариантов осуществления, приведенных в чертежах.

Фиг. 1, включающая фиг. от 1A до 1F, представляет собой серию изображений, демонстрирующих устойчивую экспансию *in vivo* и сохранение в крови и костном мозге клеток CART19. ДНК изолировали из цельной крови, как показано на фиг. от 1A до 1C, или из костного мозга, как показано на фиг. от 1D до 1F, образцы получали от UPN 01, как показано на фиг. 1A и 1D, UPN 02, как показано на фиг. 1B и 1E, и UPN 03, как показано на фиг. 1C и 1F, подвергали анализу посредством количественной ПЦР крупными

партиями с применением соответствующего анализа для детекции и количественной оценки последовательностей CART19. Каждая точка на графике соответствует среднему от трех измерений 100–200 нг геномной ДНК, с максимальным значением % CV менее 1,56%. Параметры успешности/неуспешности для анализа включали предварительно установленные диапазоны для наклона кривой и эффективности амплификации и амплификацию контрольного образца. Нижняя граница количественного анализа, установленная по диапазону стандартной кривой, соответствовала 2 копиям трансген/мкг геномной ДНК; значения образцов ниже этого числа считали оценочными показателями и отображали в случае, если по меньшей мере 2/3 репликатов демонстрировали значение Ct с % CV для значений 15%. Клетки CART19 вводили на сутки 0, 1 и 2 для UPN 01 и UPN 03 и на сутки 0, 1, 2 и 11 для UPN 02.

Фиг. 2, содержащая фиг. от 2A до 2D, представляет собой серию изображений, демонстрирующих пролонгированную поверхностную экспрессию CART19 и образование функциональной памяти CAR *in vivo*. На фиг. 2A представлена детекция CAR-экспрессирующих CD3+ лимфоцитов и отсутствие В-клеток в периферической крови и в костном мозге. Свежеобработанные моноклеарные клетки периферической крови или костного мозга, полученные от UPN 03 через 169 суток после инфузии клеток CART19, оценивали посредством проточной цитометрии на поверхностную экспрессию CAR19 (сверху) или наличие В-клеток (снизу); в качестве контроля окрашивали PBMC ND365, полученные от здоровых доноров. Для оценки экспрессии CAR19 в CD3+ лимфоцитах образцы окрашивали с антителами к CD14-PE-Cy7 и CD16-PE-Cy7 (дамп-канал) и CD3-FITC, дающих сигнал выше порогового значения на CD3+, и оценивали экспрессию CAR19 в компартментах CD8+ и CD8- лимфоцитов посредством окрашивания с CD8a-PE и анти-CAR19 идиотипичными антителами, конъюгированными с Alexa-647. Данные на диаграммах отобраны по отрицательной по дам-каналу/CD3-положительной популяции клеток. Для оценки наличия В-клеток образцы окрашивали с антителами к CD14-APC и CD3-FITC (дамп-каналы) и оценивали на наличие В-клеток в отрицательной по дам-каналу фракции посредством окрашивания с антителами к CD20-

PE и CD19-PE-Cy-7. Во всех случаях квадранты ниже порогового значения устанавливали на неокрашенные контроли, как показано на фиг. 2B и 2C. Показано иммунофенотипирование Т-клеточных субпопуляций CD4<sup>+</sup> (фиг. 2B) и CD8<sup>+</sup> (фиг. 2C). Замороженные образцы периферической крови от UPN 03, полученные посредством афереза через 56 и 169 суток после инфузии Т-клеток, оставляли на ночь в среде для культивирования без добавления дополнительных факторов, отмывали и подвергали мультипараметрическому иммунофенотипированию для экспрессии маркеров Т-клеточной памяти, активации и истощения. Стратегия гейтирования, как показано на фиг. 6, включала начальное гейтирование по дам-каналу (CD14, CD16, Live/Dead Aqua)-отрицательных и CD3-положительных клеток и последующее положительное гейтирование по CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеткам. Гейты и квадранты устанавливали с применением контролей FMO (CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, CCR7) или посредством гейтирования по положительным клеточным популяциям (CD3, CD4, CD8) и четко разграниченным субпопуляциям (CD27, CD28, CD57); данные отображали после биекспоненциальной трансформации для объективной визуализации событий. На фиг. 2D показана функциональная компетентность сохраняющихся клеток CAR. Замороженные образцы периферической крови от UPN 03, полученные посредством афереза через 56 и 169 суток после инфузии Т-клеток, оставляли на ночь в среде для культивирования без добавления дополнительных факторов, отмывали и анализировали напрямую *ex vivo* на способность к распознаванию CD19-экспрессирующих клеток-мишеней с применением анализов дегрануляции CD107. После инкубации в течение двух часов в присутствии анти-CD28, анти-CD49d и CD107-FITC клеточные смеси собирали, отмывали и подвергали мультипараметрическому анализу посредством проточной цитометрии для оценки способности клеток CART19 к дегрануляции в ответ на CD19-экспрессирующие мишени. Стратегия гейтирования включала начальное гейтирование по дам-каналам (CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, Live/Dead Aqua)-отрицательных и CD3-PE-положительных клеток и последующее гейтирование по CD8-PE-Техасский красный-положительным клеткам; данные представлены для

CD8+ популяции. Во всех случаях отрицательные квадранты были установлены по неокрашенным контролям.

Фиг. 3, содержащая фиг. от 3А до 3С, представляет собой серию изображений, иллюстрирующих результаты экспериментов, оценивающих клинические ответы после инфузии клеток CART19. На фиг. 3А показано, что UPN 02 подвергали двум циклам лечения ритуксимабом и бендамустином с минимальным ответом (R/B, стрелка). Т-клетки CART19 инфузирвали начиная с 4 суток после лечения только бендамустином (B, стрелка). Резистентные к ритуксимабу и бендамустину лейкозные клетки быстро удалялись из крови, на что указывает снижение абсолютного содержания лимфоцитов (ALC) от 60600/мкл до 200/мкл в течение 18 суток после инфузии. Лечение кортикостероидами начинали на 18 сутки после инфузии в связи с плохим самочувствием и неинфекционным фебрильным синдромом. Линия отсчета (пунктир) указывает на верхнюю границу нормальных значений ALC. На фиг. 3В представлены приведенные в качестве примера экспериментов по окрашиванию образцы костного мозга, полученные посредством серийной биопсии, или образцы тромбов, полученные от пациентов UPN 01 и 03 на CD20. Лейкозная инфильтрация, наблюдавшаяся до лечения у обоих пациентов, отсутствовала на образцах, полученных после лечения, и сопровождалась нормализацией насыщенности клетками и трехлинейного гемопоза. У UPN 01 не было обнаружено клеток CLL, как показано посредством проточной цитометрии, цитогенетики и флуоресцентной гибридизации *in situ*, или нормальных В-клеток, как показано посредством проточной цитометрии, в костном мозге или крови. У UPN 03 обнаружено 5% остаточных нормальных CD5-отрицательных В-клеток, что подтверждено посредством проточной цитометрии на сутки +23, которая также указывает на то, что они являются поликлональными; нормальных В-клеток на сутки +176 обнаружено не было. На фиг. 3С представлены результаты экспериментов с применением серийной КТ-визуализации для оценки устойчивой к химиотерапии генерализованной лимфаденопатии с быстрым разрешением. Билатеральные подмышечные образования рассасывались через 83 (UPN 01) и 31 (UPN 03) суток после инфузии, на что указывает стрелка и окружность.



Фиг. 4, содержащая фиг. от 4А до 4С, представляет собой серию изображений, иллюстрирующих абсолютное содержание лимфоцитов и общее количество циркулирующих клеток CART19+ для UPN 01, 02 и 03. Общее количество лимфоцитов (общее количество нормальных клеток и клеток CLL) в сравнении с общим количеством клеток CART19+ в крови показано для всех 3 индивидуумов с применением абсолютного содержания лимфоцитов по значениям СВС и объема крови, равного 5,0 л. Общее количество циркулирующих клеток CART19 рассчитывали посредством применения последовательных значений СВС со значениями абсолютного содержания лимфоцитов и маркерными значениями количественной ПЦР, как показано на фиг. 1, переводя копии/мкг ДНК в средние относительные значения, как описано далее в настоящем документе. Показано, что относительные маркерные значения количественной ПЦР строго коррелируют (<2-кратные вариации) с полученными посредством проточной цитометрии характеристиками продуктов инфузии и с данными, полученными в ходе анализа образцов, для которых соответствующие данные проточной цитометрии были доступны для непосредственного подсчета клеток CART19 посредством окрашивания.

Фиг. 5, содержащая фиг. от 5А до 5D, представляет собой серию изображений, иллюстрирующих эксперименты, включающие непосредственную детекцию *ex vivo* CART19-положительных клеток у UPN-01 PBMC через 71 сутки после инфузии Т-клеток. UPN-01 PBMC, полученные либо сразу после афереза через 71 сутки после инфузии, либо замороженные во время афереза для получения Т-клеток (линия отсчета) и размороженные в жизнеспособном состоянии перед окрашиванием, подвергали анализу посредством проточной цитометрии для детекции наличия клеток CART19, экспрессирующих группу CAR19 на своей поверхности. Для оценки экспрессии CAR19 в лимфоцитах образцы окрашивали с CD3-PE и идиотипическими антителами к CAR19, конъюгированными с Alexa-647, или окрашивали только с CD3-PE (FMO для CAR19). На фиг. 5А показано, что начальный гейт лимфоцитов был установлен на основе прямого и бокового светорассеяния (FSC vs. SSC), после чего проводили гейтирование по клеткам CD3+. На фиг. 5В показан гейт

лимфоцитов CD3+; на фиг. 5C показано окрашивание идиотипа CAR; на фиг. 5D показано FMO идиотипа CAR. CAR19-положительный гейт устанавливали по образцам CAR19 FMO.

Фиг. 6, содержащая фиг. от 6A до 6C, представляет собой серию изображений, иллюстрирующих стратегию гейтирования для идентификации экспрессии CART19 посредством полихроматичной проточной цитометрии в образцах крови UPN 03. Стратегия гейтирования на фиг. 6C показана для образца, полученного от UPN 03 на сутки 56, и иллюстрирует также стратегию, примененную для образца, полученного от UPN 03 на сутки 169. На фиг. 6A представлен первичный гейт: дамп-гейт (CD14, CD16, LIVE/dead Aqua)-отрицательный, CD3-положительный. На фиг. 6B представлены вторичные гейты: CD4-положительный, CD8-положительный. На фиг. 6C представлены третичные гейты: CAR19-положительный и CAR19-отрицательный, установленные по образцам CAR FMO (правые панели).

Фиг. 7 представляет собой изображение, обобщающее демографические данные и ответы пациентов.

Фиг. 8 представляет собой изображение, иллюстрирующее длительную экспрессию CART19.

Фиг. 9, содержащая фиг. 9A и 9B, представляет собой серию изображений, иллюстрирующих выраженный дефицит В-клеток.

Фиг. 10 представляет собой изображение, демонстрирующее снижение количества плазматиков у всех 3 пациентов.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение частично основано на неожиданном обнаружении того, что Т-клетки, экспрессирующие анти-CD19 CAR, включающий CD3z и костимулирующий домен 4-1BB (клетки CART19), сохраняются у млекопитающего-хозяина в течение длительного времени. Например, в рассматриваемом случае клетки, экспрессирующие поверхностный CAR19, наблюдались у млекопитающего-хозяина в течение более 21 месяца после инфузии Т-клеток CAR19. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу истощения нормальных В-клеток у млекопитающего посредством введения нуждающемуся в этом млекопитающему CAR, которые воздействуют на В-клетки, с целью индукции толерантности

у млекопитающего.

Изобретение относится к композициям и способам истощения В-клеток с целью индукции толерантности. Настоящее изобретение относится к способу адаптивного переноса Т-клеток, трансфектированных для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR). CAR представляют собой молекулы, совмещающие основанную на антителе специфичность к антигену-мишени (например, к В-клеточному антигену) с Т-клеточным рецептор-активирующим внутриклеточным доменом с получением химерного белка, который предоставляет специфичную анти-В-клеточную иммунную активность.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит внеклеточный домен, содержащий антиген-распознающий домен, который взаимодействует с В-клеточным антигеном, трансмембранный домен и цитоплазматический домен.

В одном из вариантов осуществления CAR Т-клетки по изобретению можно получать посредством внесения лентивирусного вектора, содержащего желаемые CAR. CAR Т-клетки по изобретению способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к их длительному сохранению, приводящему к устойчивому истощению В-клеток и толерантности.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к введению генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, для эффективного снижения частоты возникновения, тяжести или продолжительности реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), криза отторжения или посттрансплантационного лимфопролиферативного синдрома.

#### Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют значение, общепринятое среди специалистов в данной области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описываемым в настоящем документе, можно использовать в практическом осуществлении для тестирования по настоящему изобретению, предпочтительные материалы и способы описаны в настоящем документе. В описании и формуле изобретения

по настоящему изобретению будет применена следующая терминология.

Также следует понимать, что терминология, применяемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Объекты, обозначенные в настоящем описании, могут быть как в единственном, так и во множественном числе. В качестве примера "элемент" означает один элемент или более чем один элемент.

"Приблизительно", как используют в настоящем документе по отношению к измеряемому значению, такому как количество, временная продолжительность и т.п., включает вариации в пределах  $\pm 20\%$  или  $\pm 10\%$ , в некоторых случаях  $\pm 5\%$ , в некоторых случаях  $\pm 1\%$  и в некоторых случаях  $\pm 0,1\%$  от приведенного значения, поскольку такие вариации подходят для осуществления раскрытых способов.

"Активация", как используют в настоящем документе, относится к состоянию Т-клетки, которая была стимулирована достаточно для индуцирования поддающейся обнаружению пролиферации клеток. Активация также может быть ассоциирована с индуцированной выработкой цитокинов и поддающимся обнаружению эффекторными функциями. Термин "активированные Т-клетки" относится, в частности, к Т-клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

Термин "антитело", как используют в настоящем документе, относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные участки интактных иммуноглобулинов. Антитела часто представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулина. Антитела по настоящему изобретению могут существовать в разнообразных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)<sub>2</sub>, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York;

Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

Термин "фрагмент антитела" относится к участку интактного антитела и относится к определяющей связывание с антигеном переменной области интактного антитела. Примеры фрагментов антител в качестве неограничивающих примеров включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и фрагменты Fv, линейные антитела, антитела scFv и полиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител.

Термин "антиген" или "Ag", как используют в настоящем документе, определяется как молекула, которая провоцирует иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать выработку антител или активацию специфических иммунологически компетентных клеток или и то, и другое. Специалистам в данной области должно быть ясно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может выступать в качестве антигена. Кроме того, антигены можно получать из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалистам в данной области должно быть ясно, что любая ДНК, содержащая нуклеотидные последовательности или частичные нуклеотидные последовательности, кодирующие белок, который обеспечивает иммунный ответ, таким образом кодирует "антиген", как этот термин используют в настоящем документе. Кроме того, специалистам в данной области должно быть ясно, что антиген не должен кодироваться только полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Легко понять, что настоящее изобретение относится к, в качестве неограничивающих примеров, применению частичных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности можно сочетать в различных комбинациях для обеспечения желаемого иммунного ответа. Кроме того, специалистам в данной области должно быть ясно, что антиген вообще не должен кодироваться "геном". Легко понять, что антиген можно получать посредством синтеза или получать из биологического образца. Такой биологический образец может включать, в качестве неограничивающих примеров, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Термин "аутоантиген" в соответствии с настоящим изобретением

означает любой собственный антиген, который распознается иммунной системой как чужеродный. Аутоантигены в качестве неограничивающих примеров включают клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности.

Термин "аутоиммунное заболевание", как используют в настоящем документе, определяют как нарушение, которое приводит к аутоиммунному ответу. Аутоиммунное заболевание приводит к неадекватному и избыточному ответу на собственный антиген. Примеры аутоиммунного заболевания в качестве неограничивающих примеров включают болезнь Аддисона, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (I типа), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, тяжелую миастению, обыкновенную пузырчатку, псориаз, ревматический полиартрит, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию и язвенный колит, наряду с другими.

Как используют в настоящем документе, термин "аутологический" предназначен для обозначения любого материала, полученного от того же индивидуума, которому позже вводят этот материал.

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

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

"В-клеточный поверхностный маркер", как используют в настоящем документе, представляет собой антиген, экспрессирующийся на поверхности В-клетки, на который можно воздействовать связывающимся с ним агентом. Примеры В-клеточных поверхностных маркеров включают поверхностные маркеры лейкоцитов CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53,

CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 и CD86. В-клеточные поверхностные маркеры, представляющие особый интерес, предпочтительно экспрессируются на В-клетках по сравнению с другими не относящимися к В-клеткам тканям млекопитающего и могут экспрессироваться как на предшественниках В-клеток, так и на зрелых В-клетках. В одном из вариантов осуществления предпочтительный маркер представляет собой CD19, который находится на В-клетках на всем протяжении дифференцировки линии от стадии про/пре-В-клетки до стадии окончательно дифференцированной плазматической клетки.

Как используют в настоящем документе, "истощение В-клеток" относится к снижению уровня В-клеток у животного или человека после лечения лекарственным средством, способами клеточной терапией или антителом по сравнению с уровнем до лечения. Уровни В-клеток можно измерять посредством хорошо известных анализов, таких как клинический анализ крови, анализ FACS на известные В-клеточные маркеры, и посредством способов, описанных в настоящем документе. Истощение В-клеток может быть частичным или полным. В одном из вариантов осуществления истощение В-клеток составляет 25% или более.

Термины "истощать" и "истощение" используют в настоящем документе по отношению к В-клеткам, и для описания изобретения и формулы изобретения их используют в одном или нескольких из следующих значений: блокирование функций В-клеток; функциональная инактивация В-клеток; цитолиз В-клеток; ингибирование пролиферации В-клеток; ингибирование дифференцировки В-клеток в плазматические клетки; инициация нарушения функций В-клеток, которая приводит к терапевтическому преимуществу; ингибирование выработки антител к "слушивающимся" с клетки антигенам; снижение количества В-клеток; инактивация В-клеток, стимулированная или активированная "слушивающимися" с клетки антигенами; блокирование одной или нескольких функций В-клеток, стимулированное или активированное "слушивающимися" с клетки антигенами; цитолиз В-клеток, стимулированный или активированный "слушивающимися" с клетки антигенами; и снижение количества В-клеток, стимулированное или активированное

"слушивающимися" с клетки антигенами. Истощение В-клеток может представлять собой результат одного или нескольких механизмов, включающих в качестве неограничивающих примеров клональную инактивацию, апоптоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность, комплемент-опосредованную цитотоксичность и опосредованную сигнальным каскадом инактивацию, нарушение функции клеток или гибель клеток.

Термин "злокачественная опухоль", как используют в настоящем документе, определяют как заболевание, которое характеризуется быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных злокачественных опухолей в качестве неограничивающих примеров включают рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких и т.п.

Антиген "CD19" относится к антигену в приблизительно 90 кДа, который можно идентифицировать, например, посредством антител HD237 или B4 (Kiesel et al., 1987 *Leukemia Research II*, 12: 1119). CD19 находится на клетках на всем протяжении дифференцировки клеток В-линии от стадии стволовой клетки до окончательной дифференцировки в плазматические клетки, включая в качестве неограничивающих примеров пре-В-клетки, В-клетки (включая наивные В-клетки, антиген-стимулированные В-клетки, В-клетки памяти, плазматические клетки и В-лимфоциты) и фолликулярные дендритные клетки. CD19 также находится на В-клетках ткани плода человека. В предпочтительных вариантах осуществления антиген CD19, на который воздействуют антителами по изобретению, представляет собой антиген CD19 человека.

Термин "костимулирующий лиганд", как используют в настоящем документе, включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывается с распознаваемой костимулирующей молекулой на Т-клетке, тем самым обеспечивая сигнал, который, в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например,



связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой MHC, связанной с пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включающий в качестве неограничивающих примеров пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд может включать, в качестве неограничивающих примеров, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксин-бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, агонист или антитело, которое связывает лиганд Toll-подобного рецептора, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимулирующий лиганд также включает, в числе прочего, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, находящейся на Т-клетке, включающей в качестве неограничивающих примеров CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83.

"Костимулирующая молекула" относится к распознаваемому партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым обеспечивая костимулирующий ответ Т-клетки, включающий в качестве неограничивающих примеров пролиферацию. Костимулирующие молекулы в качестве неограничивающих примеров включают молекулу MHC I класса, BTLA и лиганд Toll-подобного рецептора.

"Костимулирующий сигнал" как используют в настоящем документе, относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как связывание TCR/CD3, приводит к Т-клеточной пролиферации и/или активации или подавлению ключевых молекул.

"Заболевание" представляет собой состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и при котором здоровье животного продолжает ухудшаться в случае, если заболевание не излечено. Для сравнения, "нарушение" у животного представляет собой состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья животного менее благоприятно, чем в

отсутствие нарушения. В отсутствие лечения нарушение не обязательно вызывает дальнейшее ухудшение состояния здоровья животного.

"Эффективное количество", как используют в настоящем документе, означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический эффект.

Как используют в настоящем документе, "эндогенный" относится к любому материалу, полученному из или изнутри организма, клетки, ткани или системы.

Как используют в настоящем документе, термин "экзогенный" относится к любому материалу, введенному в организм, клетку, ткань или систему, который был получен вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин "экспрессия", как используют в настоящем документе, определяют как транскрипцию и/или трансляцию определенной нуклеотидной последовательности, обусловленную ее промотором.

"Экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий контролирующую экспрессию последовательности, функционально связанные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Экспрессирующий вектор содержит достаточные для экспрессии cis-действующие элементы; другие элементы для экспрессии могут предоставляться клеткой-хозяином или экспрессирующей системой *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все экспрессирующие векторы, известные в данной области, такие как космиды, плазмиды (например, "голые" или включенные в липосомы) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

"Гомологичный" относится к сходству последовательностей или идентичности последовательности двух полипептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Когда позиция в обеих из двух сравниваемых последовательностей занята одинаковым мономером основания или аминокислоты, например, если позиция в каждой из двух молекул ДНК занята аденином, то молекулы гомологичны по этой позиции. Процент гомологии между двумя последовательностями

представляет собой функцию количества совпадающих или гомологичных позиций в двух последовательностях, разделенную на количество сравниваемых позиций  $\times 100$ . Например, если 6 из 10 позиций в двух последовательностях являются совпадающими или гомологичными, то две последовательности гомологичны на 60%. В качестве примера, последовательности ДНК ATTGCC и TATGGC имеют 50% гомологии. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены для обеспечения максимальной гомологии.

Термин "иммуноглобулин" или "Ig", как используют в настоящем документе, определяют как класс белков, которые функционируют как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда обозначают как BCR (В-клеточный рецептор) или рецептор антигена. Пять членов, входящих в этот класс белков, представляют собой IgA, IgG, IgM, IgD и IgE. IgA представляет собой первичное антитело, которое содержится в выделениях тела, таких как слюна, слезы, грудное молоко, желудочно-кишечные выделения и слизистые выделения дыхательных и мочеполовых путей. IgG представляет собой самое распространенное циркулирующее антитело. IgM представляет собой основной иммуноглобулин, вырабатываемый при первичном иммунном ответе у большинства индивидуумов. Это самый эффективный иммуноглобулин, участвующий в агглютинации, связывании комплемента и других ответах антител, который является важным для защиты против бактерий и вирусов. IgD представляет собой иммуноглобулин, для которого не продемонстрированы функции антитела, однако он может выступать как рецептор антигенов. IgE представляет собой иммуноглобулин, опосредующий гиперчувствительность немедленного типа посредством стимулирования высвобождения медиаторов из тучных клеток и базофилов при экспозиции к аллергену.

Как используют в настоящем документе, термин "иммунный ответ" включает опосредованные Т-клетками и/или В-клетками иммунные ответы. Иллюстративные иммунные ответы включают ответы Т-клеток, например, выработку цитокинов и клеточную цитотоксичность. Кроме того, термин "иммунный ответ" включает

иммунные ответы, которые косвенно обеспечиваются активацией Т-клеток, например, выработкой антител (гуморальные ответы) и активацией выделяющих цитокины клеток, например, макрофагов. Иммунные клетки, вовлеченные в иммунный ответ, включают лимфоциты, такие как В-клетки и Т-клетки (CD4+, CD8+, Th1 и Th2 клетки); антигенпрезентирующие клетки (например, профессиональные антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты, клетки Лангерганса, и непрофессиональные антигенпрезентирующие клетки, такие как кератиноциты, эндотелиальные клетки, астроциты, фибробласты, олигодендроциты); естественные киллеры; миелоидные клетки, такие как макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы и гранулоциты.

Как используют в настоящем документе, термин "иммунологическая толерантность" относится к способам, применяемым к части получающих лечение индивидуумов по сравнению с не получающими лечение индивидуумами, при которых наблюдается: а) пониженный уровень специфического иммунного ответа (как полагают, опосредованный, по меньшей мере отчасти, антиген-специфичными эффекторными Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, антителами или их эквивалентами); б) задержка возникновения или развития специфического иммунного ответа; или с) пониженный риск возникновения или развития специфического иммунного ответа. "Специфичная" иммунологическая толерантность возникает, когда иммунологическая толерантность преимущественно возникает в отношении определенных антигенов по сравнению с другими.

Как используют в настоящем документе, "инструктивный материал" включает публикацию, запись, диаграмму или любой другой способ выражения, который можно использовать для описания применимости композиций и способов по изобретению. Инструктивный материал набора по изобретению может быть, например, приложен к контейнеру, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию по изобретению, или может поставляться вместе с контейнером, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. Альтернативно, инструктивный материал может поставляться отдельно от контейнера с расчетом на то, что

инструктивный материал и соединение будут совместно использоваться получателем.

"Изолированный" означает измененный или выведенный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, в естественном состоянии содержащиеся в организме живого животного, не являются "изолированными", но те же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сопутствующих им в естественном состоянии материалов, являются "изолированными". Изолированные нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

"Лентивирус", как используют в настоящем документе, относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов в том, что они способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому они представляют собой один из самых эффективных способов векторной доставки генов. Примерами лентивирусов являются ВИЧ, вирус иммунодефицита обезьян и вирус кошачьего иммунодефицита. Векторы, полученные из лентивирусов, обеспечивают способ для достижения значительных уровней доставки генов *in vivo*.

Под термином "модулирование", как используют в настоящем документе, подразумевают обеспечение поддающегося обнаружению увеличения или снижения уровня ответа у индивидуума по сравнению с уровнем ответа у индивидуума в отсутствие лечения или соединения и/или по сравнению с уровнем ответа у во всех отношениях идентичного индивидуума, не получающего лечение. Термин включает нарушение и/или изменение естественного сигнала или ответа, вызывающее благоприятный терапевтический ответ у индивидуума, предпочтительно, у человека.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожное (п/к), внутривенное (в/в), внутримышечное (в/м) или интратеральное введение или способы инфузии.

Термины "пациент", "индивидуум", "субъект" и т.п. используют взаимозаменяемо в настоящем документе и применяют к любому

животному или их клеткам как *in vitro*, так и *in situ*, применимых для способов, описываемых в настоящем документе. В определенных неограничивающих вариантах осуществления пациент, индивидуум или субъект представляет собой человека.

Термин "отторжение" относится к состоянию, при котором трансплантируемый орган или ткань не принимаются организмом реципиента. Отторжение возникает в результате того, что иммунная система реципиента атакует трансплантируемый орган или ткань. Отторжение может продолжаться в течение от нескольких суток до нескольких недель после трансплантации (острое) или в течение от нескольких месяцев до нескольких лет после трансплантации (хроническое).

Под термином "специфически связывается", как используют в настоящем документе в отношении антитела, подразумевают антитело, которое распознает определенный антиген, но по существу не распознает или не связывается с другими молекулами в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном одного вида, может также связываться с тем же антигеном одного или нескольких других видов. Однако такая межвидовая реактивность сама по себе не меняет классификацию антитела как специфичного. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с другими аллельными формами этого антигена. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не меняет классификацию антитела как специфичного. В некоторых случаях термины "специфическое связывание" или "специфически связываться" можно использовать по отношению к взаимодействию антитела, белка или пептида со вторым химическим соединением, что означает то, что взаимодействие зависит от наличия определенной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) на химическом соединении; например, антитело распознает и связывается с определенной белковой структурой, а не с белками в целом. Если антитело специфично к эпитопу "А", то наличие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободный, немеченый А), в реакции, содержащей меченый "А" и антитело, снизит количество меченого А, связанного с антителом.

Под термином "стимуляция" подразумевают первичный ответ, вызванный связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с распознаваемым лигандом, что приводит к передаче сигнала, включающему в качестве неограничивающих примеров передачу сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может вызывать изменения экспрессии определенных молекул, такое как снижение экспрессии TGF- $\beta$ , и/или реорганизацию структур цитоскелета и т.п.

Термин "стимулирующая молекула", как используют в настоящем документе, означает молекулу на Т-клетке, которая специфически связывается с распознаваемым стимулирующим лигандом, находящимся на антигенпрезентирующей клетке.

"Стимулирующий лиганд", как используют в настоящем документе, означает лиганд, который при наличии на антигенпрезентирующей клетке (например, аАРС, дендритной клетке, В-клетке и т.п.) может специфически связываться с распознаваемым партнером по связыванию (который в настоящем документе обозначают как "стимулирующая молекула") на Т-клетке, тем самым обеспечивая первичный ответ Т-клетки, включающий в качестве неограничивающих примеров активацию, запуск иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области и включают, в числе прочего, молекулы МНС класса I, связанные с пептидом, антитело к CD3, антитело-суперагонист к CD28 и антитело-суперагонист к CD2.

Термин "индивидуум" предназначен для обозначения живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающих). Примеры индивидуумов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды.

Как используют в настоящем документе, "в значительной степени очищенная" клетка представляет собой клетку, в значительной степени свободную от других типов клеток. В значительной степени очищенная клетка также относится к клетке, которую отделили от других типов клеток, с которыми она обычно связана в природном состоянии. В некоторых случаях популяция в значительной степени очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин относится просто

к клетке, которую отделили от клеток, с которыми она связана в естественном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления клетки не культивируют *in vitro*.

Термин "терапевтический", как используют в настоящем документе, означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект получают посредством подавления, ослабления или избавления от состояния болезни.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения, которое вызывает биологический или медицинский ответ ткани, системы или индивидуума, желаемый для исследователя, ветеринара, доктора или другого клинициста. Термин "терапевтически эффективное количество" включает такое количество соединения, которое при доставке оказывается достаточным для предотвращения развития или смягчения до некоторой степени одного или нескольких признаков или симптомов нарушения или заболевания, подлежащих лечению. Терапевтически эффективное количество варьирует в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести и возраста, массы и т.д. индивидуума, получающего лечение.

"Трансплантат", как используют в настоящем документе, относится к клеткам, ткани или органу, которые вводят индивидууму. Источник трансплантируемого материала может представлять собой культивируемые клетки, клетки, полученные от другого индивидуума, или клетки, полученные от того же индивидуума (например, после того, как клетки культивируют *in vitro*). Иллюстративные органы-трансплантаты представляют собой почку, печень, сердце, легкое и поджелудочную железу.

Термин "лечить" заболевание, как используют в настоящем документе, означает снижать частоту или тяжесть по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, наблюдающегося у индивидуума.

Термин "трансфицированный" или "трансформированный" или "трансфектированный", как используют в настоящем документе, относится к способу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или интродуцируют в клетку-хозяина.



"Трансфицированная" или "трансформированная" или "трансфектированная" клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансфектирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную индивидуальную клетку и ее потомство.

Термин "толерантный" относится к индивидууму со сниженным или отсутствующим иммунным ответом на определенный антиген или группу антигенов. В контексте изобретения индивидуума считают толерантным, если он или она не отторгает (т.е. не развивает сильного иммунного ответа против) трансплантируемые клетки. В некоторых случаях толерантный индивидуум не отторгает трансплантируемые клетки даже в отсутствие иммуносупрессивной терапии. В контексте изобретения индивидуума считают "нетолерантным", если этот индивидуум отторгает трансплантируемые клетки. Нетолерантные индивидуумы включают индивидуумов, у которых отторжение можно контролировать посредством иммуносупрессивной терапии (например, стандартной иммуносупрессии), а также индивидуумов, развивающих активный иммунный ответ против трансплантируемых клеток.

Как используют в настоящем документе, "толерантность *in vivo*" относится к по существу отсутствующему иммунному ответу, специфичному для чужеродной ткани. Иммунный ответ может возникать в результате того, что индивидуум-реципиент развивает иммунный ответ на чужеродную ткань, или, напротив, иммунный ответ может возникать в результате того, что чужеродная ткань развивает иммунный ответ на индивидуума-реципиента (например, GVHD). Способы измерения толерантности *in vivo* широко известны в данной области.

Диапазоны: на всем протяжении описания изобретения различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов применяют исключительно для удобства и краткости, и их не нужно рассматривать как строгое ограничение объема изобретения. Таким образом, описание диапазона нужно рассматривать как включающее все возможные участки диапазона, а также отдельные численные значения, находящиеся в пределах этого диапазона. Например,

описание диапазона, такого как от 1 до 6, нужно рассматривать как включающее все возможные участки диапазона, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные численные значения, находящиеся в пределах этого диапазона, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это выполняется независимо от ширины диапазона.

#### Описание

Настоящее изобретение относится к композициям и способам истощения нормальных В-клеток у млекопитающего. В одном из вариантов осуществления истощение В-клеток с применением CAR по изобретению индуцирует толерантность у млекопитающего.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции толерантности *in vivo* к трансплантируемой чужеродной ткани. В некоторых вариантах осуществления способ можно использовать частично для предотвращения и/или лечения отторжения трансплантируемой ткани. В целом, способ включает введение CAR Т-клеток по изобретению индивидууму, которому трансплантировали чужеродную ткань. Термин "чужеродная ткань", как используют в настоящем документе, может включать трансплантат костного мозга, трансплантат органа, переливаемую кровь или любую другую чужеродную ткань или клетку, которые целенаправленно вводят индивидууму.

В другом варианте осуществления способ можно использовать частично для предотвращения и/или лечения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD). В целом, способ включает введение CAR Т-клеток по изобретению индивидууму, которому трансплантировали чужеродную ткань. Термин "чужеродная ткань", как используют в настоящем документе, может включать трансплантат костного мозга, трансплантат органа, переливаемую кровь или любую другую чужеродную ткань или клетку, которые целенаправленно вводят индивидууму.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению можно получать таким образом, чтобы они содержали внеклеточный домен, включающий антигенсвязывающий домен, который взаимодействует с антигеном В-клетки, слитым с доменом внутриклеточной сигнализации зета-цепи комплекса Т-клеточного рецептора антигена

(например, CD3 зета). Иллюстративный В-клеточный антиген представляет собой CD19, поскольку этот антиген экспрессируется на злокачественных В-клетках. Однако изобретение не ограничено взаимодействием с CD19. Напротив, изобретение включает любые связывающие В-клеточный антиген молекулы, связывающиеся с распознаваемым антигеном. Антиген-связывающая молекула предпочтительно слита с внутриклеточным доменом одной или нескольких костимулирующих молекул и зета-цепью. Предпочтительно антиген-связывающая молекула слита с одним или несколькими внутриклеточными доменами, выбранными из группы сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3 зета и любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит сигнальный домен CD137 (4-1BB). Это связано с тем, что настоящее изобретение частично основано на обнаружении того, что опосредованные CAR ответы Т-клеток можно дополнительно усиливать посредством добавления костимулирующих доменов. Например, включение сигнального домена CD137 (4-1BB) значительно повышает опосредованную CAR активность и выживаемость CAR Т-клеток *in vivo* по сравнению с идентичными по всем остальным признакам CAR Т-клетками, не сконструированными для экспрессии CD137 (4-1BB). Однако изобретение не ограничено определенными CAR. Напротив, в настоящем изобретении можно использовать любые CAR, взаимодействующие с В-клетками. Композиции и способы получения CAR описаны в РСТ/US11/64191, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

#### Способы

Изобретение относится к способам применения CAR и CAR Т-клеток по изобретению для истощения В-клеток и индукции толерантности. В одном из вариантов осуществления способ включает индукцию трансплантационной толерантности (например, трансплантата органа или ткани) у пациента. В другом варианте осуществления способ включает предотвращение и/или лечение GVHD. В конкретном варианте осуществления CAR по изобретению взаимодействует с CD19 на В-клетках.

В одном из вариантов осуществления способность индуцировать

устойчивую гуморальную толерантность донора является самым важным фактором для достижения устойчивой трансплантационной толерантности и/или предотвращения или лечения GVHD. Настоящее изобретение относится к применению CAR T-клеток по изобретению для истощения В-клеток и для индукции толерантности посредством введения CAR T-клеток животному, предпочтительно млекопитающему и наиболее предпочтительно человеку, для лечения одного или нескольких заболеваний, нарушений, симптомов или состояний, ассоциированных с трансплантацией органа или ткани (например, отторжение трансплантата, GVHD и/или ассоциированные с ними состояния).

Отторжение органа возникает в результате разрушения трансплантированной ткани иммунными клетками хозяина в ходе иммунного ответа. Аналогично, иммунный ответ также вовлечен в GVHD, однако в этом случае чужеродные трансплантированные иммунные клетки разрушают ткани хозяина. Например, отторжение органа и/или GVHD могут возникать после трансплантации сердца, сердечного клапана, легкого, почки, печени, поджелудочной железы, кишечника, кожи, кровеносных сосудов, костного мозга, стволовых клеток, кости или островковых клеток. Однако изобретение не ограничено конкретными типами трансплантации. В качестве неограничивающего примера, трансплантацию островковых клеток можно проводить для предотвращения возникновения диабета или для лечения диабета. Введение CAR T-клеток по изобретению, ингибирующих иммунный ответ, в частности пролиферацию, дифференцировку или выживание В-клеток, представляет собой эффективную терапию для предотвращения отторжения органа и/или ткани или GVHD. Введение CAR T-клеток по изобретению также можно использовать для индукции трансплантационной толерантности после проведения трансплантации органа и/или ткани.

CAR T-клетки по изобретению также можно использовать для индукции трансплантационной толерантности; для лечения, снижения, ингибирования и/или предотвращения отторжения трансплантата органа и/или ткани; и/или для снижения титра антител у пациента, которому трансплантировали орган или ткань. В одном из вариантов осуществления CAR T-клетки по изобретению

можно использовать для индукции трансплантационной толерантности у пациента посредством введения пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению, тем самым предотвращая или задерживая отторжение трансплантата. В другом варианте осуществления CAR T-клетки по изобретению можно использовать для лечения отторжения органа или трансплантата у пациента посредством введения пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению, тем самым ингибируя отторжение органа или ткани. В еще одном варианте осуществления CAR T-клетки по изобретению можно использовать для снижения титра антител у пациента, которому провели, или будут проводить, трансплантацию органа или ткани, посредством введения пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению, тем самым снижая титр антител.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу индукции трансплантационной толерантности у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению, что откладывает отторжение трансплантата у пациента.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения отторжения трансплантируемого органа или ткани у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению, что ингибирует отторжение трансплантируемого органа или ткани у пациента.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу снижения титра антител у пациента, которому провели, или будут проводить, трансплантацию органа или ткани, включающему введение пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению, что снижает титр антител у пациента.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу ингибирования или снижения выработки иммуноглобулина у пациента, включающему введение пациенту эффективного количества CAR T-клеток по изобретению.

В одном из вариантов осуществления CAR T-клетки по изобретению снижают или ингибируют функционирование В-клеток. В другом варианте осуществления CAR T-клетки по изобретению

истощают или уничтожают В-клетки индивидуума. Например, CAR Т-клетки по изобретению можно конструировать с тем, чтобы они взаимодействовали с В-клеточным поверхностным антигеном, обеспечивая возможность проявления эффекторных функций Т-клеток против В-клеток.

Терапия для ингибирования неблагоприятных иммунных ответов после проведения трансплантации

Настоящее изобретение относится к способу применения CAR Т-клеток по изобретению в качестве терапии для ингибирования GVHD или отторжения трансплантата после проведения трансплантации. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу воздействия на донорный трансплантат, например, биосовместимую решетку или донорную ткань, орган или клетку, CAR Т-клетками по изобретению перед, одновременно с или после проведения трансплантации трансплантата реципиенту. CAR Т-клетки по изобретению служат для смягчения, ингибирования или снижения неблагоприятного ответа донорного трансплантата против реципиента, обеспечивая предотвращение или лечение GVHD.

Как обсуждалось в других разделах настоящего документа, Т-клетки можно получать из любого источника, например, от донора ткани, реципиента трансплантата или другого неродственного источника (другого индивидуума или другого вида), для получения CAR Т-клеток по изобретению с целью применения для исключения или снижения нежелательного иммунного ответа трансплантата против реципиента трансплантата. Таким образом, CAR Т-клетки по изобретению могут быть аутологичными, аллогенными или ксеногенными по отношению к донору ткани, реципиенту трансплантата или другому неродственному источнику.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения трансплантат подвергают воздействию CAR Т-клеток по изобретению перед, одновременно с или после трансплантации трансплантата реципиенту. В этой ситуации иммунный ответ против трансплантата, вызванный любыми аллореактивными клетками реципиента, будет подавлен CAR Т-клетками по изобретению, присутствующими в трансплантате, поскольку CAR Т-клетки могут истощать В-клетки и стимулировать толерантность.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения донорный трансплантат можно "предварительно обрабатывать" или "предварительно подготавливать" посредством обработки трансплантата перед проведением трансплантации реципиенту с целью снижения иммуногенности трансплантата против реципиента, тем самым снижая и/или предотвращая GVHD или отторжение трансплантата. Трансплантат можно приводить в контакт с клетками или тканью реципиента перед проведением трансплантации с целью активации Т-клеток, которые могут быть ассоциированы с трансплантатом. После обработки трансплантата клетками или тканью реципиента клетки или ткань можно удалять из трансплантата. Обработанный трансплантат затем приводят в контакт с CAR Т-клетками по изобретению с целью снижения, ингибирования или исключения активности Т- и/или В-клеток, которые были активированы в результате обработки клеток или ткани реципиента. После такой обработки трансплантата CAR Т-клетками по изобретению CAR Т-клетки можно удалять из трансплантата перед проведением трансплантации реципиенту. Однако некоторые CAR Т-клетки могут прилипать к трансплантату и, таким образом, могут быть введены реципиенту вместе с трансплантатом. В такой ситуации CAR Т-клетки, введенные реципиенту, могут подавлять иммунный ответ против реципиента, вызванный любыми клетками, ассоциированными с трансплантатом. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, обработка трансплантата CAR Т-клетками перед проведением трансплантации трансплантата реципиенту служит для снижения, ингибирования или исключения активности активированных Т- и/или В-клеток, что позволяет предотвращать повторную стимуляцию или индуцировать пониженную реактивность Т- и/или В-клеток по отношению к антигенной стимуляции от ткани и/или клеток реципиента. Специалистам в данной области должно быть ясно на основе настоящего изобретения, что предварительная обработка или предварительная подготовка трансплантата перед проведением трансплантации может сокращать или исключать реакцию "трансплантат против хозяина".

Терапевтическое применение

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу клеточной терапии, при котором Т-клетки генетически модифицируют для обеспечения экспрессии CAR, а CAR Т-клетки вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Введенная клетка способна убить представляющую интерес клетку. В одном из вариантов осуществления представляющая интерес клетка представляет собой В-клетку. В отличие от способов лечения с применением антител, CAR Т-клетки способны реплицироваться *in vivo*, что обеспечивает их длительное сохранение, которое может приводить к устойчивому истощению В-клеток и толерантности.

В одном из вариантов осуществления CAR Т-клетки по изобретению могут подвергаться устойчивой экспансии Т-клеток *in vivo* и могут сохраняться в течение длительного периода времени. В другом варианте осуществления CAR Т-клетки по изобретению превращаются в специфичные Т-клетки памяти, которые можно повторно активировать для ингибирования В-клеточной пролиферации. Например, CART19 клетки вызывают иммунный ответ, специфичный к клеткам, экспрессирующим CD19.

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

В отношении иммунизации *ex vivo*, по меньшей мере одно из следующих действий проводят *in vitro* перед введением клетки в млекопитающее: i) экспансия клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в клетки, и/или iii) криоконсервация клеток.

Способы *ex vivo* хорошо известны в данной области и более подробно описаны ниже. В кратком изложении, клетки изолируют из млекопитающего (предпочтительно человека) и генетически модифицируют (т.е. трансфектируют или трансфицируют *in vitro*) с применением вектора, экспрессирующего CAR, описываемые в настоящем документе. CAR-модифицированную клетку можно вводить реципиенту-млекопитающему для получения терапевтического эффекта. Реципиент-млекопитающее может представлять собой человека, а CAR-модифицированная клетка может быть аутологичной



в отношении реципиента. Альтернативно, клетки могут быть аллогенными, сингенными или ксеногенными в отношении реципиента.

В дополнение к применению основанной на клетках вакцины в отношении иммунизации *ex vivo* настоящее изобретение также относится к композициям и способам для иммунизации *in vivo* с целью вызвать иммунный ответ, направленный против В-клеточного антигена, у пациента.

Как правило, клетки, активированные и подвергшиеся экспансии, как описано в настоящем документе, можно применять для истощения В-клеток и индукции толерантности. В частности, CAR-модифицированные Т-клетки по изобретению используют для лечения одного или нескольких заболеваний, нарушений, симптомов или состояний, ассоциированных с трансплантируемым органом или тканью (например, GVHD и/или ассоциированные с ней состояния). Таким образом, настоящее изобретение относится к способам для лечения или предотвращения отторжения органа и GVHD, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества CAR-модифицированных Т-клеток по изобретению.

В одном из вариантов осуществления CAR Т-клетки по изобретению вводят в сочетании с иммуносупрессорным средством. Можно использовать любое иммуносупрессорное средство, известное в данной области. Например, иммуносупрессорное средство может представлять собой Циклоспорин, Азатиоприн, Рапамицин, Микофенолата мофетил, Микофеноловую кислоту, Преднизон, Сиролимус, Базиликсимаб или Даклизумаб или любое их сочетание. Дополнительные конкретные иммуносупрессоры, которые можно использовать, в качестве неограничивающих примеров включают ORTHOCLONE ОКТ™ 3 (муромонаб-CD3), SANDIMMUNE™, NEORAL™, SANGDYA™ (циклоспорин), PROGRAF™ (FK506, такролимус), CELLCEPT™ (микофенолата мофетил, активный метаболит которого представляет собой микофеноловую кислоту), IMURAN™ (азатиоприн), глюкокортикостероиды, адренкортикостероиды, такие как DELTASONE™ (преднизон) и HYDELTRASOL™ (преднизолон), FOLEX™ и МЕХАТЕ™ (метотрексат), OXSORALEN-ULTRA™ (метоксален), RITUXAN™ (ритуксимаб) и RAPAMUNE™ (сиролимус).

CAR T-клетки по изобретению можно вводить пациенту перед, после или одновременно с иммуносупрессорным средством. Например, CAR T-клетки по изобретению можно вводить после того, как иммуносупрессорное средство вводят пациенту, или CAR T-клетки по изобретению можно вводить до того, как иммуносупрессорное средство вводят пациенту. Альтернативно, или кроме того, CAR T-клетки по изобретению вводят пациенту одновременно с иммуносупрессорным средством.

CAR T-клетки по изобретению и/или иммуносупрессорное средство можно вводить пациенту после трансплантации. Альтернативно, или кроме того, CAR T-клетки по изобретению и/или иммуносупрессорное средство можно вводить пациенту перед трансплантацией. CAR T-клетки по изобретению и/или иммуносупрессорное средство также можно вводить пациенту во время операции по трансплантации.

В некоторых вариантах осуществления способ введения CAR T-клеток по изобретению пациенту применяют после начала иммуносупрессивной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ применяют более одного раза, например, для мониторинга реципиента трансплантата в течение продолжительного времени, и, при необходимости, с применением различных режимов иммуносупрессивной терапии. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивную терапию сокращают, если ожидается, что реципиент трансплантата является толерантным к трансплантату. В некоторых вариантах осуществления не прописывают никакой иммуносупрессивной терапии, например, иммуносупрессивную терапию не применяют, если ожидается, что реципиент трансплантата является толерантным к трансплантату. Если реципиент трансплантата демонстрирует наличие биомаркеров нетолерантности, иммуносупрессивную терапию можно возобновлять или продолжать на стандартном уровне.

Трансплантируемый орган или ткань могут представлять собой сердце, сердечный клапан, легкое, почку, печень, поджелудочную железу, кишечник, кожу, кровеносные сосуды, костный мозг, стволовые клетки, кости или островковые клетки.

CAR T-клетки по изобретению можно вводить после постановки

диагноза отторжения трансплантируемого органа или ткани, после чего вводят дозы как CAR T-клеток по изобретению, так и иммуносупрессорного средства до тех пор, пока не исчезают симптомы отторжения органа или ткани.

В некоторых вариантах осуществления CAR T-клетки по изобретению вводят после постановки диагноза повышенного титра антител, после чего вводят дозы как CAR T-клеток по изобретению, так и иммуносупрессорного средства до тех пор, пока титры антител не снижаются.

Предпочтительно лечение с применением CAR T-клеток по изобретению проводят посредством введения эффективного количества CAR T-клеток по изобретению пациенту.

CAR T-клетки по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в составе фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. В кратком изложении, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать популяции клеток-мишеней, как описано в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; вспомогательные средства (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для подлежащего лечению (или предотвращению) заболевания. Количество и частота введения должна определяться такими факторами как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозы можно определять посредством клинических испытаний.

Когда указывают "эффективное количество", точное количество

композиций по настоящему изобретению, подлежащих введению, может определяться врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, титре антител и состояния пациента (индивидуума). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описываемые в настоящем документе, можно вводить в дозе от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все промежуточные значения в пределах этих диапазонов. Композиции Т-клеток в этих дозах также можно вводить многократно. Клетки можно вводить посредством способов инфузии, общеизвестных в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Оптимальные дозы и схемы лечения для конкретного пациента могут легко определяться специалистами в данной области медицины посредством мониторинга пациента на признаки заболевания и изменения лечения на основе этого.

В определенных вариантах осуществления может возникать необходимость доставлять активированные Т-клетки индивидууму, а затем забирать кровь (или проводить аферез), активировать содержащиеся в ней Т-клетки по настоящему изобретению и проводить реинфузию этих активированных и подвергшихся экспансии Т-клеток пациенту. Этот способ можно применять много раз каждые несколько недель. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать в образце крови объемом от  $10 \text{ см}^3$  до  $400 \text{ см}^3$ . В определенных вариантах осуществления Т-клетки активируют в образцах крови объемом  $20 \text{ см}^3$ ,  $30 \text{ см}^3$ ,  $40 \text{ см}^3$ ,  $50 \text{ см}^3$ ,  $60 \text{ см}^3$ ,  $70 \text{ см}^3$ ,  $80 \text{ см}^3$ ,  $90 \text{ см}^3$  или  $100 \text{ см}^3$ . Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, этот протокол с применением повторных заборов/реинфузий крови можно применять для отбора определенных популяций Т-клеток.

Введение индивидууму композиции можно проводить любым подходящим способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, прием внутрь, переливание крови, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описываемые в настоящем документе, можно вводить пациенту подкожно, интрадермально, внутриопухолевым введением, внутриузловым введением, внутримозговым введением, внутримышечно, посредством внутривенной (в/в) инъекции или

интраперитонеально. В одном из вариантов осуществления композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят пациенту посредством интрадермальной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления композиции Т-клеток по настоящему изобретению предпочтительно вводят посредством в/в инъекции. Композиции Т-клеток можно инъецировать непосредственно внутрь опухоли, лимфоузла или места инфекции.

В определенных вариантах настоящего изобретения клетки, активированные и подвергшиеся экспансии с применением способов, описываемых в настоящем документе, или других известных в данной области способов, в которых Т-клетки подвергаются экспансии до достижения терапевтических уровней, вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) любым количеством подходящих способов лечения, включающих в качестве неограничивающих примеров лечение средствами, такими как противовирусная терапия, цидофовир и интерлейкин-2, Цитарабин (также известный как АРА-С) или натализумаб для пациентов с рассеянным склерозом или эфализумаб для пациентов с псориазом или другие способы лечения для пациентов с прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатией. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапией, радиацией, иммуносупрессирующими средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как САМ РАТН, антитела к CD3 или другие терапии с применением антител, цитоксин, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228, цитокины и облучение. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая играет важную роль в индуцированных факторами роста молекулярных каскадах (рапамицин) (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления клеточные композиции по настоящему изобретению вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после)

трансплантацией костного мозга, разрушающей Т-клетки терапией с применением либо средств химиотерапии, таких как флударабин, наружная дистанционная лучевая терапия (ХРТ), циклофосфамид, либо антител, таких как ОКТЗ или КЭМПАС. В другом варианте осуществления клеточные композиции по настоящему изобретению вводят после разрушающей В-клетки терапии, такой как терапия с применением средств, взаимодействующих с CD20, например, Ритуксана. Например, в одном из вариантов осуществления индивидуумы могут подвергаться стандартному лечению с применением высокодозной химиотерапии после трансплантации стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации индивидуумы получают инфузию подвергшихся экспансии иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления подвергшиеся экспансии клетки вводят до или после операции.

Дозы приведенных выше средств, подлежащие доставке пациенту, варьируют в зависимости от конкретного типа состояния, подлежащего лечению, и реципиента лечения. Определение доз для введения человеку можно проводить согласно принятым в данной области способам. Например, доза для КЭМПАС, как правило, находится в диапазоне от 1 до приблизительно 100 мг для взрослого пациента и, как правило, вводится ежедневно в течение от 1 до 30 суток. Предпочтительная суточная доза составляет от 1 до 10 мг в сутки, хотя в некоторых случаях можно использовать более высокие дозы до 40 мг в сутки (описано в патенте США № 6120766).

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Изобретение далее описано детально посредством ссылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры приведены исключительно с иллюстративными целями и не предназначены для ограничения, если не указано иначе. Таким образом, изобретение не должно рассматриваться как ограниченное приведенными ниже примерами, а должно рассматриваться как включающее любые и все вариации, являющиеся результатом идеи изобретения, приведенной в настоящем документе.

Без дальнейших описаний полагают, что специалисты в данной

области могут, используя приведенное выше описание и приведенные ниже иллюстративные примеры, получать и применять соединения по настоящему изобретению и применять приведенные способы. Приведенные ниже демонстрационные примеры, таким образом, специфически указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие остальные части описания изобретения.

Пример 1: Т-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, истощают нормальные В-клетки и стимулируют толерантность

Результаты, описанные в настоящем документе, указывают на то, что клетки CART19 сохраняются и обеспечивают терапевтический эффект у пациента в течение по меньшей мере 18 месяцев. Генно-инженерные Т-клетки, подвергшиеся более чем тысячекратной экспансии *in vivo*, транспортировались в костный мозг и продолжали экспрессировать функциональные CAR на высоких уровнях в течение по меньшей мере 6 месяцев. В среднем каждая введенная CAR+ Т-клетка уничтожала по меньшей мере 1000 клеток CLL. Специфичный к CD19 иммунный ответ наблюдался в крови и костном мозге и сопровождался полной ремиссией у двух из трех пациентов. Часть клеток сохранялась в виде CAR+ Т-клеток памяти, что указывает на потенциал этого не ограниченного МНС подхода для эффективного лечения В-клеточных злокачественных новообразований.

Ниже описаны материалы и способы, использованные в этих экспериментах.

#### Материалы и способы

##### Дизайн протокола

Клиническое испытание (NCT01029366) проводили, как описано в PCT/US11/64191, который полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки.

##### Получение вектора

Трансген CD19-BB-z (GeMCRIS 0607-793) разрабатывали и конструировали, как описано (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17: 1453-1464). Lentивирусный вектор получали согласно текущим правилам организации производства и контроля качества лекарственных средств посредством способа с применением трех

плазмид в Lentigen Corporation, как описано (Zufferey et al., 1997, Nature biotechnol 15:871-875).

#### Получение клеточного продукта CART19

Способы получения Т-клеток с применением парамагнитных полистироловых гранул, покрытых моноклональными антителами к CD3 и CD28, описаны (Laport et al., 2003, Blood 102: 2004-2013). Лентивирусную трансдукцию проводили, как описано (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17372-17377).

Ниже описаны результаты экспериментов.

#### Экспансия *in vivo* и сохранение CART19 и транспортировка в костный мозг

CAR+ Т-клетки, подвергшиеся экспансии с применением CD3/CD28 гранул и экспрессирующие сигнальный домен 4-1BB, считают усовершенствованием CAR, лишенных 4-1BB. Был проведен анализ посредством количественной ПЦР для обеспечения отслеживания количества клеток CART19 в крови и костном мозге. У всех пациентов наблюдалась экспансия и сохранение CART19-клеток в крови в течение по меньшей мере 6 месяцев, как показано на фиг. 1A и 1C. Надо отметить, что у пациентов UPN 01 и UPN 03 наблюдалась 1000-10000-кратная экспансия CAR+ Т-клеток в крови в течение первых месяцев после инфузии. Самые высокие уровни экспансии совпадали с появлением постинфузионных клинических симптомов у пациента UPN 01 (сутки 15) и пациента UPN 03 (сутки 23). Кроме того, после начального распада, который можно моделировать с применением кинетики первого порядка, уровни CART19 Т-клеток стабилизировались у всех 3 пациентов через 90-180 суток после инфузии. Важно отметить, что CART19 Т-клетки также транспортировались в костный мозг у всех пациентов, хотя и на уровнях, в 5-10 раз более низких, чем уровни, которые наблюдались в крови, как показано на фиг. от 1D до 1F. У пациентов UPN 01 и 03 наблюдался линейно-логарифмический распад в костном мозге, с исчезновением  $T_{1/2}$  в течение около 35 суток.

#### Пролонгированная экспрессия и образование популяции клеток памяти CART19 в крови

Основной вопрос в CAR-опосредованной иммунотерапии злокачественных опухолей заключается в том, может ли



оптимизированная обработка клеток и применение костимулирующих доменов улучшить выживаемость генетически модифицированных Т-клеток и обеспечить образование CAR+ Т-клеток памяти у пациентов. Предыдущие исследования не продемонстрировали устойчивой экспансии, продолжительной выживаемости и/или экспрессии CAR на Т-клетках после инфузии (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110). Анализ образцов из крови и костного мозга через 169 суток после инфузии посредством проточной цитометрии показал наличие CAR19-экспрессирующих клеток у UPN 03 (фиг. 2А и 2В) и отсутствие В-клеток, как показано на фиг. 2А. Нужно отметить, что посредством анализа с применением количественной ПЦР у всех трех пациентов были обнаружены сохраняющиеся CAR+ клетки через 4 месяца и больше, как показано на фиг. 1 и фиг. 4. Встречаемость CAR+ клеток *in vivo*, подсчитанная посредством проточной цитометрии, близко соответствовала значениям, полученным посредством ПЦР для трансгена CART19. Важно отметить, что у пациента UPN 03 только CD3+ клетки экспрессировали CAR19, поскольку CAR19+ клетки не обнаруживались в CD16- или CD14-положительных субпопуляциях, как показано на фиг. 2А. Экспрессия CAR также была обнаружена на поверхности 4,2% Т-клеток в крови пациента UPN 01 через 71 сутки после инфузии, как показано на фиг. 5.

Затем полихроматическую проточную цитометрию использовали для проведения детального анализа для дальнейшего изучения экспрессии, фенотипа и функций CART19 клеток у UPN 03 с применением анти-CAR идиодипичных антител (MDA-647) и стратегии гейтирования, показанной на фиг. 6. Наблюдали заметные различия в экспрессии маркеров памяти и активации CD8+ и CD4+-клетками на основе экспрессии CAR19. Через 56 суток CART19 CD8+ клетки демонстрировали преимущественно эффекторный фенотип памяти (CCR7-CD27-CD28-), соответствующий продолжительной и устойчивой экспозиции к антигену, как показано на фиг. 2С. Напротив, CAR-отрицательные CD8+ клетки состояли из смеси эффекторных и центральных клеток памяти, с экспрессией CCR7 в субпопуляции

клеток и значительными количествами во фракциях CD27+/CD28- и CD27+/CD28+. В то время как CART19 и CAR-отрицательные популяции клеток в значительной степени экспрессировали CD57, эта молекула коэкспрессировалась одинаково с PD-1 в CART19 клетках, что предположительно отражает длинную репликативную историю этих клеток. В отличие от CAR-отрицательной популяции клеток, вся CART19 CD8+ популяция была лишена экспрессии CD25 и CD127. На 168 сутки, в то время как фенотип популяции CAR-отрицательных клеток оставался таким же, как в образце, взятом на 56 сутки, популяция CART19 стала содержать небольшую популяцию с признаками центральных клеток памяти, заметной экспрессией CCR7, более высокими уровнями CD27 и CD28, а также CAR+ клетками, которые были PD-1-отрицательными, CD57-отрицательными и CD127-положительными.

В компартменте CD4+ на 56 сутки CART19 клетки характеризовались равномерным отсутствием CCR7 и доминированием CD27+/CD28+/PD-1+ клеток, распределенных по компартментам CD57+ и -, и существенно важным отсутствием экспрессии CD25 и CD127, как показано на фиг. 2B. Напротив, CAR-отрицательные клетки в этот момент времени были гетерогенны в отношении экспрессии CCR7, CD27 и PD-1, экспрессировали CD127, а также содержали большую популяцию CD25+/CD127- (потенциальные регуляторные Т-клетки). На 169 сутки, в то время как экспрессия CD28 оставалась стабильно положительной во всех CAR+CD4+-клетках, фракция CART19 CD4+-клеток приобрела фенотип центральной памяти с экспрессией CCR7, более высоким процентным содержанием CD27-клеток, появлением PD-1-отрицательной субпопуляции и появлением экспрессии CD127. CAR-отрицательные клетки оставались в значительной степени соответствующими их эквивалентам, взятым на 56 сутки, за исключением снижения экспрессии CD27 и снижения процентного содержания CD25+/CD127-клеток.

CART19 клетки могут сохранять эффекторную функцию после 6 месяцев в крови

В дополнение к непродолжительному сохранению и недостаточной пролиферации *in vivo*, ограничением предыдущих исследований с применением CAR+ Т-клеток была быстрая потеря функциональной

активности введенных Т-клеток *in vivo*. Высокий уровень выживаемости CART19 клеток и поверхностной экспрессии молекулы CAR19 у пациентов UPN 01 и 03 предоставили возможность непосредственно проанализировать анти-CD19-специфичные эффекторные функции в клетках, восстановленных из криоконсервированных образцов периферической крови. РВМС от пациента UPN 03 культивировали с клетками-мишенями, которые были либо положительными, либо отрицательными по экспрессии CD19 (фиг. 2D). Устойчивая CD19-специфичная эффекторная функция CART19 Т-клеток была продемонстрирована посредством специфичной дегрануляции против CD19-положительных, но не CD19-отрицательных клеток-мишеней, что оценивали по поверхностной экспрессии CD107a. Нужно отметить, что экспозиция популяции CART19 к CD19-положительным мишеням индуцировала быструю интернализацию поверхностного CAR-19, как показано на фиг. 6 для поверхностной экспрессии CAR19 в тех же эффекторных клетках при стандартном окрашивании для проточной цитометрии. Наличие костимулирующих молекул на клетках-мишенях не было необходимым для запуска дегрануляции CART19 клеток, поскольку линия NALM-6 не экспрессирует CD80 или CD86 (Brentjens et al., 2007, Clin Cancer Res 13:5426-5435). Эффекторная функция была выражена на 56 сутки после инфузии и сохранялась на 169 сутки. Устойчивая эффекторная функция CAR+ и CAR-T-клеток также была продемонстрирована посредством фармакологической стимуляции.

#### Клиническая активность CART19 клеток

Ни у одного из пациентов не было обнаружено никаких значительных токсических эффектов в течение четырех суток после инфузии, не считая временных фебрильных реакций. Однако затем у всех пациентов развились значительные клинические и лабораторные токсические эффекты в период между 7 и 21 сутками после первой инфузии. Эти токсические эффекты были кратковременными и обратимыми. Из трех пациентов, получавших лечение на сегодняшний день, у 2 наблюдался полный ответ, а у 1 наблюдался частичный ответ через >6 месяцев после инфузии CART19, согласно стандартным критериям (Hallek et al., 2008, Blood 111:5446). Детали истории

болезни (анамнез) и ответ на лечение для каждого пациента показаны на фиг. 7.

Вкратце, у пациента UPN 01 развился фебрильный синдром с дрожью и временной гипертензией, начавшийся через 10 суток после инфузии. Лихорадка продолжалась в течение приблизительно 2 недель и затем закончилась; после этого у пациента не наблюдалось никаких системных симптомов. У пациента развился быстрый и полный ответ, как показано на фиг. 3. Через 1-6 месяцев после инфузии проточная цитометрия не продемонстрировала циркулирующих клеток CLL в крови. Костный мозг через 1, 3 и 6 месяцев после инфузии CART19 клеток продемонстрировал устойчивое отсутствие лимфоцитарного инфильтрата, как показано посредством морфологического анализа и проточной цитометрии, как показано на фиг. 3В. Срезы КТ через 1 и 3 месяцев после инфузии продемонстрировали исчезновение аденопатии, как показано на фиг. 3С. Полная ремиссия на момент написания данной заявки наблюдалась в течение 10+ месяцев.

Пациент UPN 02 получал 2 цикла бендамустина с ритуксимабом, что привело к стабильному заболеванию, как показано на фиг. 3А. Пациент получил третью дозу бендамустина в качестве истощающей лимфоциты химиотерапии перед инфузией CART19 Т-клеток. У пациента развилась лихорадка, достигающая 40°C, дрожь и одышка, что потребовало круглосуточной госпитализации на 11 сутки после первой инфузии и в день получения второй дозы CART19 клеток. Лихорадка и системные симптомы сохранялись и на 15 сутки, у пациента наблюдалась временная дисфункция сердца; все симптомы исчезли после того, как на 18 сутки начали лечение кортикостероидами. После инфузии CART19, которая совпала с повышением температуры тела, у пациента наблюдалось быстрое выведение p53-дефицитных клеток CLL из периферической крови, как показано на фиг. 3А, и частичное снижение аденопатии, костный мозг продемонстрировал устойчивую сильную инфильтрацию CLL через один месяц после лечения, несмотря на значительную клеточную редукцию в периферической крови. Пациент остается клиническим здоровым.

Пациент UPN 03 получал пентостатин и циклофосфамид в качестве истощающей лимфоциты химиотерапии перед инфузией CART19 клеток. Через трое суток после химиотерапии, но перед инфузией клеток, костный мозг был гиперклеточным (60%) с приблизительно 50% вовлечением CLL. Пациент получил низкую дозу CART19 клеток ( $1,5 \times 10^5$  CAR+ T-клеток/кг, распределенные на 3 суток). Аналогичным образом, никаких острых токсических эффектов инфузии не наблюдалось. Однако через 14 суток после первой инфузии у пациента появились дрожь, лихорадка, тошнота и диарея. Через 22 суток после инфузии был диагностирован синдром лизиса опухоли, потребовавший госпитализации. У пациента исчезли системные симптомы, и в течение продолжавшихся 1 месяц инфузий CART19 у пациента наблюдалось выведение циркулирующих CLL из крови и костного мозга, как показано посредством морфологического анализа, проточной цитометрии, цитогенетического анализа и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Срезы КТ продемонстрировали исчезновение аномальной аденопатии, как показано на фиг. 3В и 3С. Полная ремиссия сохранялась в течение более 8 месяцев после первой инфузии CART19 клеток.

#### Обсуждение соотношения эффектора CART19 к клеткам-мишеням CLL *in vivo*

Доклинические исследования показали, что крупные опухоли можно разрушать, и что инфузия  $2,2 \times 10^7$  CAR позволяет уничтожать опухоли, состоящие из  $1 \times 10^9$  клеток, с соотношением E:T *in vivo*, составляющим 1:42 для гуманизированных мышей (Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360–3365), хотя эти подсчеты не учитывали экспансию T-клеток после инъекции. Оценка опухолевой массы CLL в течение времени позволила подсчитать уменьшение размеров опухоли и соотношения E:T CART19, достигнутые *in vivo* у трех индивидуумов, на основе числа введенных CAR+ T-клеток. Опухолевые массы рассчитывали посредством измерения массы CLL в костном мозге, крови и вторичных лимфоидных тканях. Базовые значения опухолевой массы, как показано на фиг. 7, указывают на то, что у каждого пациента наблюдалось порядка  $10^{12}$  клеток CLL (т.е. 1 кг опухолевой массы)

перед инфузией CART19. У пациента UPN 03 наблюдалось базовое значение опухолевой массы, составлявшее  $8,8 \times 10^{11}$  клеток CLL в костном мозге, на -1 сутки (т.е. после химиотерапии и перед инфузией CART19), а масса опухоли во вторичной лимфоидной ткани составляла  $3,3-5,5 \times 10^{11}$  клеток CLL, в зависимости от способа получения объемных срезов КТ. С учетом того, что UPN 03 вводили только  $1,4 \times 10^7$  CART19 клеток, с применением оценки общей опухолевой массы ( $1,3 \times 10^{12}$  клеток CLL), а также с учетом того, что после лечения не наблюдалось клеток CLL, было достигнуто значительное соотношение Е:Т, составляющее 1:93000. Посредством аналогичных подсчетов для UPN 01 и UPN 02 получили эффективные соотношения Е:Т *in vivo*, составляющие 1:2200 и 1:1000. Наконец, убийства CART19 Т-клетками в сочетании с >1000-кратной экспансией CART19 *in vivo* предположительно внесли вклад в сильный антилейкозный эффект, опосредованный CART19 клетками.

Т-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы, обеспечивают память и сильный противоопухолевый эффект у пациентов с поздней стадией лейкоза

Ограниченная экспрессия *in vivo* и эффекторная функция CAR были главным ограничением в испытаниях CAR первого поколения (Kershaw et al., 2006, Clin Cancer Res 12:6106-6115; Lamers et al., 2006, J Clin Oncol 24:e20-e22; Till et al., 2008, Blood, 112, 2261-2271; Park et al., 2007, Mol Ther 15:825-833; Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270). На основе доклинического моделирования, продемонстрировавшего повышенную выживаемость CAR, содержащих сигнальный модуль 4-1BB (Milone et al., 2009, Mol Ther. 17: 1453-1464; Carpenito et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA 106:3360-3365), были разработаны эксперименты для получения CAR второго поколения, сконструированных с применением технологии лентивирусного вектора. Было показано, что эти CAR второго поколения являются безопасными в исследовании хронической инфекции ВИЧ (Levine et al., 2006, Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17372-17377). Данные результаты указывают на то, что когда эти CAR второго поколения были экспрессированы в Т-клетках и культивированы в условиях, разработанных для

обеспечения приживления Т-клеток центральной памяти (Rapoport et al., 2005, Nat Med 11: 1230-1237; Bondanza et al., 2006, Blood 107: 1828-1836), наблюдалась повышенная экспансия CAR Т-клеток после инфузии по сравнению с предыдущими исследованиями. CART19 клетки приобретали CD19-специфичную клеточную память и убивали опухолевые клетки с ранее не достигаемыми значениями соотношения E:T *in vivo*.

CART19 представляет собой первое испытание CAR с применением сигнального домена 4-1BB и первое испытание с применением технологии лентивирусного вектора. Представленные результаты демонстрируют эффективную транспортировку CAR к местам опухоли, а также *de facto* появление "проникающих в опухоль лимфоцитов", которые проявляют CD19-специфичность. Выраженная экспансия *in vivo* позволила впервые продемонстрировать, что CAR, напрямую полученные от пациентов, могут сохранять эффекторную функцию *in vivo* в течение нескольких месяцев. Предыдущее исследование позволило предположить, что введение CAR первого поколения в вирус-специфичные Т-клетки является предпочтительным для первичных Т-клеток (Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270), однако результаты, полученные для CAR второго поколения, введенных в оптимальным образом костимулированные первичные Т-клетки, ставят это предположение под сомнение. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, было высказано предупреждение о том, что клинические эффекты были выраженными и беспрецедентными в отношении лизиса 1-килограммовых опухолевых масс у всех трех пациентов, сопровождавшегося отсроченной выработкой цитокинов на потенциально опасных высоких уровнях у двух пациентов. Классический эффект "цитокиновой бури" не наблюдался. Однако настоящее исследование было разработано с целью снижения этой возможности посредством медленной инфузии CART19 в течение трех суток.

Выявлено, что очень низкие дозы CAR могут вызывать сильные клинические ответы. В пилотном исследовании была продемонстрирована безопасность вектора CART19. Тот факт, что дозы CART19 клеток, на несколько порядков более низкие, чем исследованные в предыдущих испытаниях, могут иметь клиническое

преимущество, имеет важное значение для дальнейшей реализации терапии с применением CAR в более широком масштабе, а также для дизайна испытаний, исследующих CAR, направленных против мишеней, отличных от CD19.

Настоящие исследования также указывают на то, что CART19 экспрессируется как в клетках центральной памяти, так и в эффекторных Т-клетках, и это предположительно вносит вклад в их длительную выживаемость по сравнению с предыдущими исследованиями. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, CAR Т-клетки могут дифференцироваться *in vivo* в подобные клеткам центральной памяти клетки при встрече и последующем уничтожении клеток-мишеней (например, опухолевых клеток CLL или нормальных В-клеток), экспрессирующих этот суррогатный антиген. Фактически показано, что активация 4-1BB стимулирует развитие памяти в отношении сигнального пути TCR (Sabbagh et al., 2007, Trends Immunol 28:333-339).

Повышенная пролиферация и выживаемость CART19 позволили раскрыть аспекты фармакокинетики CAR Т-клеток, которые ранее оставались неизвестными. Показано, что кинетика выработки цитокинов в плазме крови и костном мозге коррелирует с пиковыми уровнями CART19, поэтому возможно, что распад инициируется, когда клеточные мишени, экспрессирующие CD19, становятся ограничивающим фактором. Механизм повышенной выживаемости CART19 может иметь отношение к указанному выше включению домена 4-1BB или к сигнальному пути естественных TCR и/или CAR. Перспективная возможность заключается в том, что повышенная выживаемость связана с популяцией CART19, идентифицированной в образцах костного мозга, что позволяет высказать гипотезу о том, что CD19 CAR можно поддерживать посредством взаимодействия с предшественниками В-клеток в костном мозге. С этим вопросом связан вопрос о том, что именно стимулирует исходную экспансию CART19 клеток *in vivo*. За некоторыми редкими исключениями (Savoldo et al., 2011, J Clin Invest doi: 10.1172/JCI46110; Pule et al., 2008, Nat Med 14: 1264-1270), настоящее исследование представляет собой единственное исследование, в котором не применяли инфузии IL-2, в результате чего CART19 клетки



предположительно подвергались экспансии под воздействием гомеостатических цитокинов или, более вероятно, под воздействием CD19, экспрессирующегося на лейкозных клетках-мишенях и/или нормальных В-клетках. В последнем случае это может представлять собой полезное свойство для CAR, направленных против мишеней на нормальных APC, таких как CD19 и CD20, поскольку возможно, что самоподдержание CART19 происходит на нормальных клетках, обеспечивая механизм образования памяти CAR посредством "самовакцинации/повторной иммунизации" и, соответственно, длительный иммунологический надзор над опухолью. Механизмы гомеостаза CART19 могут требовать дальнейших исследований для прояснения внутренних и внешних клеточных механизмов выживаемости. До появления этих результатов многие исследователи рассматривали терапию CAR в качестве временной формы иммунотерапии, однако CAR с оптимизированными сигнальными доменами могут вносить вклад как в стимулирование, так и в консолидацию ремиссии, а также в длительный иммунологический надзор.

Сильные антилейкозные эффекты наблюдались у всех трех пациентов, включая двух пациентов с p53-дефицитным лейкозом. В предыдущих исследованиях с применением CAR наблюдались трудности с выделением противоопухолевых эффектов истощающей лимфоциты химиотерапии. Однако отложенная выработка цитокинов в сочетании с кинетикой лизиса опухоли у резистентных к флударабину пациентов, совпадающая и, возможно, зависящая от экспансии CAR *in vivo*, показанная в настоящем исследовании, указывает на то, что CART19 опосредуют сильные противоопухолевые эффекты. Настоящие результаты не исключают роли химиотерапии в усилении эффектов CAR.

Для полного понимания ключевых факторов, необходимых для получения устойчивого функционирования CAR T-клеток *in vivo*, может потребоваться тщательное сравнение способов получения векторов, трансгенов и клеток с результатами исследований, проходящих в других центрах. В отличие от способов лечения с применением антител, CAR-модифицированные T-клетки способны реплицироваться *in vivo*, а их длительное сохранение может

обеспечивать устойчивый контроль опухоли. Доступность готового к применению способа лечения, включающего киллерные Т-клетки без перекрестной устойчивости, потенциально полезна для улучшения клинического исхода у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями. Ограничение способа лечения с применением антител, такого, например, как способа лечения с применением таких средств как ритуксимаб и бевацизумаб, заключается в том, что такой способ лечения требует многократных инфузий антител, что неудобно и дорого. Применение пролонгированного способа лечения с применением антител (в этом случае в течение по меньшей мере 6 месяцев у 3 из 3 пациентов, получавших лечение на настоящий момент) с анти-CD19 scFv, экспрессирующимися на Т-клетках после одной инфузии CART19 клеток, имеет ряд практических преимуществ, включая удобство и экономию затрат.

#### Устойчивая детекция CART19 через восемнадцать месяцев после инфузии

Результаты, приведенные в настоящем документе, демонстрируют длительную экспрессию CART19 и глубокую В-клеточную аплазию (фиг. 8 и 9), а также уменьшение количества плазматических клеток у всех 3 пациентов (фиг. 10). Самый неожиданный результат испытания CART19 заключается в том, что CART19 клетки, содержащие мышиный scFv, проявляющий высокоиммуногенные фенотипы, фактически не отторгались иммунной системой пациента-хозяина. Это позволяет предположить, что CART19 клетки истощают нормальные В-клетки у пациента-хозяина и в результате индуцируют толерантность.

Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, CART19 клетки можно использовать в следующих областях применения: 1) пациенты, которым проводят трансплантацию цельного органа, положительные по перекрестной совместимости; уничтожение уже существующих В-клеток памяти может позволить проводить трансплантацию органов, в настоящее время невозможную у таких иммунизированных пациентов; 2) индукция толерантности к иммуногенным белкам, которые вводят пациентам (например, гемофилия); 3) ритуксимаб проявляет терапевтическую эффективность при артрите и других аутоиммунных нарушениях;

CART19 может проявлять такую же или более высокую эффективность.

В некоторых случаях CART19 клетки можно использовать для уничтожения всех субпопуляций В-клеток (т.е. наивных клеток, клеток памяти, предшественников плазматических клеток и "супрессорных В-регуляторных клеток"). В-регуляторные клетки могут вносить вклад в иммуносупрессию некоторых злокачественных опухолей, и, таким образом, CART19 могут улучшать иммунные ответы посредством удаления В-регуляторных клеток.

Описания всех и каждого патентов, патентных заявок и публикаций, процитированных в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ в качестве ссылок. Хотя данное изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, должно быть ясно, что другие варианты осуществления и вариации по настоящему изобретению могут быть осуществлены другими специалистами в данной области без отступления от существа и объема изобретения. Прилагаемая формула изобретения предназначена для включения всех таких вариантов осуществления и эквивалентных вариаций.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ предотвращения или задержки отторжения трансплантируемой ткани или органа у нуждающегося в этом индивидуума, при этом способ включает:

(a) определение индивидуума, где индивидуум является кандидатом на трансплантацию ткани или органа, или подвергся трансплантации ткани или органа; и

(b) введение индивидууму эффективного количества генетически модифицированной клетки для индукции устойчивой В-клеточной аплазии у индивидуума;

при этом CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимулирующий сигнальный участок и сигнальный домен CD3-зета, где антигенсвязывающий домен нацелен на В-клеточный маркер; и, где генетически модифицированную клетку вводят до, во время или после трансплантации ткани или органа индивидууму.

2. Способ по п. 1, в котором ткань или орган контактируют с генетически модифицированной клеткой перед трансплантацией ткани или органа индивидууму.

3. Способ по п. 1, в котором генетически модифицированная клетка:

(a) индуцирует В-клеточную аплазию путем истощения нормальных В-клеток; или

(b) является аутологичной, аллогенной или ксеногенной по отношению к (i) ткани или органу или (ii) индивидууму.

4. Способ по п. 3, дополнительно включающий оценку истощения нормальных В-клеток у индивидуума по меньшей мере один раз через двенадцать или восемнадцать месяцев после введения генетически модифицированной клетки.

5. Способ по п. 3, в котором:

(a) нормальные В-клетки выбраны из группы, состоящей из наивной В-клетки, В-клетки памяти, предшественника плазматических клеток и супрессорной В-регуляторной клетки (Breg);

(b) истощение нормальных В-клеток частичное или полное; и/или

(c) истощение нормальных В-клеток составляет 25% или более.

6. Способ по п. 1, в котором генетически модифицированная клетка реплицируется *in vivo*, что приводит к длительному сохранению.

7. Способ по п. 6, в котором В-клеточная аплазия сохраняется в течение по меньшей мере приблизительно восемнадцати месяцев после введения индивидууму генетически модифицированной клетки.

8. Способ по п. 1, в котором В-клеточный маркер выбран из группы, состоящей из CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 и CD86.

9. Способ по п. 1, в котором В-клеточный маркер представляет собой CD19.

10. Способ по п. 1, в котором костимулирующий сигнальный участок представляет собой сигнальный домен молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C и B7-H3.

11. Способ по п. 1, в котором антигенсвязывающий домен связывается с CD19 на В-клетке и костимулирующий сигнальный участок представляет собой костимулирующий сигнальный участок 4-1BB.

12. Способ по п. 1, в котором истощение В-клеток включает *in vivo* толерантность к чужеродной ткани или иммуногенному белку.

13. Способ по п. 12, в котором чужеродная ткань представляет собой трансплантат костного мозга, трансплантат органа или переливаемую кровь.

14. Способ по п. 1, в котором ткань или орган представляет собой сердце, сердечный клапан, легкое, почку, печень, поджелудочную железу, кишечник, кожу, кровеносный сосуд, костный мозг, стволовую клетку, кость, иммунную клетку или островковую клетку.

15. Способ стимулирования иммунологической толерантности у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества генетически модифицированной клетки, содержащей CAR, где:

(a) CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимулирующий

сигнальный участок и сигнальный домен CD3-зета, где антигенсвязывающий домен нацелен на В-клеточный маркер;

(b) генетически модифицированная клетка подвергается более чем тысячекратной экспансии у индивидуума; и

(c) модифицированная клетка является обнаруживаемой в течение приблизительно восемнадцати или более месяцев после введения.

16. Способ по п. 14, в котором иммунологическая толерантность представляет собой толерантность к трансплантированной ткани или органу.

17. Способ по п. 14, в котором наличие клеток, экспрессирующих CAR, у индивидуума оценивают по меньшей мере один раз через приблизительно двенадцать, приблизительно восемнадцать или более месяцев после введения генетически модифицированной клетки.

18. Способ лечения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD) у индивидуума, нуждающегося в трансплантации ткани или органа, где способ включает:

(a) определение индивидуума, при этом индивидуум является кандидатом на трансплантацию ткани или органа, или подвергся трансплантации ткани или органа; и

(b) введение индивидууму эффективного количества генетически модифицированной клетки для индукции В-клеточной аплазии у индивидуума;

при этом CAR содержит антигенсвязывающий домен, костимулирующий сигнальный участок и сигнальный домен CD3-зета, где антигенсвязывающий домен нацелен на В-клеточный маркер; и, где генетически модифицированную клетку вводят до, во время или после трансплантации ткани или органа индивидууму.

19. Способ по п. 18, дополнительно включающий применение индивидууму эффективного количества наружной дистанционной лучевой терапии.

20. Способ по п. 18, дополнительно включающий применение индивидууму трансплантации стволовых клеток периферической крови после применения индивидууму эффективного количества наружной лучевой терапии, но перед введением генетически модифицированной

клетки.

21. Способ по п. 18, дополнительно включающий:

(a) оценку истощения В-клеток у индивидуума по меньшей мере один раз через двенадцать или восемнадцать месяцев после введения генетически модифицированной клетки;

(b) оценку присутствия клеток, экспрессирующих CAR, у индивидуума по меньшей мере один раз через двенадцать, восемнадцать или более месяцев после введения генетически модифицированной клетки.

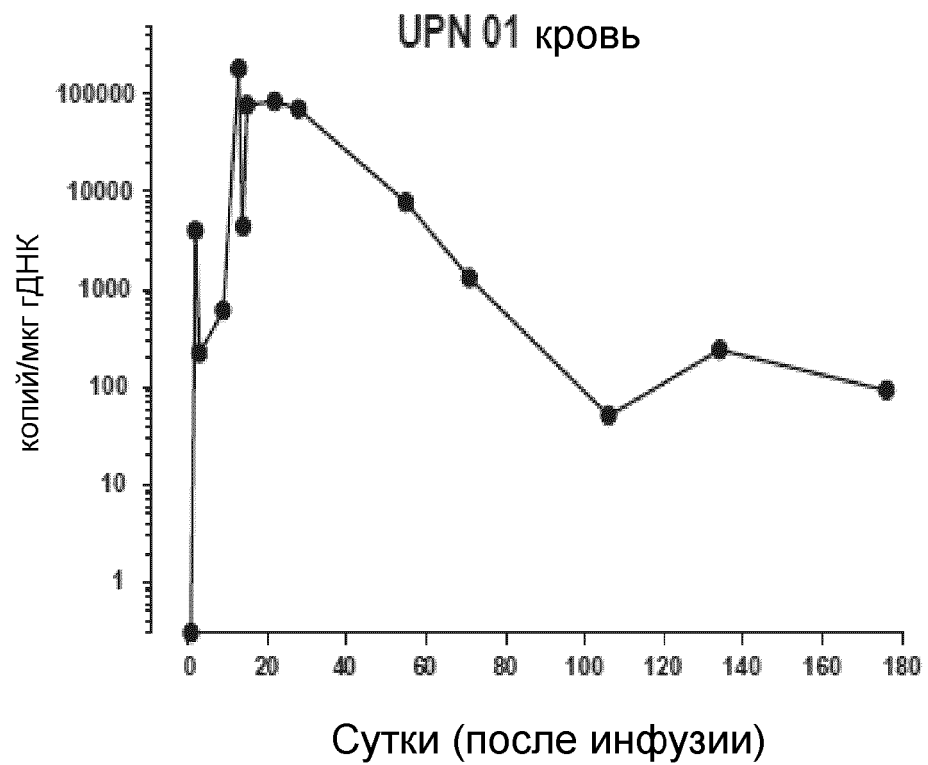
22. Способ по п. 18, в котором тканью или органом является сердце, сердечный клапан, легкое, почку, печень, поджелудочную железу, кишечник, кожу, кровеносный сосуд, костный мозг, стволовую клетку, кость, иммунную клетку или островковую клетку.

23. Способ по п. 18, дополнительно включающий введение эффективного количества средства, выбранного из группы, состоящей из ОКТ3, КЭМПАС, флударабина и циклофосфида, индивидууму до введения генетически модифицированной клетки.

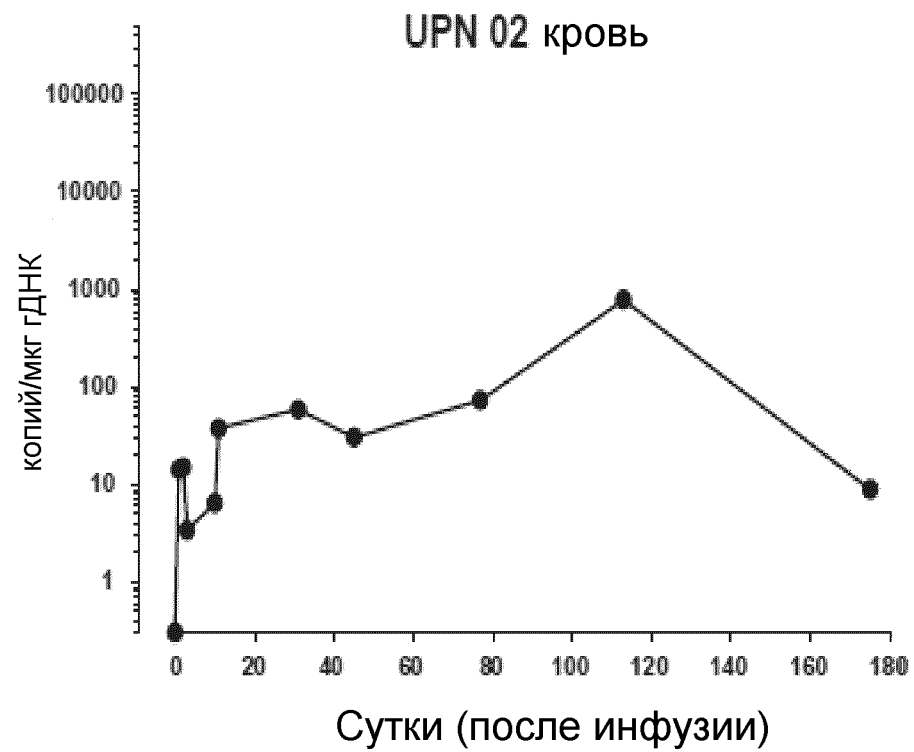
24. Способ по п. 18, в котором генетически модифицированную клетку вводят до, после или в сочетании с иммуносупрессирующим средством.

25. Способ по п. 24, в котором иммуносупрессирующее средство выбрано из группы, состоящей из циклоспорина, Азатиоприна, Рапамицина, Микофенолата мофетила, Микофеноловой кислоты, Преднизона, Сиролимуса, Базиликсимаба, Даклизумаба, муромонаб-CD3, SANDIMMUNE™, NEORAL™, циклоспорина, FK506, такролимуса, микофенолата мофетила, азатиоприна, глюкокортикостероидов, преднизона, преднизолона, метотрексата, метоксалена, ритуксимаба, сиролимуса и любой их комбинации.

Фиг. 1А



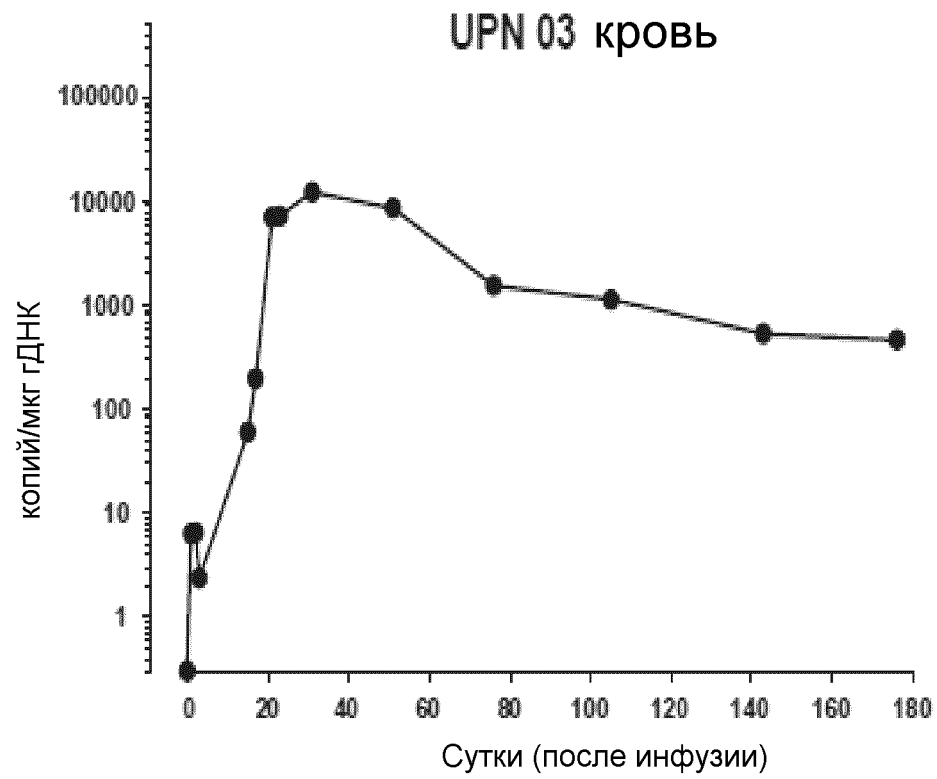
Фиг. 1В



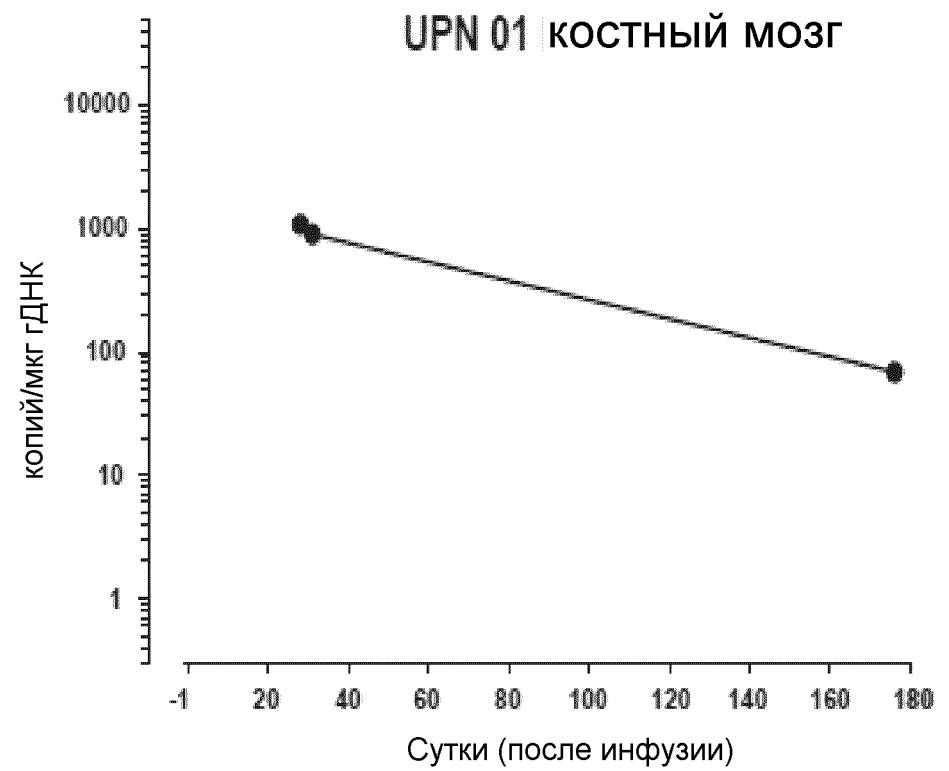
1/16



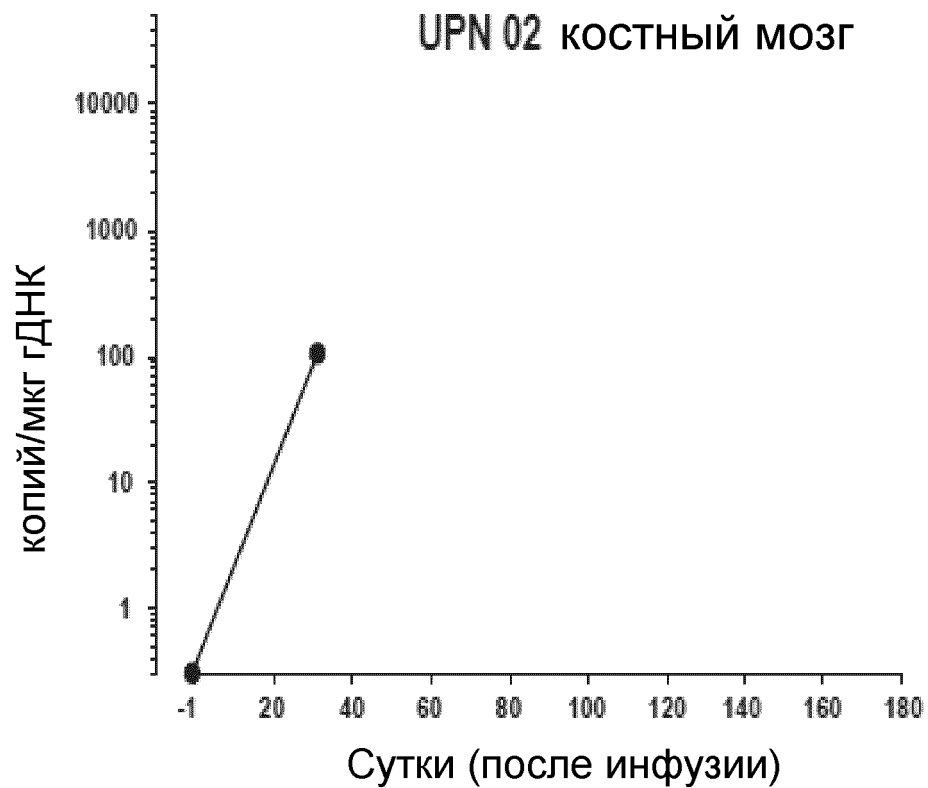
ФИГ. 1С



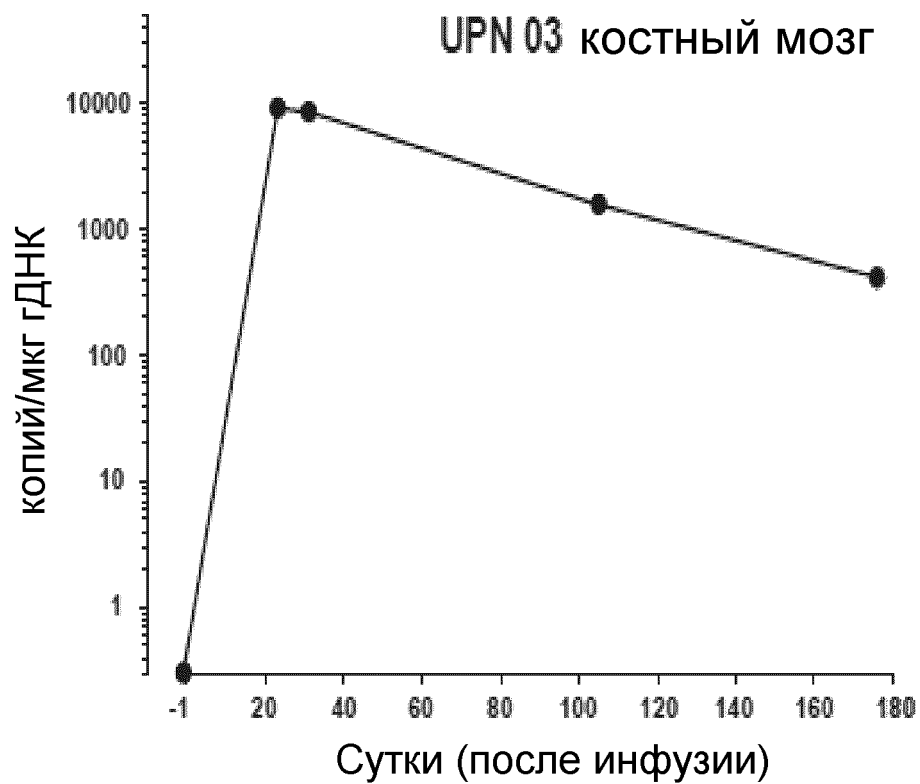
ФИГ. 1D



ФИГ. 1Е

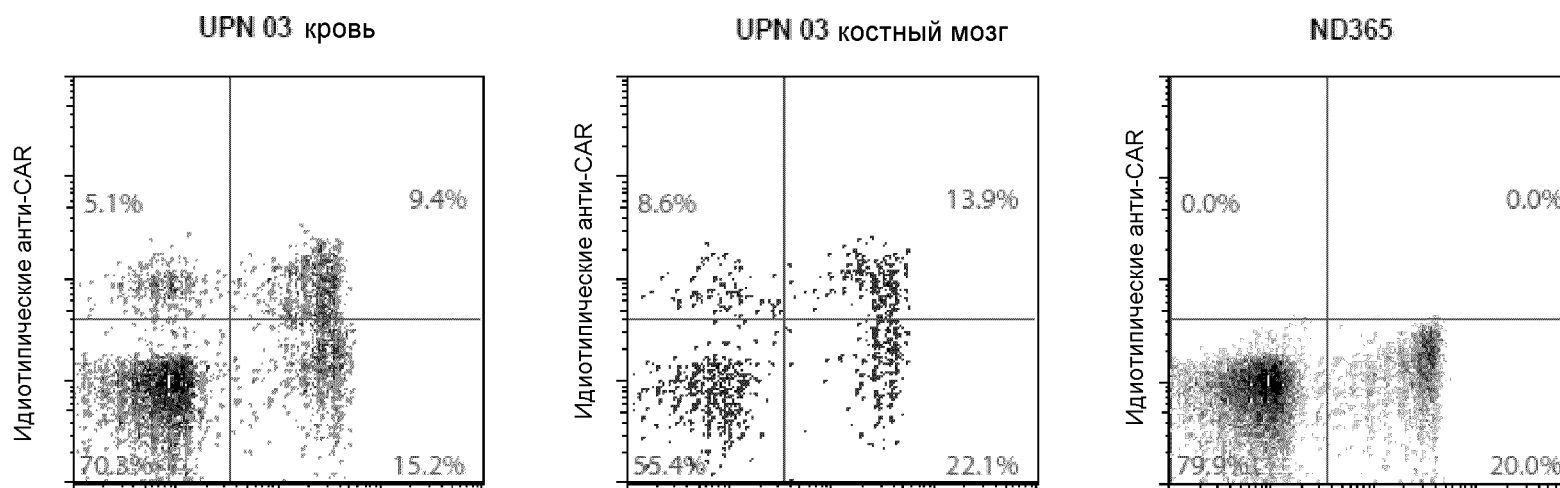


ФИГ. 1F

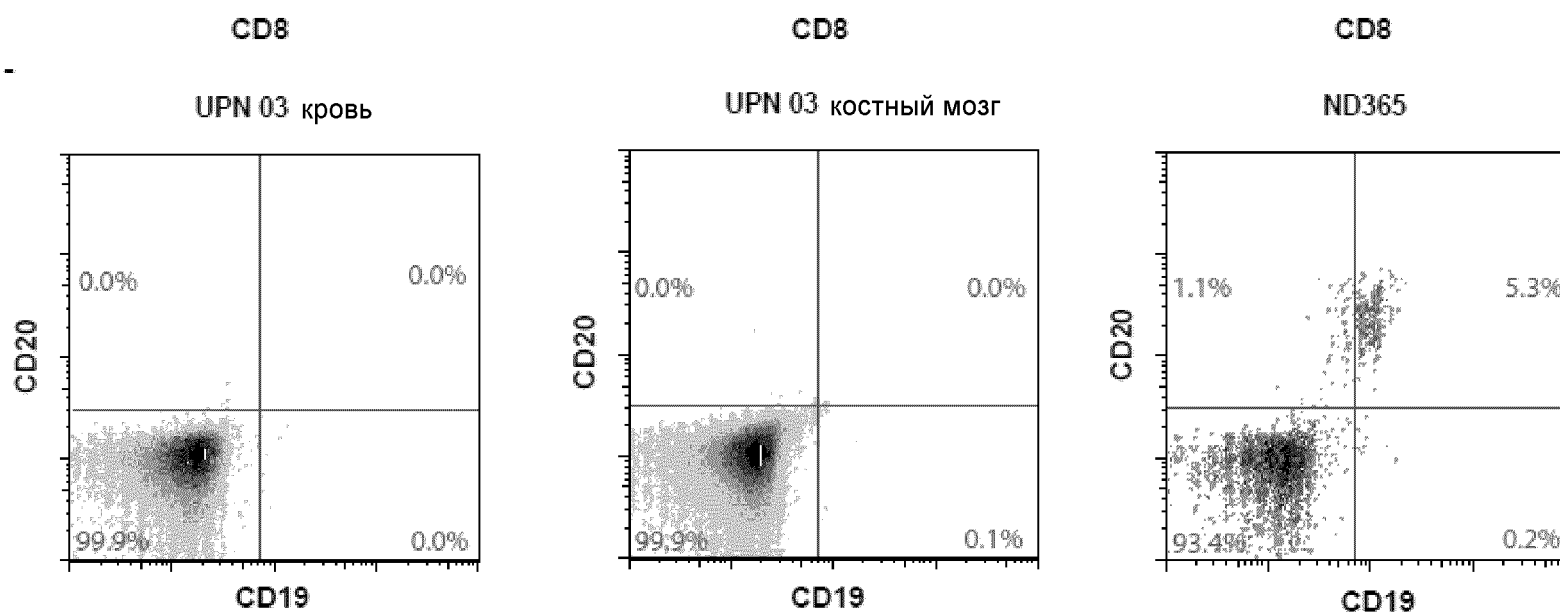


а

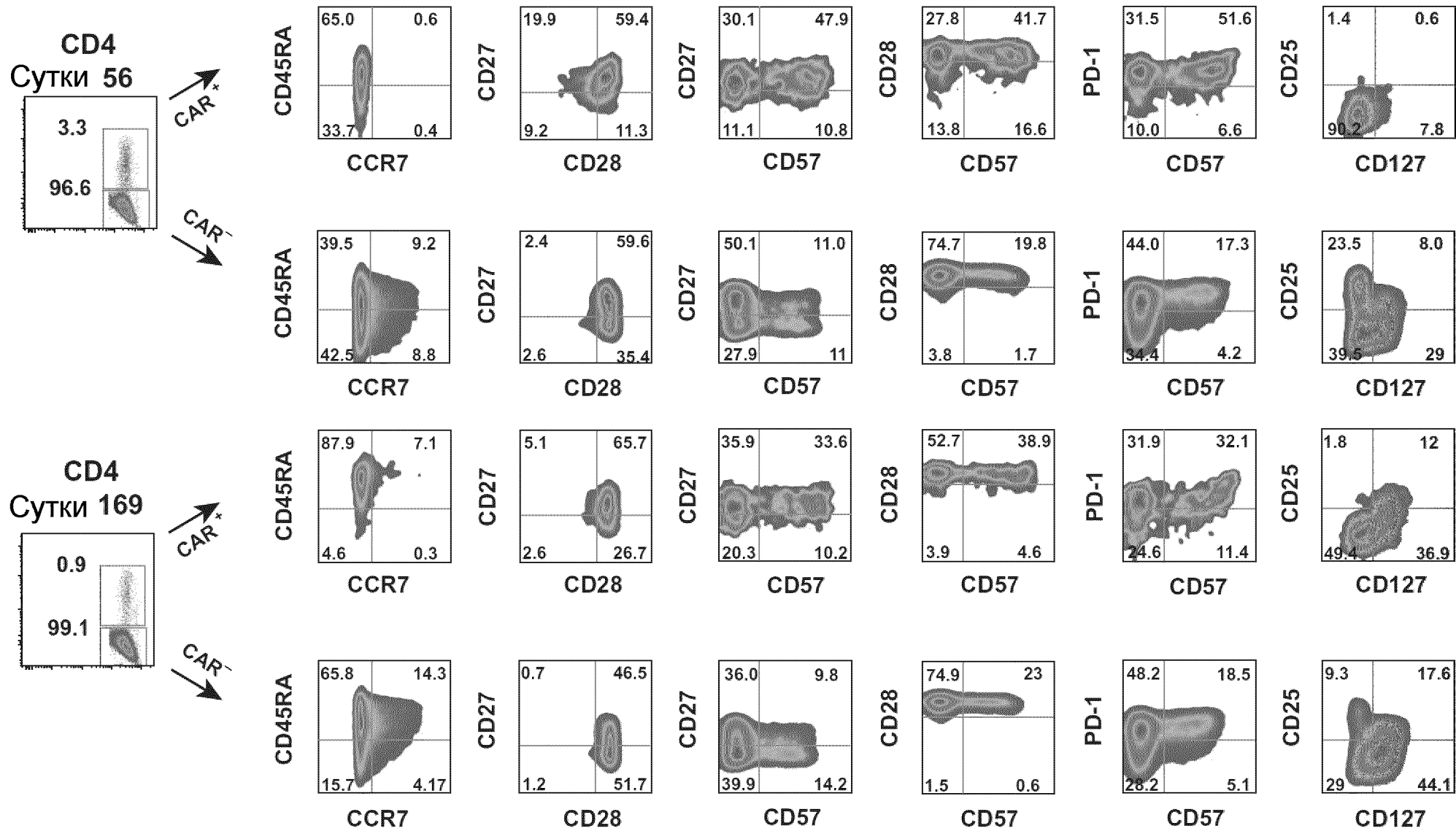
Гейт  
CD3+



Гейт  
CD3-, CD14 -

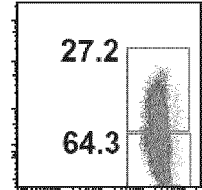


ФИГ. 2А



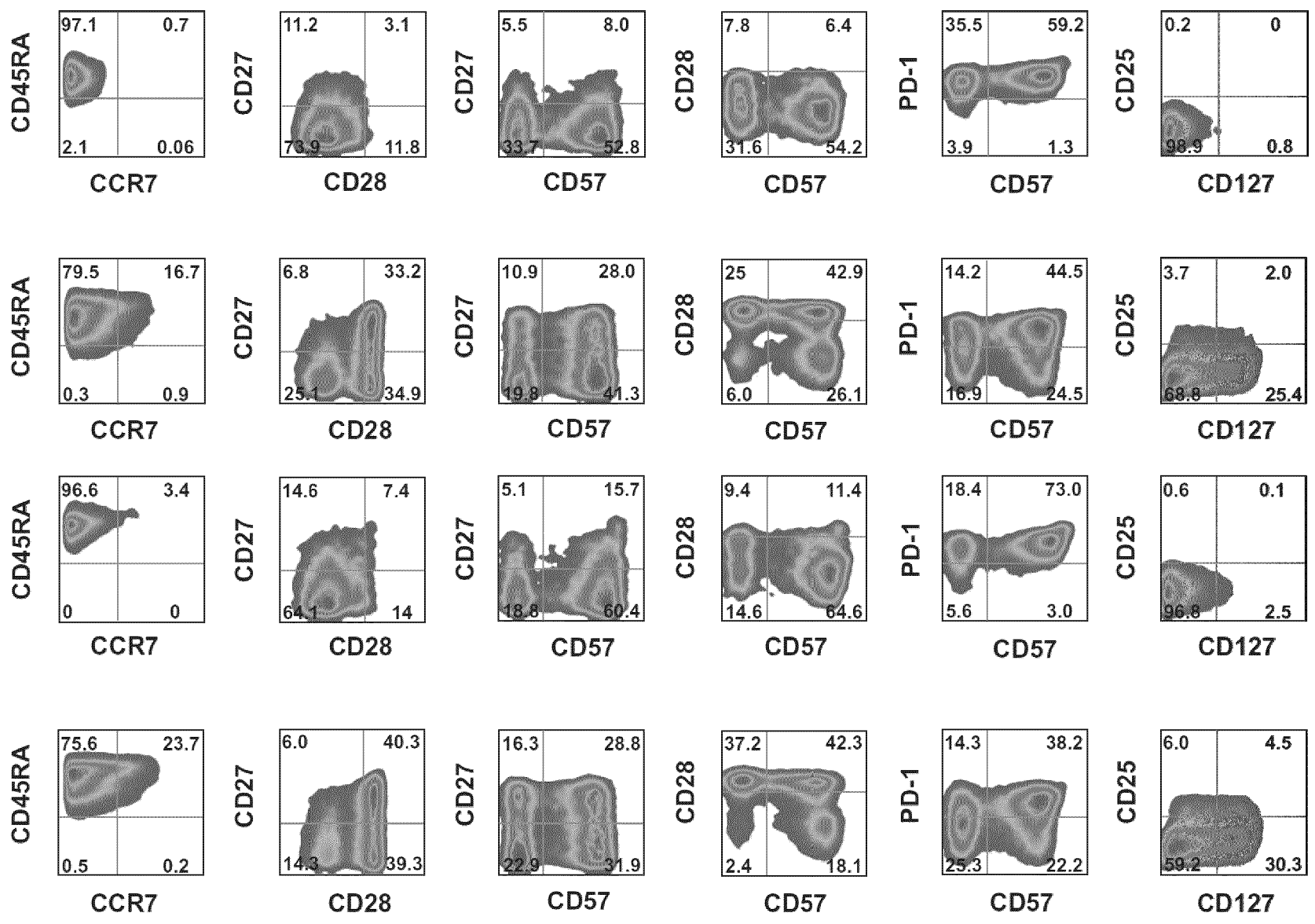
ФИГ. 2В

**CD8**  
Сутки 56

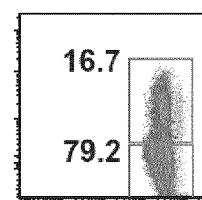


CAR<sup>+</sup>

CAR<sup>-</sup>



**CD8**  
Сутки 169

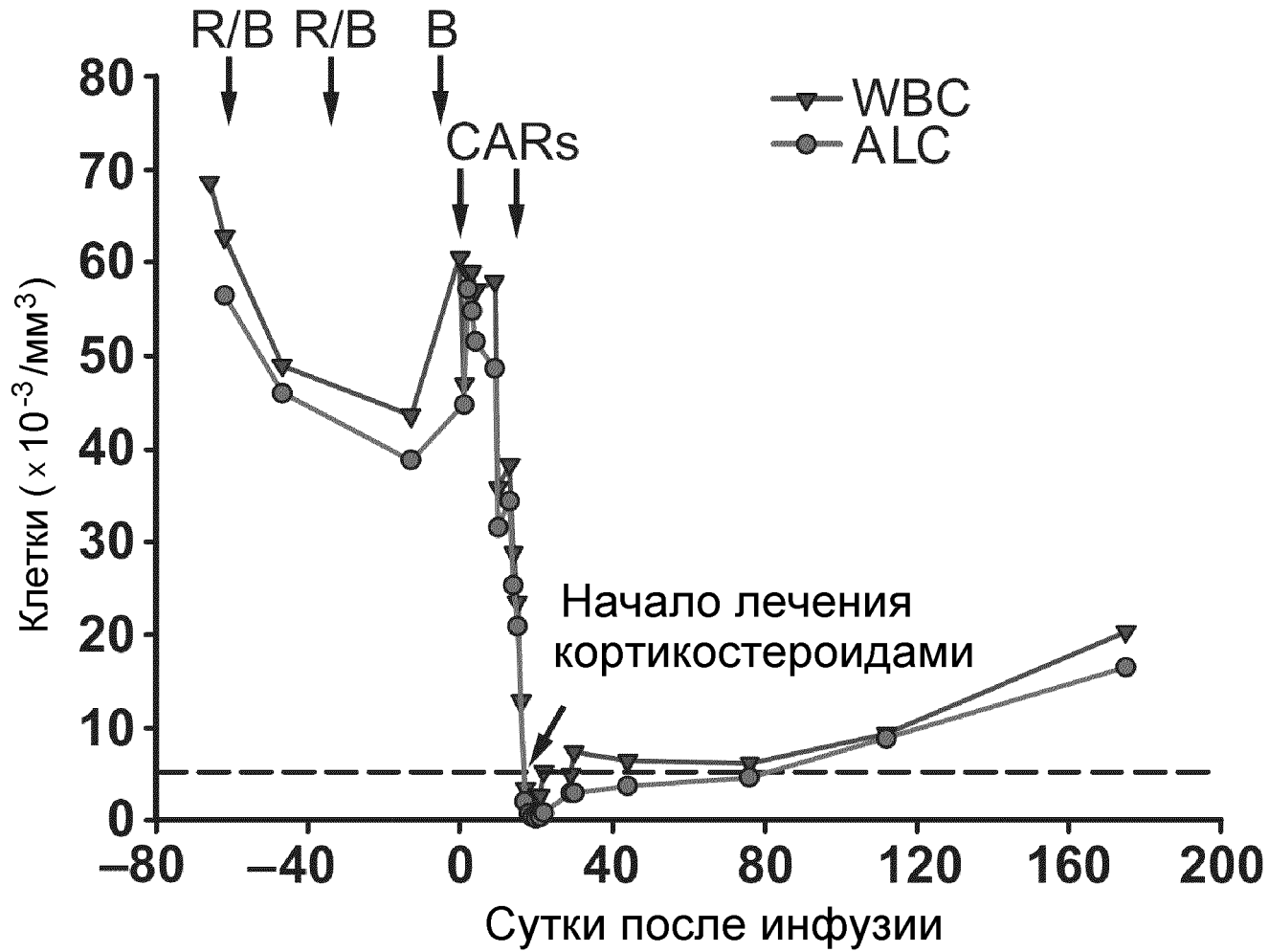


CAR<sup>+</sup>

CAR<sup>-</sup>

ФИГ. 2С

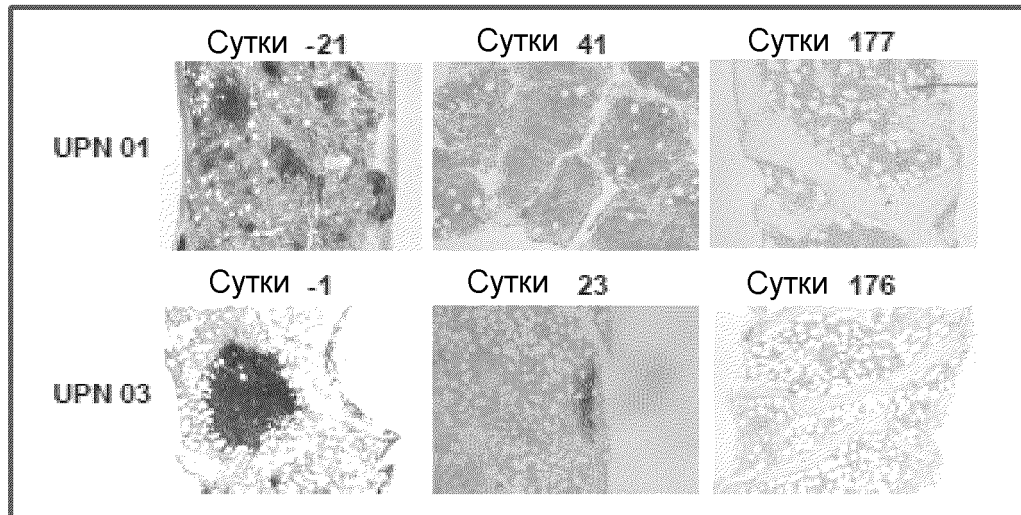
# UPN 02



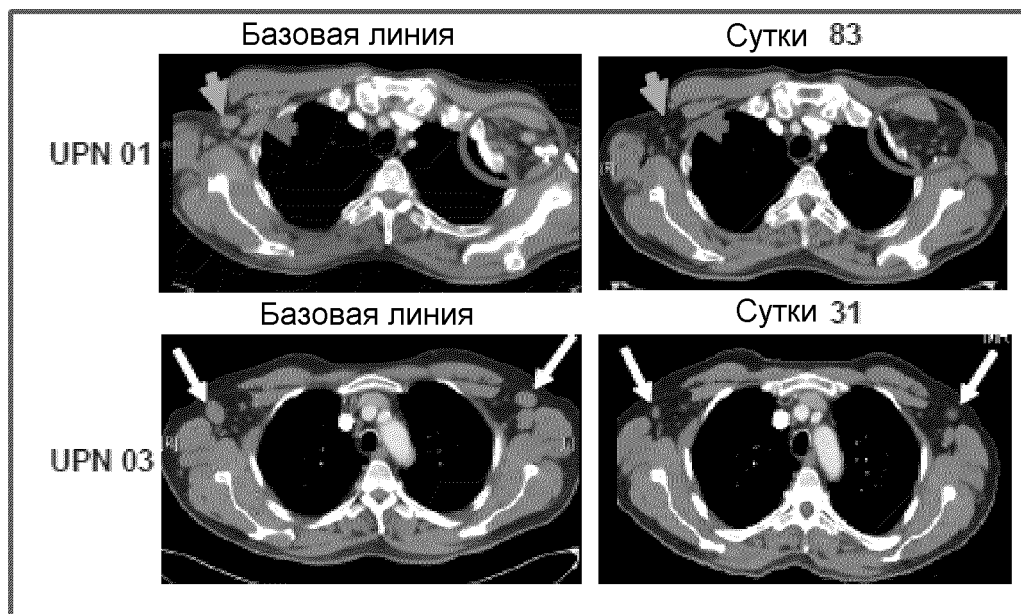
7/16

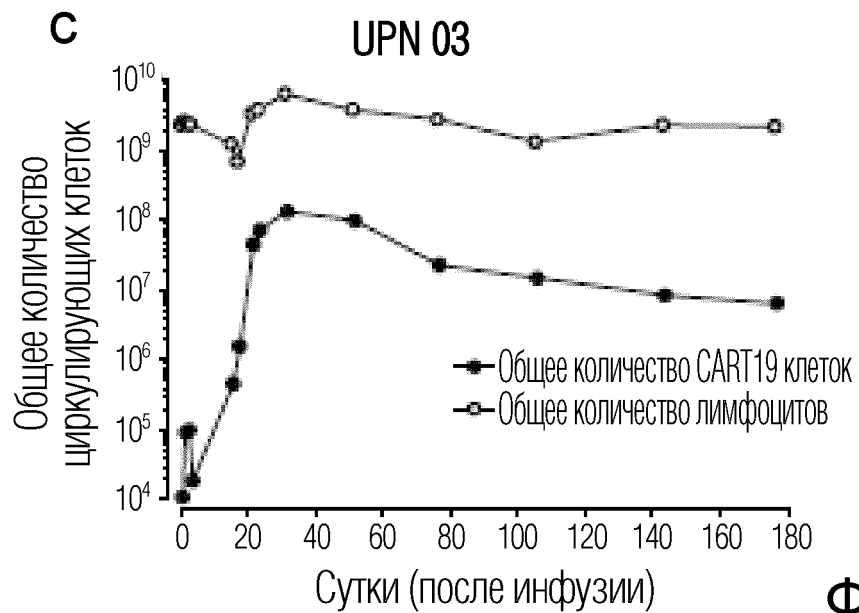
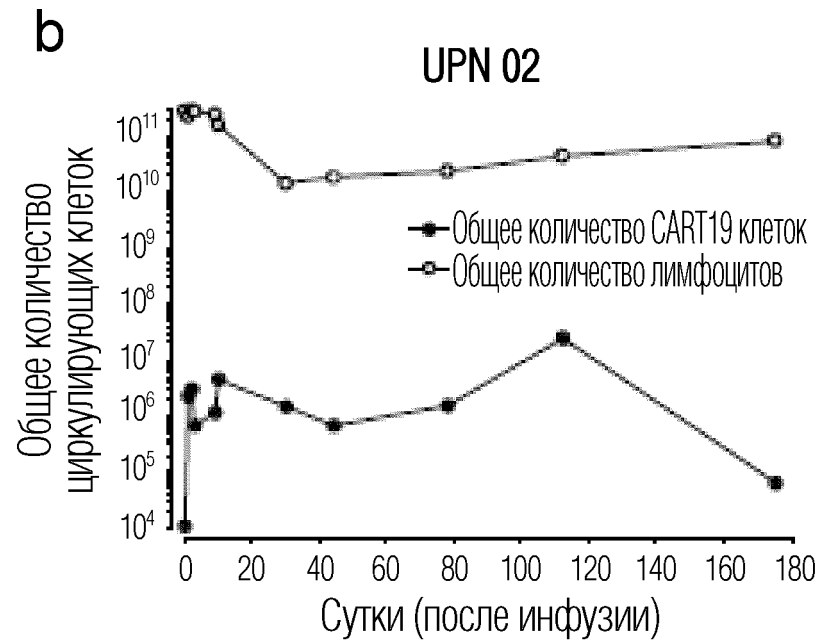
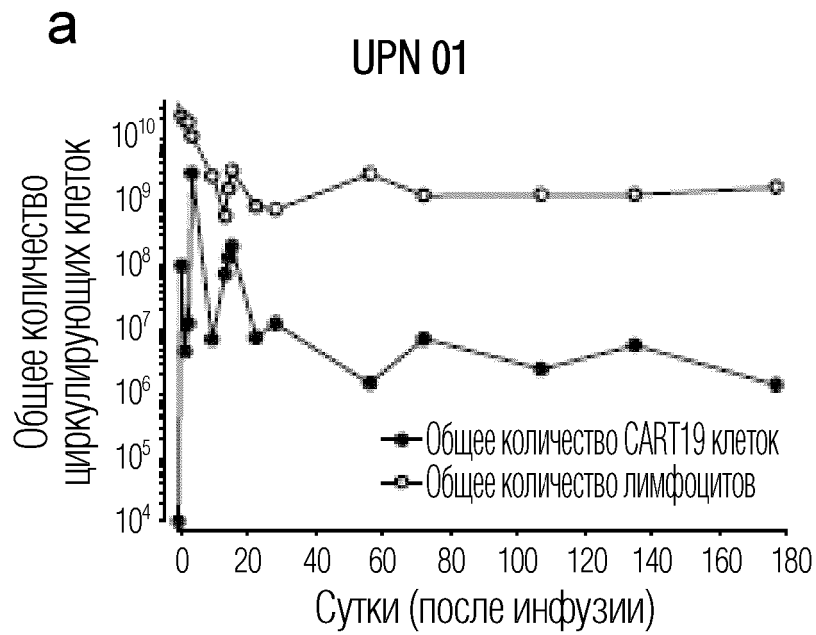
ФИГ. 3А

ФИГ. 3В



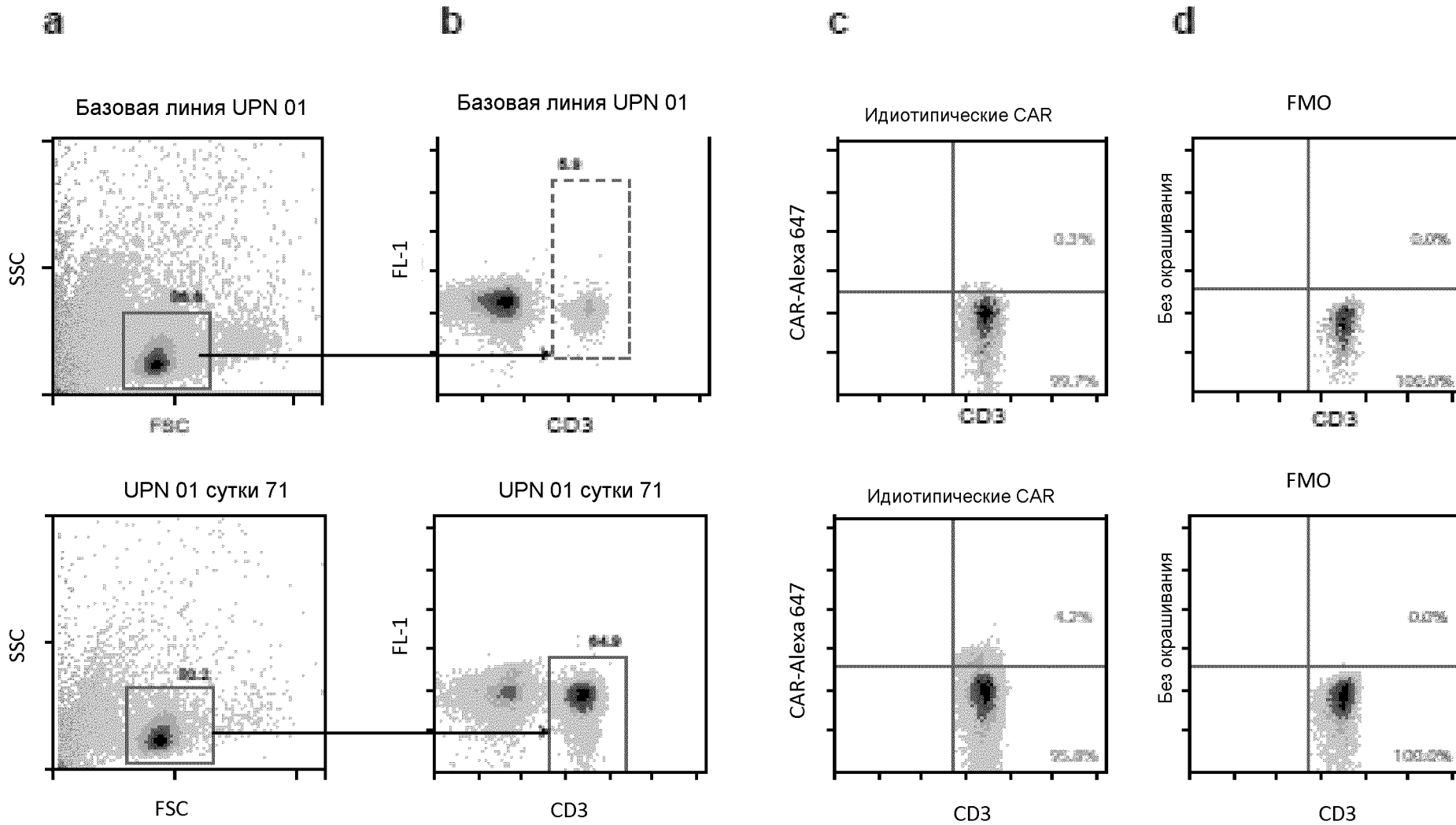
ФИГ. 3С



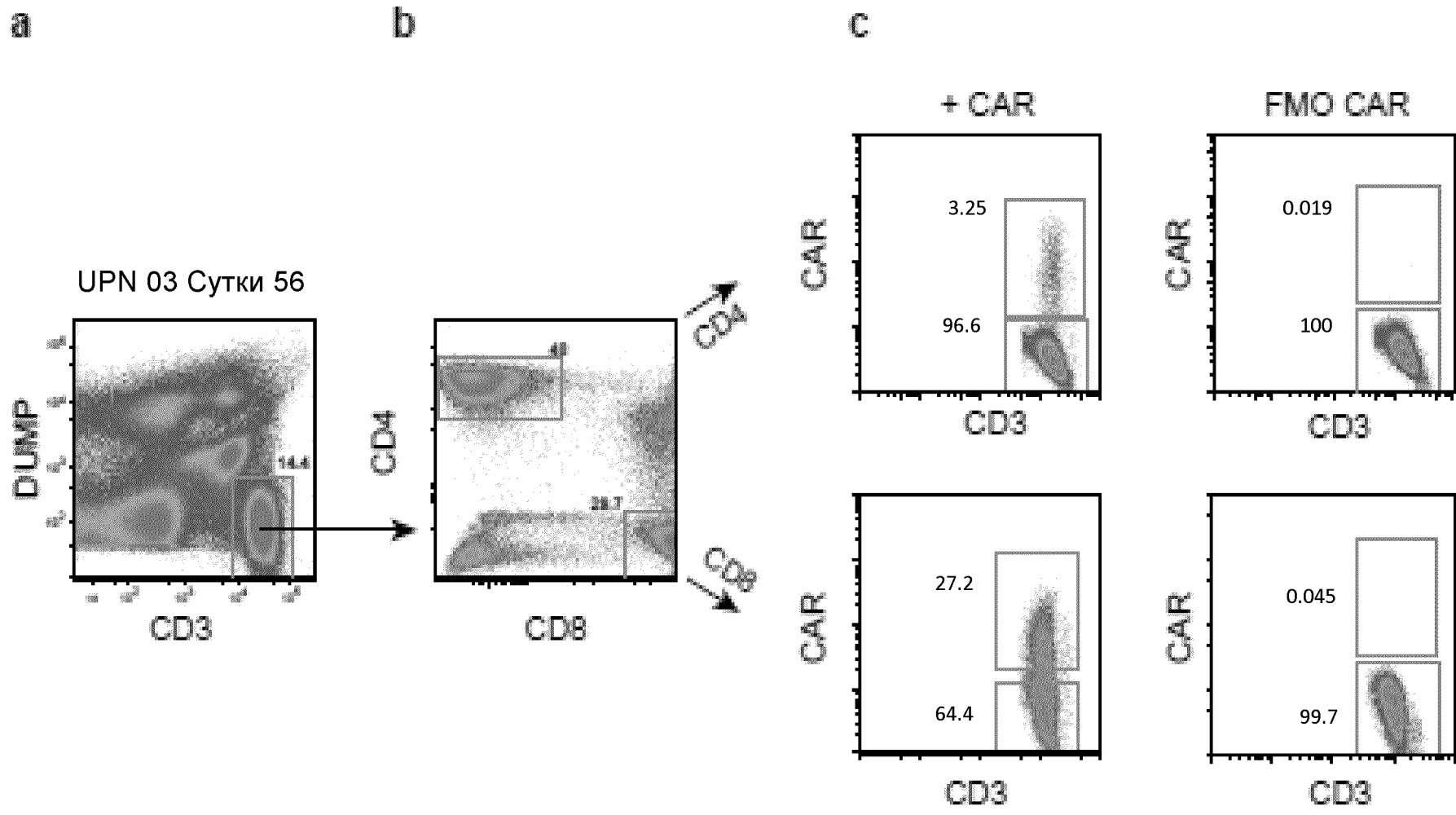


ФИГ. 4





ФИГ. 5



ФИГ. 6

UPN субъекта	Возраст/пол, кариотип	Предыдущее лечение	Опухолевая масса CLL в начале исследования			Общая доза CART19 (клеток/кг)	Ответ на сутки +30 (продолжительность)
			Костный мозг <sup>3</sup> (сутки исследования)	Кровь <sup>3</sup> (сутки исследования)	Узлы/селезенка <sup>3</sup> (сутки исследования)		
01	65/М нормальный	Флударабин × 4 цикла (2002) Ритуксимаб/флударабин × 4 цикла (2005) Алемтузумаб × 12 недель (2006) Ритуксимаб (2 курса 2008-2009) R-CVP × 2 цикла (2009) Леналидомид (2009) PCR × 2 цикла (5/18-6/18/2010) Бендамустин × 1 цикл (7/31-8/1/10) до CART19	Гиперклеточный 70% CLL 2,4×10 <sup>12</sup> клеток CLL (сутки -14) 1,7×10 <sup>12</sup> клетки CLL (сутки -1)	н.д.	6,2×10 <sup>11</sup> -1,0×10 <sup>12</sup> клеток CLL (сутки -37)	1,1×10 <sup>9</sup> (1,6×10 <sup>7</sup> /кг)	полный ответ (8+ месяцев)
02	77/М del(17)(p13) <sup>1</sup>	Алемтузумаб × 16 недель (6/2007) Алемтузумаб × 18 недель (3/2009) Бендамустин/Ритуксимаб: 7/1/2010 (цикл 1) 7/28/2010 (цикл 2) 8/26/2010 (цикл 3) до CART19	Гиперклеточный >95% CLL 3,2×10 <sup>12</sup> клеток CLL (сутки -47)	2,75 × 10 <sup>11</sup> клеток CLL (сутки -1)	1,2×10 <sup>12</sup> -2,0×10 <sup>12</sup> клеток CLL (сутки -24)	5,8×10 <sup>8</sup> (1,0×10 <sup>7</sup> /кг)	частичный ответ (5 месяцев)
03	64/М del(17)(p13) <sup>2</sup>	R-Флударабин × 2 цикла (2002) R-Флударабин × 4 цикла (1006-1/07) R-Бендамустин × 1 цикл (2/09) Бендамустин × 3 цикла (3-5/09) Алемтузумаб × 11 недель (1209-3/10) Пентастатин/циклофосфамид (9/10/10) до CART19	Гиперклеточный 40% CLL 8,8×10 <sup>11</sup> клеток CLL (сутки -1)	н.д.	3,3×10 <sup>11</sup> -5,5×10 <sup>11</sup> клеток CLL (сутки -10)	1,4×10 <sup>7</sup> (1,46×10 <sup>7</sup> /кг)	полный ответ (7+ месяцев)

1. Кариотип UPN02 (Номенклатура ISCN): 45,XY.del(1)(q25),+del(1)(p13),t(2;20)(p13;q11.2),t(3;5)(p13;q35),add(9)(p22),?del(13)(q14q34),-14,del(17)(p13)[cp24]

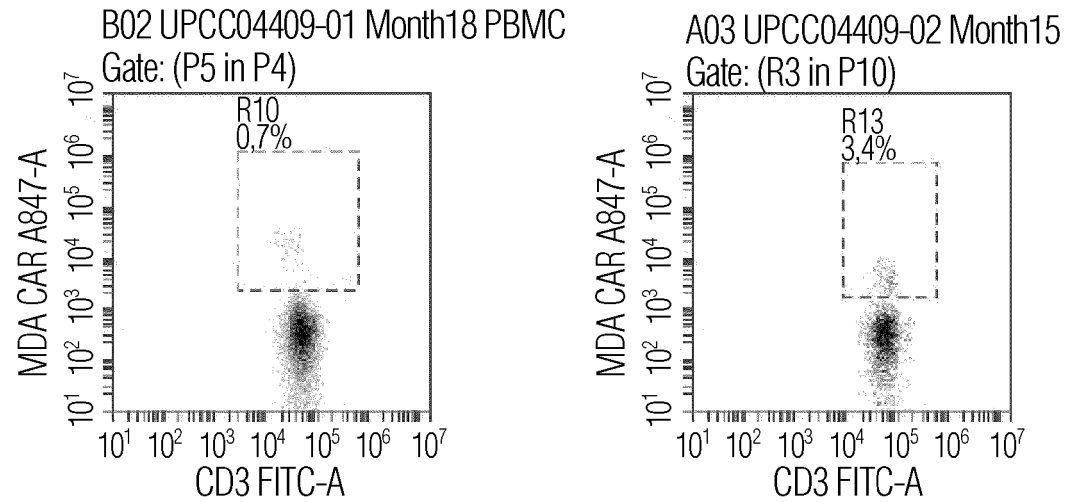
2. Кариотип UPN 03 (Номенклатура ISCN): 46,XY,del(17)(p12)[18]/44~46,idem,der(17)t(17;21)(p11.2;q11.2)[cp4]/40~45,XY,-17[cp3]

3. См. дополнительные материалы для способов выявления опухолевой массы.

ФИГ. 7

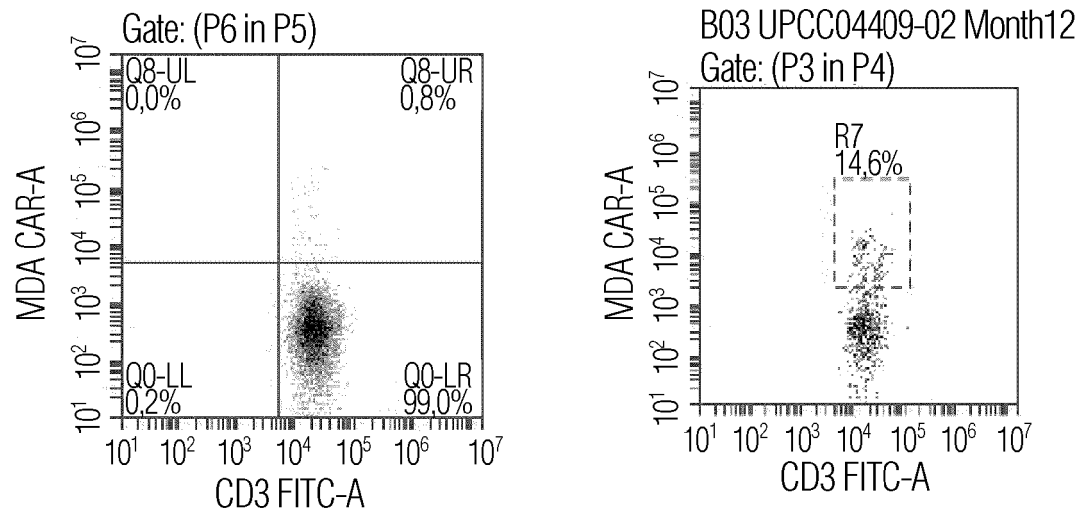
# Отложенная детекция клеток CART19 через 18 месяцев после инфузии

Кровь



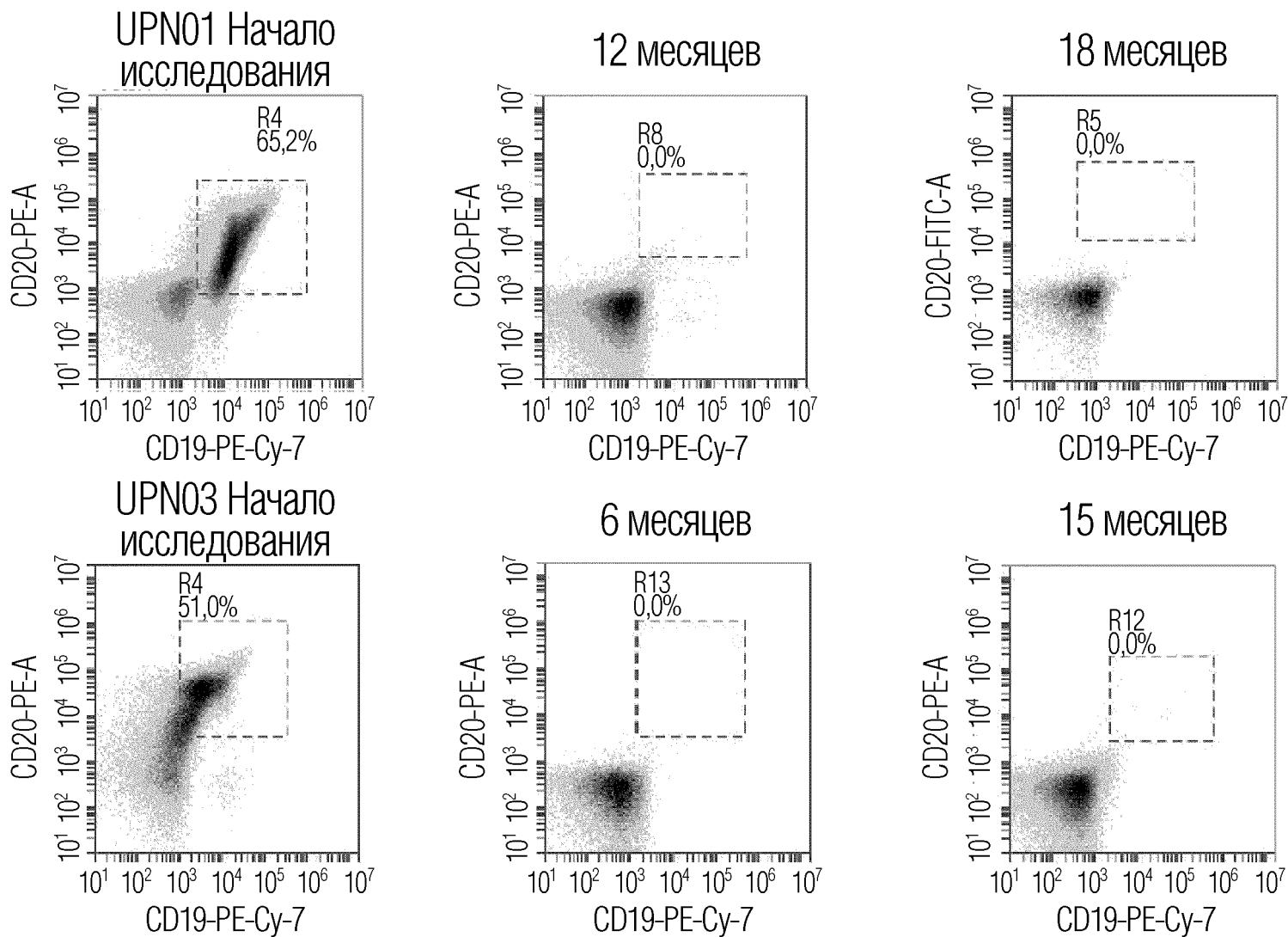
13/16

Костный мозг



ФИГ. 8

# Отложенная В-клеточная аплазия через 18 месяцев после инфузии



ФИГ. 9А

## ГЛУБОКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ОСТАТОЧНЫХ КЛЕТОК CLL И В-КЛЕТОК

ID пациента	Время	Количество ДНК в ПЦР (нг)	Клеточный эквивалент	Общее количество продуктивных прочтений	Общее количество продуктивных уникальных клонотипов	Доминантные прочтения клонов	Частота клонов (% продуктивных)
<b>UPN03</b>	Перед инфузией	<b>2 000</b>	<b>317 460</b>	<b>22 074 912</b>	<b>58 234</b>	<b>19 948 508</b>	<b>90,4</b>
<b>03</b>	Сутки -1	<b>386</b>	<b>61 270</b>	<b>1 385 340</b>	<b>4 544</b>	<b>1 231 018</b>	<b>88,9</b>
<b>03</b>	Сутки +31	<b>1 000</b>	<b>158 730</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,000</b>
<b>03</b>	Сутки +176	<b>2 000</b>	<b>317 460</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,000</b>
<b>UPN01</b>	Перед инфузией	<b>1 000</b>	<b>158 730</b>	<b>184 786</b>	<b>24</b>	<b>184 256</b>	<b>99,7</b>
<b>01</b>	Сутки -1	<b>1 000</b>	<b>158 730</b>	<b>408 579</b>	<b>48</b>	<b>407 592</b>	<b>99,8</b>
<b>01</b>	Сутки +28	<b>1 000</b>	<b>158 730</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,000</b>
<b>01</b>	Сутки +176	<b>500</b>	<b>79 365</b>	<b>285 305</b>	<b>7 362</b>	<b>0</b>	<b>0,000</b>

15/16

ФИГ. 9В

# СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ТЕРАПИИ CART19

## Относительные количества плазматических клеток в костном мозге у пациентов UPN 01, UPN 02 и UPN 03.

Количество плазматических клеток было подсчитано в клинической лаборатории посредством иммуногистохимии CD138, проведенной для репрезентативных образцов биопсии костного мозга. ND: не определено, образец был неподходящим. Указанные относительные количества представляют собой оценочные значения, определенные посредством оценки целой секции костного мозга. У UPN 01 после инфузии не было идентифицировано CD138+ клеток, в то время как у UPN 02 и UPN 03 после инфузии присутствовали остаточные CD138+ клетки на более низких уровнях, чем в костном мозге до инфузии.

Пациент	Сутки после инфузии Т-клеток	% плазматических клеток (CD138+)
UPN 01	-23	1%
	+39	0%
	+116	0%
	+174	0%
UPN 02	-45	2-3%
	-3	2-3%
	+188	1%
UPN 03	-3	3-5%
	+21	1-2%
	+174	1-2%

ФИГ. 10

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202490222****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

СПК:

**A61K 35/17**  
**A61P 37/06****Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

A61K 35/17, A61P 37/06

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
EAPATIS, Espacenet, PubMed, Embase**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2011059836 A2 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE и др.) 2011-05-19 реферат, абзацы [0012]-[0013], [0032], [0034]-[0035], [0057], [0086], пункты 6, 10, 11, 21, 24, 27, 30 формулы	1-25
Y	HIROKI TORIKAI et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. BLOOD, 2012-06-14, Vol. 119, No. 24, p. 5697-5705 реферат, левая колонка первый абзац - правая колонка первый абзац на стр. 5697, правая колонка второй абзац на стр. 5703, левая колонка второй абзац - правая колонка второй абзац на стр. 5704	1-25
Y	WO 2012079000 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA и др.) 2012-06-14 реферат, строки 1-2 на стр. 4, строки 1-5, 16-20 на стр. 5, строки 30-31 на стр. 7, строки 33-34 на стр. 12, строки 22-24 на стр. 14, строки 1-2 на стр. 29, строки 9-10 на стр. 30, строки 25-26 на стр. 90, строки 10-30 на стр. 92	1-25
Y	MONICA CASUCCI et al. Suicide gene therapy to increase the safety of chimeric antigen receptor-redirectioned T lymphocytes. JOURNAL OF CANCER, 2011, Vol. 2, p. 378-382 реферат, левая колонка первый абзац на стр. 380, правая колонка первый-второй абзацы на стр. 380, Фигура 1	1-25

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

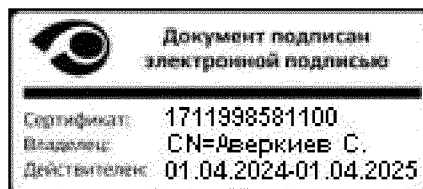
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 21 мая 2024 (21.05.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202490222**

**ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	DAVID L. PORTER et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Vol. 365, No. 8, 2011-08-25, p. 725-733 реферат, первый абзац на стр. 725, левая колонка второй-третий абзацы на стр. 727, правая колонка второй абзац на стр. 731	1-25