

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491851** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки  
2024.10.21(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 31/145* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2023.02.16(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ КЛЕТКАМИ С CAR В КОМБИНАЦИИ С МОДУЛЯТОРАМИ РЕЦЕПТОРОВ S1P**

(31) 22305171.5; 22305781.1

(72) Изобретатель:

(32) 2022.02.16; 2022.05.27

Дершниц Симона (CH), Буссо Филипп,  
Булч Моргейн (FR), Оэкен Стефан  
(CH)

(33) EP

(86) PCT/EP2023/053857

(87) WO 2023/156506 2023.08.24

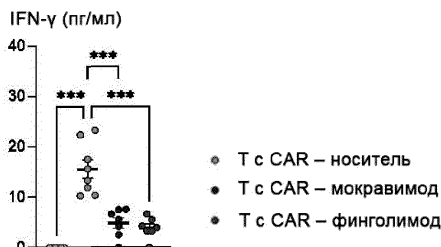
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Фелицына С.Б. (RU)

ПРИОТЕРА САС (FR)

(57) Настоящее изобретение касается композиций клеток с CAR для применения при лечении онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, причем такие клетки с CAR являются иммунными клетками, экспрессирующими молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антигены, связанные с раком, при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P, или его фармацевтически приемлемой соли, или его фосфатного производного.



202491851

A1

A1

202491851

## СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ КЛЕТКАМИ С CAR В КОМБИНАЦИИ С МОДУЛЯТОРАМИ РЕЦЕПТОРОВ SIP

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области клеточной иммунотерапии, в частности, в нем предусмотрены композиции, содержащие клетки с CAR, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антигены, связанные с раком, для применения в комбинированной терапии с модуляторами рецепторов SIP при лечении онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов.

### **Уровень техники**

Многие пациенты с онкогематологическими заболеваниями неизлечимы при стандартной терапии. Кроме того, традиционные методы лечения часто имеют серьезные побочные эффекты. Предпринимались попытки иммунотерапии рака, однако при этом из-за ряда препятствий оказалось очень трудно достичь клинической эффективности. Хотя были идентифицированы сотни так называемых опухолевых антигенов, однако они, как правило, получены из собственного организма и поэтому обладают слабой иммуногенностью.

Было детально задокументировано присутствие в периферической крови и в опухолях у больных раком естественных Т-клеток, реагирующих с опухолями. Однако, хотя Т-клетки распознают неопластические клетки, их присутствия часто недостаточно для клинического регресса опухолей. Опухоли используют множество механизмов для нейтрализации или уклонения от иммунной атаки, в частности реакций, опосредованных Т-клетками. Эти механизмы включают, среди прочего, снижение экспрессии молекул МНС или нарушение процессов обработки и презентации антигенов.

Адоптивный перенос аутологичных иммунных клеток, модифицированных *ex vivo* для экспрессии химерных антигеновых рецепторов (CARs), возник как новый терапевтический инструмент, позволяющий обойти некоторые из этих препятствий. Такие подходы основаны на перенацеливании данных иммунных эффекторных клеток на подходящие молекулы клеточной поверхности раковых клеток типа гематологических новообразований. Например, в недавних клинических испытаниях Т-клетки с CAR, нацеленные на молекулы CD19, проявляли замечательную активность при лечении В-клеточных лейкозов и В-клеточных лимфом (Maude et al., 2014; Neelapu et al., 2017; Schuster et al., 2017; Park et al., 2018). Несмотря на эти многообещающие результаты,

оказалось, что циркулирующие раковые клетки значительно препятствуют проникновению Т-клеток с CAR в костный мозг, что представляет существенное препятствие для опосредованной Т-клетками с CAR элиминации опухолевых клеток мишени и персистенции клеток с CAR (M. Cazaux et al., *J Exp Med* 6 May 2019, 216 (5): 1038-1049; doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20182375>). Таким образом, несмотря на способность химерных антигеновых рецепторов у генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток распознавать и уничтожать клетки-мишени, успешная терапия иммунными эффекторными клетками должна обладать способностью к пролиферации, персистенции, сохранению функциональной активности и проникновению в костный мозг со временем для выявления рецидива лейкоза.

К сожалению, терапия Т-клетками с CAR также может вызывать сильную токсичность, поражающую различные органы и ограничивающую успех терапии (Brudno and Kochenderfer, *Blood* 127, 3321-3330 (2016)). Т-клетки с CAR значительно активируются при распознавании опухолевых антигенов, что запускает высвобождение цитокинов. Этот локальный цитокиновый шторм может еще больше активировать сторонние иммунные клетки, которые выделяют больше воспалительных цитокинов, способствующих развитию синдрома высвобождения цитокинов (CRS), который характеризуется высокими системными уровнями цитокинов. Активированные иммунные клетки мигрируют к периферическим участкам, вызывая системные воспалительные реакции в тканях (Lee et al., *Blood* 2014, 124(2):188-195).

Даже в клинических испытаниях с самыми лучшими показателями эффективности у пациентов возникали тяжелые, угрожающие жизни явления. В частности, у пациентов с острым лимфобластным лейкозом/лимфомой (ALL/LBL) при терапии Т-клетками с CAR почти у всех пациентов наблюдались хотя бы некоторые менее выраженные проявления токсичности, тогда как у 20-50% пациентов проявлялась сильная супрафизиологическая продукция цитокинов и массивная экспансия Т-клеток *in vivo*. Такие токсические уровни системного высвобождения цитокинов и сильная перекрестная активация иммунных клеток у некоторых пациентов приводят к следующим проявлениям токсичности: (1) синдрому высвобождения цитокинов (CRS), связанному с супрафизиологической продукцией цитокинов и массивной экспансией Т-клеток *in vivo*; (2) гемофагоцитарному лимфогистиоцитозу и/или синдрому активации макрофагов (MAS), который определяется как тяжелый синдром гипервоспаления, характеризующийся CRS и сочетанием повышенного ферритина в сыворотке и гемофагоцитоза, почечной недостаточностью, печеночными ферментами, спленомегалией, отеком легких и/или отсутствием активности NK-клеток; и (3)

синдромом нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), который характеризуется повышением уровня цитокинов в спинномозговой жидкости и нарушением гематоэнцефалического барьера (Sheth V.S., Gauthier J. Taming the beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant* 56, 552-566 (2021)).

Другой проблемой при терапии Т-клетками с CAR является падение эффективности против онкогематологических заболеваний, вызванное, например, ингибированием и резистентностью раковых клеток, утечкой антигена, ограниченной персистенцией CAR, плохим переносом CAR и инфильтрацией опухолей, а также иммуносупрессивным микроокружением. Например, хотя у 70-90% пациентов с рецидивами и/или с рефрактерным ALL наблюдается стойкий ответ на терапию Т-клетками с CAR, направленную на CD19, последние данные наблюдения свидетельствуют о развитии общего механизма резистентности к заболеванию, включая снижение уровня/потерю антигена CD19 у 30-70% пациентов с рецидивами заболевания после лечения (Stern R.C., Stern R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 11, 69 (2021)).

Таким образом, существует насущная потребность в усовершенствовании стратегии борьбы с онкогематологическими заболеваниями, в частности, крайне желательны новые композиции и способы улучшения терапии с CAR.

### **Сущность изобретения**

Стимулирование удаления Т-клеток с CAR в лимфоидные ткани типа костного мозга и/или лимфатических узлов может принести клиническую пользу вследствие поддержания регуляции и функциональной активации Т-клеток с CAR в соответствующем микроокружении. Как и у нормальных Т-клеток (Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kündig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev.* 1997 Apr, 156:199-209), такое лимфатическое микроокружение должно продлевать активацию Т-клеток с CAR и тем самым персистенцию CAR, а также регулировать чрезмерный иммунный ответ, который может привести к CRS и ICANS. Кроме того, удаление Т-клеток с CAR подальше от периферии должна уменьшить побочные эффекты, связанные с активацией и повреждением периферических тканей. Было показано, что FTY720 повышает персистенцию аллогенных Т-клеток (Marcus et al., *Blood* 2011, 118(4): 975-983). Более того, стимулирование удаления клеток с CAR может уменьшить риск возникновения GVHD при терапии аллогенными клетками с CAR (Depil et al., *Nature Reviews Drug Discovery* 19, 185-199 (2020)).

Не ограничивая изобретение каким-либо конкретным механизмом, описанное здесь изобретение удовлетворяет этой потребности, так как описанная комбинация композиций, включающая клетки с CAR в комбинации с модуляторами рецепторов S1P, должна обеспечивать синергический терапевтический эффект, предотвращая выход клеток с CAR из лимфоидных тканей и/или еще больше активируя клетки с CAR в режиме уничтожения и/или непосредственно уничтожая раковые клетки, вследствие чего усиливается противоопухолевое действие и/или предотвращаются рецидивы онкогематологических заболеваний у пациентов, получавших комбинацию клеток с CAR и модулятора рецепторов S1P. Удаление клеток с CAR в лимфоидные ткани под действием модуляторов рецепторов S1P также может привести к ограничению CRS и/или MAS после терапии клетками с CAR или других нежелательных явлений типа ICANS, которые наблюдаются клинически при всех методах терапии с аутологичными клетками.

Соответственно, изобретением предусмотрены, хотя бы частично, композиции и способы лечения таких заболеваний, как рак (например, гематологический рак или другие В-клеточные новообразования), с помощью иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или клеток натуральных киллеров (NK-клеток)), экспрессирующих молекулы химерных антигеновых рецепторов (CAR) (например, таких CAR, которые связываются с В-клеточными антигенами, например, CD19).

Способы включают введение иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), экспрессирующих CAR (например, CAR, нацеленный на В-клетки), в комбинации с модулятором рецепторов S1P. В некоторых воплощениях комбинация поддерживает функциональную активность Т-клеток с CAR, обладает лучшим клиническим действием и/или обладает меньшей токсичностью (например, вследствие предотвращения CRS) по сравнению с каждой терапией по отдельности. В некоторых воплощениях субъект подвержен риску или страдает CRS и/или MAS; или субъект был идентифицирован как страдающий или подверженный риску возникновения CRS и/или MAS. В некоторых воплощениях комбинация улучшает противоопухолевое действие терапии клетками с CAR, в частности, терапии клетками с CAR для лечения онкогематологических заболеваний.

Изобретением также предусмотрено применение генно-инженерных клеток, например, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или NK-клеток), для экспрессии молекул CAR, связывающихся с антигенами, связанными с раком (например, с описанным здесь связанным с раком антигеном, например, с CD19), в комбинации с модулятором рецепторов S1P (например, с мокравимодом) для лечения гематологического рака, связанного с экспрессией данного связанного с раком антигена.

Изобретением также предусмотрены композиции и способы профилактики CRS и/или MAS у субъектов при помощи комбинации модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) с клетками, экспрессирующими CAR (например, с В-клетками, нацеленными на экспрессирующие CAR клетки, например, клетки с CAR против CD19).

Также предусмотрены композиции и способы профилактики CRS и/или MAS у субъектов при помощи комбинации модулятора рецепторов S1P с клетками, экспрессирующими CAR (например, с В-клетками, нацеленными на экспрессирующие CAR клетки, например, клетки, экспрессирующие CAR против CD19), например, если субъект подвержен риску возникновения или страдает CRS и/или MAS или субъект был идентифицирован как страдающий или подверженный риску возникновения CRS и/или MAS. В одном аспекте изобретения предусмотрен способ лечения субъектов, например, людей, страдающих заболеваниями, связанными с экспрессией антигена, например, связанного с раком антигена, описанного здесь. Способ включает введение субъектам эффективного количества клеток, например, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток), экспрессирующих молекулы CAR, которые связывают антиген, связанный с раком (например, связанный с раком антиген, описанный здесь, например, CD19), в комбинации с модулятором рецепторов S1P, например, мокравимодом.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ обеспечения противоопухолевого иммунитета у субъектов, например, людей, страдающих заболеваниями, связанными с экспрессией антигена, например, антигена, связанного с раком, например, связанного с раком антигена, описанного здесь. Способ включает введение субъектам эффективного количества клеток, например, иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток), экспрессирующих молекулы CAR, которые связывают антиген (например, связанный с раком антиген, описанный здесь, например, CD19), в комбинации с модулятором рецепторов S1P, например, мокравимодом.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ лечения и/или профилактики синдрома высвобождения цитокинов (CRS), например, CRS, связанного с терапией клетками с CAR (например, экспрессирующими CAR клетками, описанными здесь), и/или синдрома активации макрофагов (MAS) у нуждающихся в этом субъектов, включающий введение субъектам модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым осуществляя лечение и/или профилактику CRS и/или MAS у субъектов.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ повышения эффективности терапии клетками с CAR (например, экспрессирующими CAR клетками, описанными здесь) у нуждающихся в этом субъектов, включающий введение субъектам модулятора

рецепторов S1P (например, мокравимода) в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым осуществляя активацию экспрессирующих CAR клеток в режиме уничтожения и/или непосредственно уничтожая раковые клетки, тем самым усиливая противоопухолевый эффект.

В одних воплощениях субъекты подвержены риску возникновения, страдают либо им поставлен диагноз CRS и/или MAS. В одних воплощениях субъекты получали, получают или будут получать терапию клетками с CAR, например, экспрессирующими CAR клетками, описанными здесь.

В одних воплощениях способ включает отбор субъектов для введения модулятора рецепторов S1P. В одних воплощениях субъектов выбирают на основании (i) риска возникновения у них CRS и/или MAS, (ii) поставленного им диагноза CRS и/или MAS и/или (iii) того, получали они, получают или будут получать терапию клетками с CAR (например, терапию клетками с CAR, описанными здесь, например, терапию клетками с CAR против CD19).

В одних воплощениях субъектов выбирают для введения модулятора рецепторов S1P, если им поставлен диагноз CRS и/или MAS, например, тяжелого CRS (3 или 4 степени) или не такого тяжелого CRS и/или MAS. В одних воплощениях субъектов выбирают для введения модулятора рецепторов S1P, если они подвержены риску (например, идентифицированы как подверженные риску) возникновения CRS и/или MAS. В одних воплощениях субъектов выбирают для введения модулятора рецепторов S1P, если они получали, получают или будут получать терапию клетками с CAR (например, терапию описанными здесь клетками с CAR, например, терапию клетками с CAR против CD19).

Так, в одном аспекте изобретения предусмотрены композиции клеток с CAR для применения при лечении онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

В другом аспекте изобретения предусмотрены композиции клеток с CAR для применения при лечении метастатических опухолей из солидных раковых опухолей, предпочтительно метастазов в лимфоидные органы, более предпочтительно метастазов в лимфатические узлы, у нуждающихся в этом субъектов, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки, экспрессирующие

молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

В другом аспекте терапевтически эффективное количество модулятора рецепторов S1P вводят до или во время введения терапевтически эффективного количества композиции клеток с CAR.

В другом аспекте клетки с CAR перед их введением обрабатываются *ex vivo* или *in vitro* эффективным количеством модулятора рецепторов S1P или его фосфатного производного. Поэтому изобретением также предусмотрены композиции активированных клеток с CAR для применения при лечении онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, при этом субъектам вводят терапевтически эффективное количество композиции активированных клеток с CAR, причем такие клетки с CAR были обработаны *in vitro* или *ex vivo* эффективным количеством модулятора рецепторов S1P или его фосфатного производного, к примеру, мокравимода.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение композиции клеток с CAR для изготовления лекарственных средств для лечения онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

В другом аспекте изобретения предусмотрены способы лечения онкогематологических заболеваний, которые включают введение терапевтически эффективного количества композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно иммунные Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком (например, CD19).

В одном комплекте воплощений способ включает следующие стадии:

1) получение иммунных клеток, к примеру, иммунных Т-клеток, от нуждающегося в этом субъекта-донора путем проведения лейкофереза,



2) генетическая модификация иммунных клеток от субъекта-донора *ex vivo* с тем, чтобы они экспрессировали молекулы химерных антигеновых рецепторов (CAR), которые связывают антиген, связанный с раком (например, CD19), получая тем самым композицию клеток с CAR,

3) кондиционирование субъекта-реципиента, к примеру, путем обработки данного субъекта-реципиента эффективным количеством лимфоистоющего химиотерапевтического средства или проведения полного облучения тела,

4) введение такому субъекту-реципиенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество клеток с CAR, полученных на стадии 2), и

5) введение субъекту-реципиенту, к примеру, до или после стадии 4), эффективного количества модулятора рецепторов S1P, предпочтительно мокравимода по формуле II или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного типа по формуле Па или Пб, предпочтительно перед стадией 4),

б) необязательно введение субъекту-реципиенту эффективного количества одного или нескольких иммунодепрессантов.

В другом аспекте изобретения предусмотрен способ профилактики или ослабления синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдрома активации макрофагов (MAS) при терапии клетками с CAR (например, терапии Т-клетками с CAR против CD19) у нуждающихся в этом субъектов, включающий введение им модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или MAS у субъектов.

В другом аспекте изобретения предусмотрены модуляторы рецепторов S1P для применения в профилактике синдрома высвобождения цитокинов при терапии клетками с CAR (например, терапии Т-клетками с CAR против CD19) у нуждающихся в этом субъектов, включающей введение им модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или MAS у субъектов.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение модулятора рецепторов S1P для изготовления лекарственных средств для профилактики синдрома высвобождения цитокинов и/или синдрома активации макрофагов при терапии клетками с CAR (например, терапии Т-клетками с CAR против CD19) у нуждающихся в этом субъектов, включающей введение им модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного в комбинации с

терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или синдром активации макрофагов у субъектов.

Настоящее изобретение представлено в различных аспектах, как изложено ниже.

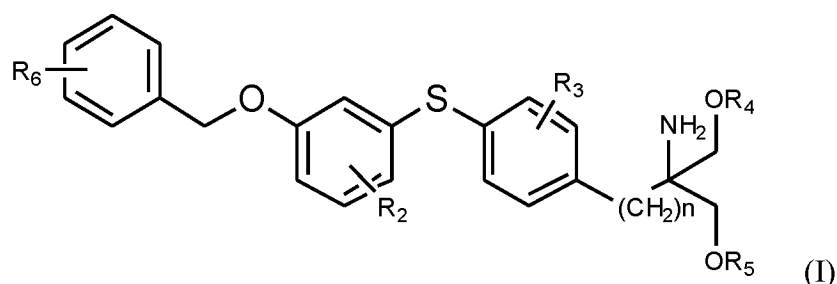
1. Композиция клеток с CAR для применения при лечении онкогематологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно иммунные Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, при этом вводят терапевтически эффективное количество такой композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

2. Композиция клеток с CAR для применения по воплощению 1, при этом такой связанный с раком антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA и их комбинаций, предпочтительно это CD19.

3. Композиция клеток с CAR для применения по воплощению 1 или 2, при этом данный модулятор рецепторов S1P выбран из числа мокравимода, сипонимода, финголимода, озанимода, понесимода, этрасимода, АКР-11, ценеримода, амиселимода, СВР-307, OPL-307, OPL-002, BMS-986166, SCD-044, BOS-173717, CP-1050, предпочтительно это мокравимод.

4. Композиция клеток с CAR для применения по воплощению 3, при этом данный модулятор рецепторов S1P является агонистом рецепторов S1P.

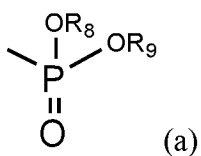
5. Композиция клеток с CAR для применения по воплощению 3 или 4, при этом агонист рецепторов S1P имеет нижеследующую формулу (I) или (II) или (IIa) или (IIb):



где: R<sub>2</sub> означает H, галоген, тригалометил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, C<sub>1-7</sub>-алкил, фенэтил или бензилокси;

R<sub>3</sub> означает H, галоген, CF<sub>3</sub>, OH, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, бензилокси, фенил или C<sub>1-4</sub>-алкоксиметил;

каждый из R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> независимо означает H или остаток по формуле (a):

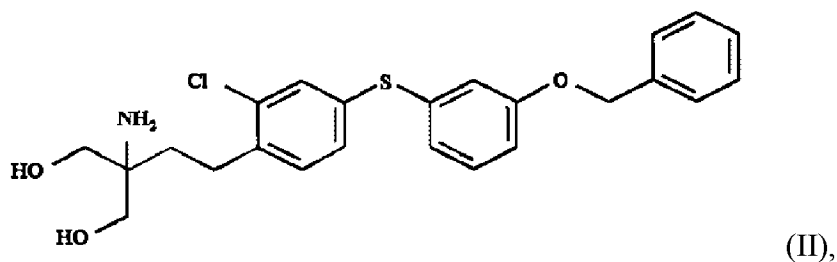


где каждый из  $R_8$  и  $R_9$  независимо означает H или  $C_{1-4}$ -алкил, необязательно замещенный галогеном;

$n$  – целое число от 1 до 4; и

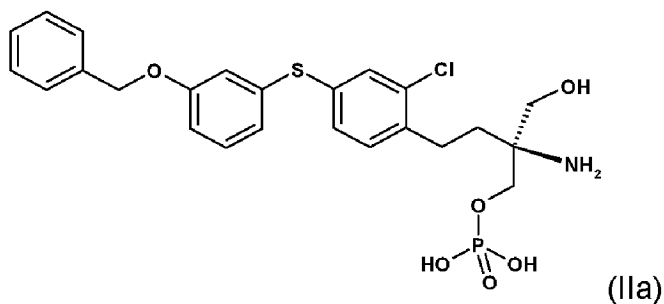
$R_6$  означает водород, галоген,  $C_{1-7}$ -алкил,  $C_{1-4}$ -алкокси или трифторметил;

или :

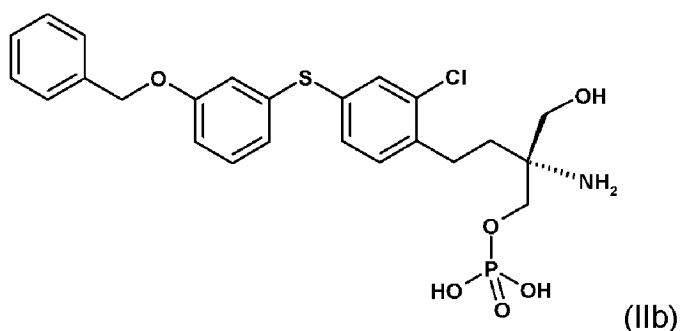


либо их фармацевтически приемлемые соли;

или :



or



6. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-5, при этом агонистом рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное.

7. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-6, при этом онкогематологическое заболевание представляет собой лейкоз и/или лимфому.

8. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-7, при

этом онкогематологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), хронического миелоидного лейкоза (CML), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (MCL), первичной крупноклеточной В-клеточной лимфомы средостения (PMBCL) или множественной миеломы, предпочтительно из ALL, DLBCL, PMBCL и MCL, более предпочтительно это DLBCL.

9. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-8, при этом вводят эффективное количество клеток с CAR, предпочтительно Т-клеток с CAR, в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на 1 кг массы тела.

10. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-9, при этом клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, вводят через 2-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

11. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-10, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в суточной дозе от 0,05 мг до 40 мг, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг или 1 мг.

12. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-11, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят ежедневно в течение по меньшей мере 1, 2, 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная с первого дня между 1-м и 20-м днем перед введением композиции, содержащей клетки с CAR, более предпочтительно за 11 дней перед введением клеток с CAR.

13. Композиция клеток с CAR для применения по любому из воплощений 1-12, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для предотвращения выхода клеток с CAR из костного мозга и/или стимулирования приживления и персистенции клеток с CAR и/или повышения эффективности терапии клетками с CAR.

14. Способ лечения онкогематологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции клеток с CAR, предпочтительно аутологичных или сингенных клеток с CAR, в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P, причем данные клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с

раком.

15. Способ по воплощению 14, при этом данные клетки с CAR представляют собой Т-клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR против CD19.

16. Способ по воплощению 14 или 15, при этом количество клеток с CAR в периферической крови субъекта снижается на 1-40%, предпочтительно на 10-30% при измерении методом проточной цитометрии после 7 дней, предпочтительно 14 дней лечения с применением модулятора рецепторов S1P по сравнению с количеством, измеренным без применения модулятора рецепторов S1P.

17. Способ по любому из воплощений 14-16, включающий:

1) получение иммунных клеток, к примеру, иммунных Т-клеток от субъекта-донора путем проведения лейкофереза,

2) генетическая модификация иммунных клеток от субъекта-донора *ex vivo* с тем, чтобы они экспрессировали молекулы химерных антигеновых рецепторов (CAR), которые связывают антиген, получая тем самым композицию клеток с CAR,

3) кондиционирование субъекта-реципиента, к примеру, путем обработки данного субъекта-реципиента эффективным количеством лимфоистошающего химиотерапевтического средства или проведения полного облучения тела,

4) введение такому субъекту-реципиенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество клеток с CAR, полученных на стадии 2), и

5) введение субъекту-реципиенту эффективного количества модулятора рецепторов S1P, предпочтительно мокравимода или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного,

6) необязательно введение субъекту-реципиенту эффективного количества одного или нескольких иммунодепрессантов.

18. Способ по воплощению 17, при этом лимфоистошающее химиотерапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из мелфалана, цитарабина, этопозиды, бусульфана, бендамустина, циклофосфамида, флударабина, дексаметазона и алемтузумаба, а также их комбинаций типа комбинированного введения флударабина/циклофосфамида, цитарабина/этопозиды.

19. Способ по воплощению 16, при этом режим кондиционирования на стадии 3) заключается во:

- введении флударабина и циклофосфамида, или
- введении цитарабина и этопозиды, или
- введении бендамустина.

20. Способ по любому из воплощений 14-19, при этом клетки с CAR, предпочти-

тельно Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против CD19, вводят в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на 1 кг массы тела.

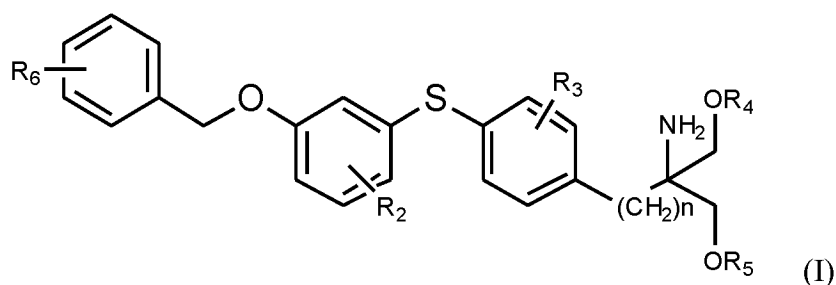
21. Способ по любому из воплощений 14-20, при этом клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против CD19, вводят через 2-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

22. Способ по любому из воплощений 14-21, при этом данный связанный с раком антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA, предпочтительно это CD19.

23. Способ по любому из воплощений 14-22, при этом данный модулятор рецепторов S1P выбран из числа мокравимода, сипонимода, финголимода, озанимода, понесимода, этрасимода, АКР-11, ценеримода, амиселимода, СВР-307, OPL-307, OPL-002, BMS-986166, SCD-044, BOS-173717, CP-1050, предпочтительно это мокравимод.

24. Способ по воплощению 23, при этом данный модулятор рецепторов S1P является агонистом рецепторов S1P.

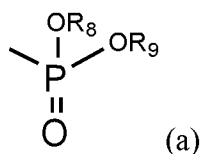
25. Способ по воплощению 24, при этом агонист рецепторов S1P имеет нижеследующую формулу (I) или (II) или (IIa) или (IIb):



где:  $R_2$  означает H, галоген, тригалометил,  $C_{1-4}$ -алкокси,  $C_{1-7}$ -алкил, фенэтил или бензилокси;

$R_3$  означает H, галоген,  $CF_3$ , OH,  $C_{1-7}$ -алкил,  $C_{1-4}$ -алкокси, бензилокси, фенил или  $C_{1-4}$ -алкоксиметил;

каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо означает H или остаток по формуле (a):

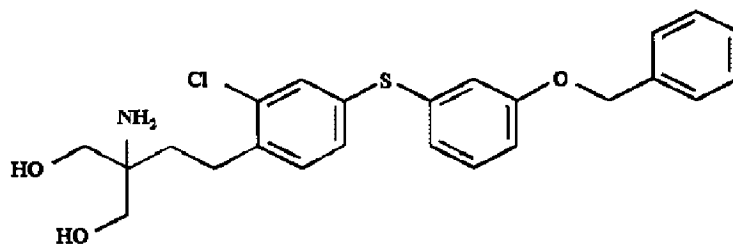


где каждый из  $R_8$  и  $R_9$  независимо означает H или  $C_{1-4}$ -алкил, необязательно замещенный галогеном;

$n$  – целое число от 1 до 4; и

$R_6$  означает водород, галоген,  $C_{1-7}$ -алкил,  $C_{1-4}$ -алкокси или трифторметил;

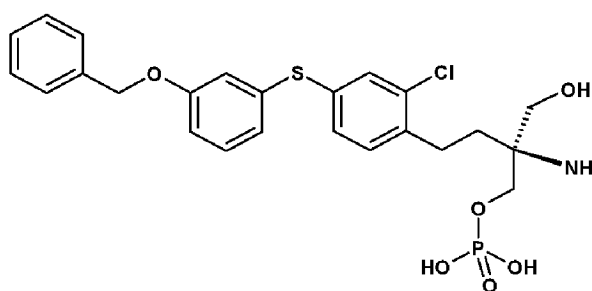
или :



(II),

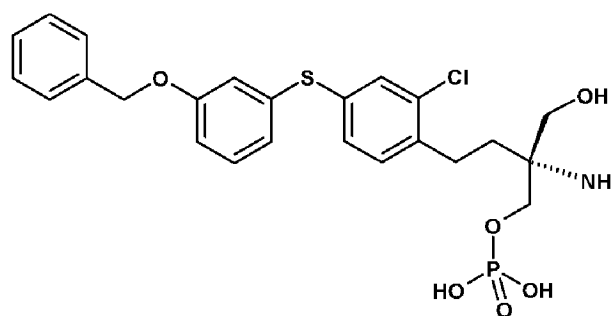
либо их фармацевтически приемлемые соли;

или :



(IIa)

or



(IIb)

26. Способ по любому из воплощений 14-25, при этом модулятором рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное.

27. Способ по любому из воплощений 14-26, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в суточной дозе от 0,05 мг до 40 мг, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг или 1 мг.

28. Способ по любому из воплощений 14-27, при этом модулятором рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное, причем мокравимод входит в состав твердой дозовой формы, которая

содержит:

- 1 мг/ед. мокравимода или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного;
- маннитол, предпочтительно в количестве от 48 до 88 мг/ед., более предпочтительно от 58 до 78 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 68 мг/ед.;
- микрокристаллическую целлюлозу, предпочтительно в количестве с от 5 до 45 мг/ед., более предпочтительно от 15 до 35 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 25 мг/ед.;
- крахмалгликолят натрия, предпочтительно в количестве от 1 до 8 мг/ед., более предпочтительно от 2 до 6 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 4 мг/ед.;
- стеарат магния, предпочтительно в количестве от 0,025 до 4 мг/ед., более предпочтительно от 0,5 до 2 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 1 мг/ед.; и
- коллоидный диоксид кремния, предпочтительно в количестве от 0,125 до 2 мг/ед., более предпочтительно от 0,25 до 1 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 0,5 мг/ед.

29. Способ по любому из воплощений 14-28, при этом данный модулятор рецепторов SIP вводят ежедневно в течение по меньшей мере 1, 2, 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная с первого дня между 1-м и 20-м днем перед введением композиции, содержащей клетки с CAR, более предпочтительно за 11 дней перед введением клеток с CAR.

30. Способ по любому из воплощений 14-29, при этом онкогематологическое заболевание представляет собой лейкоз и/или лимфому.

31. Способ по любому из воплощений 14-30, при этом онкогематологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), хронического миелоидного лейкоза (CML), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (MCL), первичной крупноклеточной В-клеточной лимфомы средостения (PMBCL) или множественной миеломы, предпочтительно из ALL, DLBCL, PMBCL и MCL, более предпочтительно это DLBCL.

32. Способ по любому из воплощений 14-31, при этом один или несколько иммунодепрессантов выбраны из группы, состоящей из циклоспорина А, сиролимуса, такролимуса, метотрексата и микофенолята, предпочтительно это циклоспорин А или



комбинация циклоспорина А и метотрексата.

33. Способ по любому из воплощений 14-32, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для предотвращения выхода клеток с CAR из костного мозга и/или стимулирования приживления и персистенции клеток с CAR и/или повышения эффективности терапии клетками с CAR.

34. Способ по любому из воплощений 14-33, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для снижения риска синдрома высвобождения цитокинов, в частности синдрома системного высвобождения цитокинов у субъекта, получающего клетки с CAR.

35. Способ по любому из воплощений 14-34, при этом субъект-донор клеток с CAR является субъектом-реципиентом.

36. Способ по любому из воплощений 14-34, при этом субъект-донор клеток с CAR не является субъектом-реципиентом.

37. Способ по воплощению 36, при этом модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для снижения риска GVHD.

38. Способ по любому из воплощений 14-36, при этом модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для снижения риска нейровоспаления, например, синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS).

39. Способ профилактики синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), при терапии клетками с CAR (например, терапии против CD19) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение ему модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или MAS и/или ICANS у субъекта.

40. Способ повышения противоопухолевой эффективности терапии с CAR (например, терапии против CD19) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение ему эффективного количества модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым активируя экспрессирующие CAR клетки и/или непосредственно уничтожая раковые клетки, вследствие чего повышая противоопухолевую эффективность терапии с CAR.

41. Способ по воплощению 39 или 40, при этом терапия клетками с CAR представляет собой терапию Т-клетками с CAR, предпочтительно терапию Т-клетками с CAR против CD19.

42. Способ по любому из воплощений 39-41, включающий:

1) получение иммунных клеток, к примеру, иммунных Т-клеток от субъекта-

донора путем проведения лейкафереза,

2) генетическая модификация иммунных клеток от субъекта-донора *ex vivo* с тем, чтобы они экспрессировали молекулы химерных антигеновых рецепторов (CAR), которые связывают антиген, связанный с раком, тем самым получая композицию клеток с CAR,

3) кондиционирование субъекта-реципиента, к примеру, путем обработки данного субъекта-реципиента эффективным количеством лимфоистоющего химиотерапевтического средства или проведения полного облучения тела,

4) введение такому субъекту-реципиенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество клеток с CAR, полученных на стадии 2), и

5) введение субъекту-реципиенту эффективного количества модулятора рецепторов S1P, предпочтительно мокравимода или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного,

6) необязательно введение субъекту-реципиенту эффективного количества одного или нескольких иммунодепрессантов.

43. Способ по воплощению 42, при этом лимфоистоющее химиотерапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из мелфалана, цитарабина, этопозиды, бусульфана, бендамустина, циклофосфамида, флударабина, дексаметазона и алемтузумаба, а также их комбинаций типа комбинированного введения флударабина/циклофосфамида, цитарабина/этопозиды.

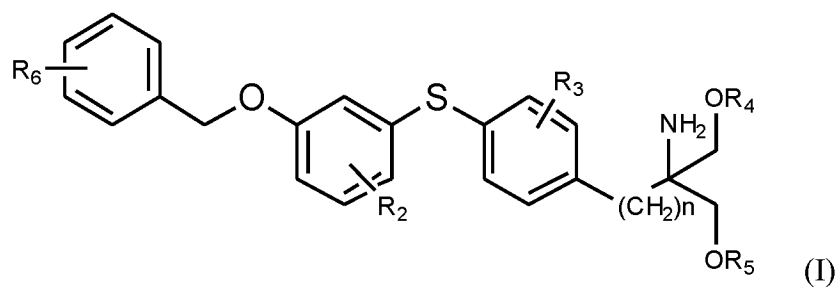
44. Способ по воплощению 42, при этом режим кондиционирования на стадии 3) заключается во:

- введении флударабина и циклофосфамида, или
- введении цитарабина и этопозиды, или
- введении бендамустина.

45. Способ по любому из воплощений 39-44, при этом данный модулятор рецепторов S1P выбран из числа мокравимода, сипонимода, финголимода, озанимода, понесимода, этрасимода, АКР-11, ценеримода, амиселимода, СВР-307, OPL-307, OPL-002, BMS-986166, SCD-044, BOS-173717, CP-1050, предпочтительно это мокравимод.

46. Способ по воплощению 45, при этом данный модулятор рецепторов S1P является агонистом рецепторов S1P.

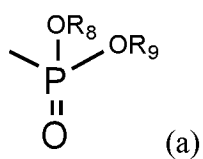
47. Способ по воплощению 46, при этом агонист рецепторов S1P имеет следующую формулу (I) или (II) или (IIIa) или (IIIb):



где: R<sub>2</sub> означает H, галоген, тригалометил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, C<sub>1-7</sub>-алкил, фенэтил или бензилокси;

R<sub>3</sub> означает H, галоген, CF<sub>3</sub>, OH, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, бензилокси, фенил или C<sub>1-4</sub>-алкоксиметил;

каждый из R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> независимо означает H или остаток по формуле (а):

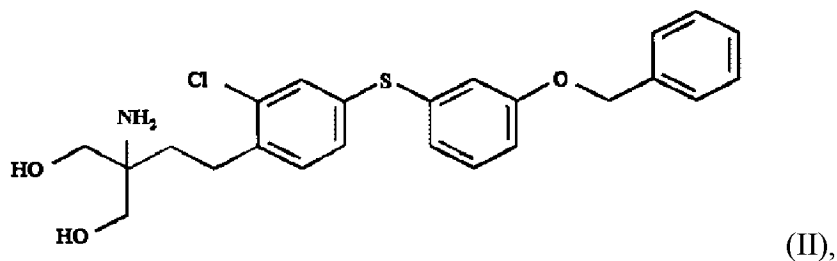


где каждый из R<sub>8</sub> и R<sub>9</sub> независимо означает H или C<sub>1-4</sub>-алкил, необязательно замещенный галогеном;

n – целое число от 1 до 4; и

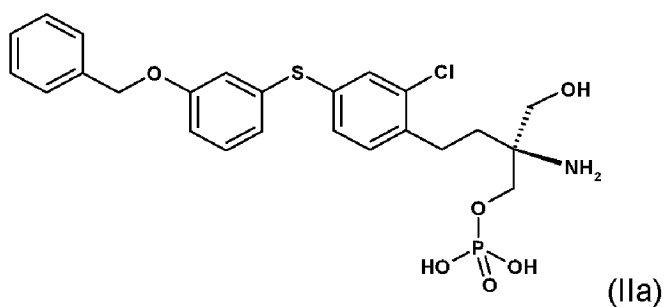
R<sub>6</sub> означает водород, галоген, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси или трифторметил;

или :

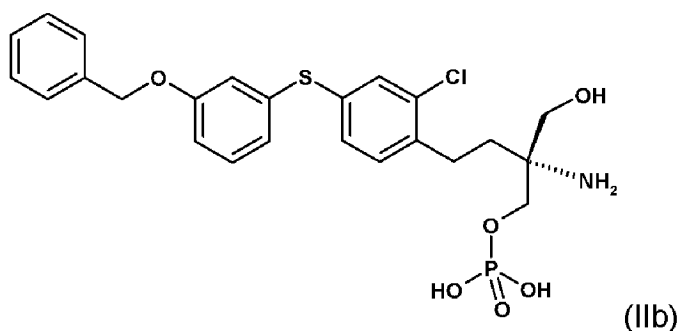


либо их фармацевтически приемлемые соли;

или :



or



48. Способ по любому из воплощений 39-47, при этом модулятором рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное.

49. Способ по любому из воплощений 39-48, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в суточной дозе от 0,05 мг до 40 мг, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг или 1 мг.

50. Способ по любому из воплощений 39-49, при этом модулятором рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное, причем мокравимод входит в состав твердой дозовой формы, которая содержит:

- маннитол, предпочтительно в количестве от 48 до 88 мг/ед., более предпочтительно от 58 до 78 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 68 мг/ед.;

- микрокристаллическую целлюлозу, предпочтительно в количестве с от 5 до 45 мг/ед., более предпочтительно от 15 до 35 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 25 мг/ед.;

- крахмалгликолят натрия, предпочтительно в количестве от 1 до 8 мг/ед., более предпочтительно от 2 до 6 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 4 мг/ед.;

- стеарат магния, предпочтительно в количестве от 0,025 до 4 мг/ед., более

предпочтительно от 0,5 до 2 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 1 мг/ед.; и

– коллоидный диоксид кремния, предпочтительно в количестве от 0,125 до 2 мг/ед., более предпочтительно от 0,25 до 1 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 0,5 мг/ед.

51. Способ по любому из воплощений 39-50, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят ежедневно в течение по меньшей мере 1, 2, 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная с первого дня между 1-м и 20-м днем перед введением композиции, содержащей клетки с CAR, более предпочтительно за 11 дней перед введением клеток с CAR.

52. Способ по любому из воплощений 39-51, при этом клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против CD19, вводят в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на 1 кг массы тела.

53. Способ по любому из воплощений 39-52, при этом клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против CD19, вводят через 2-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

54. Способ по любому из воплощений 39-53, при этом такой связанный с раком антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA.

55. Способ по любому из воплощений 39-54, при этом субъект, нуждающийся в терапии клетками с CAR, страдает онкогематологическим заболеванием, представляющим собой лейкоз и/или лимфому, к примеру, онкогематологическим заболеванием, выбранным из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), хронического миелоидного лейкоза (CML), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (MCL), первичной крупноклеточной В-клеточной лимфомы средостения (PMBCL) или множественной миеломы, предпочтительно из ALL, DLBCL, PMBCL и MCL, более предпочтительно это DLBCL.

56. Модулятор рецепторов S1P для применения в профилактике синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), при терапии клетками с CAR (например, терапии против CD19) у нуждающегося в этом субъекта, включающей введение ему модулятора рецепторов S1P (например,

мокравимода) в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или MAS и/или ICANS у субъекта.

57. Модулятор рецепторов S1P для применения в повышении эффективности терапии клетками с CAR (например, терапии против CD19) у нуждающегося в этом субъекта, включающего введение ему модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым активируя клетки с CAR и/или непосредственно уничтожая раковые клетки, вследствие чего повышая противоопухолевый эффект.

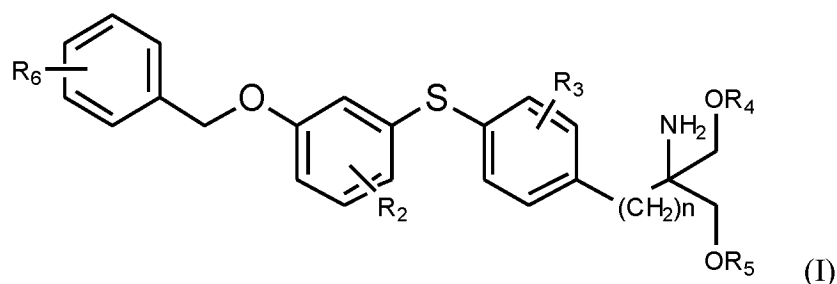
58. Применение композиции клеток с CAR для изготовления лекарственного средства для лечения онкогематологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, при этом клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, причем вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

59. Применение по воплощению 58, при этом такой связанный с раком антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA и их комбинаций, предпочтительно это CD19.

60. Применение по воплощению 58 или 59, при этом данный модулятор рецепторов S1P выбран из числа мокравимода, сипонимода, финголимода, озанимода, понесимода, этрасимода, АКР-11, ценеримода, амиселимода, СВР-307, OPL-307, OPL-002, BMS-986166, SCD-044, BOS-173717, CP-1050, предпочтительно это мокравимод.

61. Применение по воплощению 60, при этом данный модулятор рецепторов S1P является агонистом рецепторов S1P.

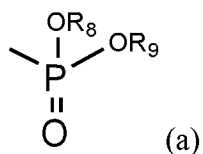
62. Применение по воплощению 60 или 61, при этом агонист рецепторов S1P имеет нижеследующую формулу (I) или (II) или (IIa) или (IIb):



где: R<sub>2</sub> означает H, галоген, тригалометил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, C<sub>1-7</sub>-алкил, фенэтил или бензилокси;

R<sub>3</sub> означает H, галоген, CF<sub>3</sub>, OH, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, бензилокси, фенил или C<sub>1-4</sub>-алкоксиметил;

каждый из  $R_4$  и  $R_5$  независимо означает H или остаток по формуле (a):

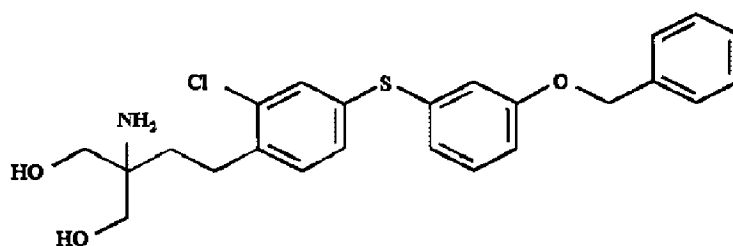


где каждый из  $R_8$  и  $R_9$  независимо означает H или  $C_{1-4}$ -алкил, необязательно замещенный галогеном;

$n$  – целое число от 1 до 4; и

$R_6$  означает водород, галоген,  $C_{1-7}$ -алкил,  $C_{1-4}$ -алкокси или трифторметил;

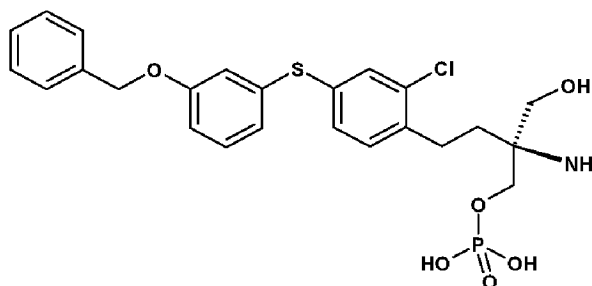
или :



(II),

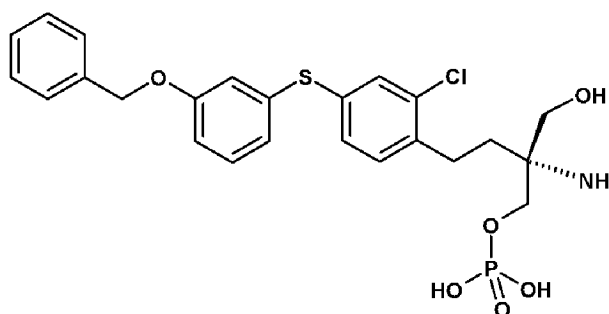
либо их фармацевтически приемлемые соли;

или :



(IIa)

or



(IIb)

63. Применение по любому из воплощений 58-62, при этом агонистом рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное.

64. Применение по любому из воплощений 58-63, при этом онкогематологическое заболевание представляет собой лейкоз и/или лимфому.

65. Применение по любому из воплощений 58-64, при этом онкогематологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), хронического миелоидного лейкоза (CML), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (MCL), первичной крупноклеточной В-клеточной лимфомы средостения (PMBCL) или множественной миеломы, предпочтительно из ALL, DLBCL, PMBCL и MCL, более предпочтительно это DLBCL.

66. Применение по любому из воплощений 58-65, при этом вводят эффективное количество клеток с CAR, предпочтительно Т-клеток с CAR, в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на 1 кг массы тела.

67. Применение по любому из воплощений 58-66, при этом клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, вводят через 2-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

68. Применение по любому из воплощений 58-67, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в суточной дозе от 0,05 мг до 40 мг, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг или 1 мг.

69. Применение по любому из воплощений 58-68, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят ежедневно в течение по меньшей мере 1, 2, 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная с первого дня между 1-м и 20-м днем перед введением композиции, содержащей клетки с CAR, более предпочтительно за 11 дней перед введением клеток с CAR.

70. Применение по любому из воплощений 58-69, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для предотвращения выхода клеток с CAR из костного мозга и/или стимулирования приживания и персистенции клеток с CAR и/или повышения эффективности терапии клетками с CAR.

71. Применение модулятора рецепторов S1P для изготовления лекарственного средства для профилактики синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), при терапии клетками с CAR (например, терапии Т-клетками с CAR против CD19), предпочтительно при терапии аутологичными или сингенными клетками с CAR у нуждающегося в этом субъекта, включающей введение ему модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) или его фармацевтически



приемлемой соли или его фосфатного производного в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или MAS и/или ICANS у субъекта.

72. Применение по воплощению 72, при этом терапия клетками с CAR представляет собой терапию аутологичными или аллогенными Т-клетками с CAR.

### **Раскрытие сущности изобретения**

Изобретение включает способы лечения онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, включающие введение им терапевтически эффективного количества композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

Изобретение касается композиций клеток с CAR для применения при лечении онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, причем клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, например, Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком (например, CD19), при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

Изобретение также касается применения композиций клеток с CAR для изготовления лекарственных средств для лечения онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

Изобретение также касается применения композиций клеток с CAR при получении фармацевтических композиций для лечения онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, при этом вводят терапевтически эффективное количество композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

### **Общие определения**

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистами в той области, к которой относится изобретение.

В настоящем изобретении “модулятор” – это соединение, которое при введении субъектам обеспечивает требуемое взаимодействие с целевым рецептором либо посредством действия соединения непосредственно на сам рецептор, либо посредством метаболита соединения, действующего на рецептор. При введении субъектам модулятор рецепторов S1P, предпочтительно мокравимод (также именуется как KRP203),

взаимодействует с рецепторами S1P, либо активируя, либо ингибируя, либо снижая уровень рецепторов, что приводит к нарушению передачи сигналов.

В настоящем изобретении “агонист S1P” означает такое соединение, которое запускает физиологическую реакцию при сочетании с рецептором S1P. Предпочтительно запускаемая физиологическая реакция – это индуцированная агонистом интернализация рецептора S1P. Кинетика индуцированной агонистом интернализации из клеточных мембран и рециркуляции рецепторов S1P на клеточную мембрану после сброса данного соединения зависит от самого соединения. Такие агонисты рецепторов S1P могут также именоваться функциональными антагонистами. Постоянство интернализации обуславливает свойства “функционального антагонизма” у агониста.

Термин “фармацевтически приемлемые соли” включает соли как с кислотами, так и с основаниями. Неограничительные примеры фармацевтически приемлемых солей с кислотами включают хлориды, гидрохлориды, бромиды, сульфаты, нитраты, фосфаты, сульфонаты, метансульфонаты, формиаты, тартраты, малеаты, цитраты, бензоаты, салицилаты и аскорбаты. Неограничительные примеры фармацевтически приемлемых солей с основаниями включают соли натрия, калия, лития, аммония (замещенного и незамещенного), кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца и алюминия. Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены, к примеру, по стандартным методикам, хорошо известным в области фармацевтики. Для мокравимода фармацевтически приемлемыми солями обычно являются соли с кислотами, так как мокравимод сам по себе является основанием. Предпочтительно его фармацевтически приемлемыми солями являются гидрохлоридные соли.

Термин “его фосфатные производные” включает сложные эфиры фосфатов типа по формуле Ia или Ib.

Термин “вспомогательное вещество-эксципиент” означает такое неактивное вещество, которое добавляется вместе с лекарственным веществом и является частью рецептурной смеси. Фармацевтически приемлемыми эксципиентами являются, к примеру, наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные вещества, распределяющие и чувствительные агенты, средства доставки, такие как консерванты, разрыхлители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие вещества, загустители, подсластители, вкусовые добавки, ароматизаторы, антибактериальные средства, фунгициды, смазывающие вещества и регуляторы продолжительной доставки, антиоксиданты, скользящие вещества. Их выбор и подходящие пропорции зависят от характера, способа введения и дозировки.

“Средний размер частиц” – это значение  $D_{50}$ , которое означает, что 50% частиц

имеют размер, меньший или равный указанному значению. Например, средний размер частиц, меньший или равный 8 мкм, означает, что  $D_{50}$  равно 8 мкм, т.е. 50% частиц имеют размер частиц, меньший или равный 8 мкм. Термин  $D_{90}$  означает, что 90% частиц имеют размер, меньший или равный указанному значению. Например, значение  $D_{90}$ , меньшее или равное 25 мкм, означает, что 90% частиц имеют размер, меньший или равный 25 мкм. Значения  $D_{50}$  и  $D_{90}$  определяются методом дифракции лазерного излучения в жидкой среде, например, на лазерном дифракционном анализаторе размера частиц Beckman-Coulter LS 230, оснащенный модулем диспергирования в малом объеме (жидкой среды), в соответствии с техническим руководством и инструкциями производителя.

Термин “синдром высвобождения цитокинов” (CRS) относится к существенному осложнению, связанному с терапией клетками с CAR, которое представляет собой острый воспалительный процесс, отмеченный рядом клинических симптомов и значительным, но кратковременным повышением уровня цитокинов в сыворотке. У большинства пациентов CRS случается через 1-14 дней после вливания Т-клеток с CAR и редко возникает более чем через 17 дней после вливания. Данные свидетельствуют о том, что CRS, связанный с Т-клетками с CAR, зависит от взаимодействия Т-клеток с целевым антигеном, после чего следует пролиферация и функциональная реакция. Другие факторы, влияющие на CRS, могут включать тип заболевания, природу и степень лимфоистощения, а также конструкцию CAR. Поскольку CRS связан со взаимодействием Т-клеток с целевым антигеном, он не ограничивается только терапией против CD19. CRS наблюдался у 4 из 7 (57%) обследованных педиатрических или молодых взрослых пациентов с t/t ALL, получавших Т-клетки с CAR, нацеленным на CD22. Кроме того, CRS наблюдался у пациентов с множественной миеломой (ММ), получавших Т-клетки с CAR, нацеленным на CD19 или на антиген созревания В-клеток (BCMA). Предпочтительна шкала оценки CRS, разработанная U.Penn (D. Porter et al., J Hematol Oncol. 2018, 11:35).

Термин “тяжелая форма CRS”, в отличие от термина “нетяжелая форма CRS”, относится к CRS 3-й или 4-й степени тяжести. Тяжелая форма CRS 3-й степени означает то, что требуется госпитализация для лечения симптомов, связанных с дисфункцией органов, включая LFT 4-й степени или уровень креатинина 3-й степени в связи с CRS и не связанные с какими-либо другими заболеваниями; это включает и гипотензию, которую лечат внутривенным введением жидкости (определяется как многократное введение жидкости для поддержания артериального давления) или низких доз вазопрессоров, коагулопатию, при которой требуется свежемороженая плазма или криопреципитат или концентрат фибриногена, и гипоксию, при которой требуется дополнительная подача кислорода (кислород через назальную канюлю, кислород под высоким давлением, CPAP

или ViPAP). Тяжелая форма CRS 4-й степени охватывает такие опасные для жизни осложнения, как гипотензия, требующая высоких доз вазопрессоров, и гипоксия, требующая искусственной вентиляции легких.

Термин “синдром активации макрофагов” (MAS) относится к симптомам типа MAS, которые наблюдаются у пациентов, получавших клетки с CAR, и могут быть опасными для жизни. MAS иногда является синонимом вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) – термина, используемого ревматологами для описания опасного для жизни осложнения системных воспалительных заболеваний, чаще всего встречающегося при системном ювенильном идиопатическом артрите (sJIA) и его эквиваленте у взрослых – болезни Стилла у взрослых. Традиционные определения MAS с трудом применимы у пациентов, получающих Т-клетки с CAR, из-за совпадения признаков и симптомов с лимфоистощением и CRS. Однако сначала возникают симптомы CRS, характеризующиеся жаром и повышением уровня С-реактивного белка (CRP), а затем после CRS может развиваться MAS (или симптомы типа MAS), характеризующийся снижением уровня фибриногена, быстрым повышением ферритина и лактатдегидрогеназы.

Термин “химерный антигеновый рецептор” или “CAR” относится к искусственным клеточным рецепторам, например, к рецепторам типа Т-телец, одноцепочечным иммунорецепторам, химерным Т-клеточным рецепторам или химерным иммунорецепторам, к примеру, и охватывает сконструированные рецепторы, придающие искусственную специфичность определенным иммунным эффекторным клеткам. CAR могут применяться для придания специфичности моноклональных антител Т-клеткам, что позволяет тем самым генерировать большое количество специфичных Т-клеток, например, для применения в адоптивной клеточной терапии. В определенных воплощениях CAR определяют специфичность клеток, например, к связанным с раком антигенам. В некоторых воплощениях CAR содержат внутриклеточный активационный домен (позволяющий Т-клеткам активироваться при взаимодействии направляющей части с целевыми клетками типа целевых раковых клеток), трансмембранный домен и внеклеточный домен, который может варьироваться по длине и содержит связанный с заболеванием или расстройством участок, например, участок связывания с раковым антигеном. В определенных аспектах CAR содержат слитые с ними одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), полученные из моноклональных антител и слитые с трансмембранным доменом и эндодоменом CD3-дзета. Специфичность других конструкций CAR может исходить от лигандов рецепторов (например, пептидов) или от рецепторов распознаванию паттерна типа дектинов. В некоторых случаях можно

модифицировать расстояние между доменами, распознающими антигены, чтобы уменьшить вызванную активацией гибель клеток. В некоторых случаях CAR содержат домены для дополнительной костимулирующей сигнализации типа CD3 $\zeta$ , FcR, CD27, CD28, CD137, DAP 10/12 и/или OX40, ICOS, TLR (например, TLR2) и др. В некоторых случаях вместе с CAR могут экспрессироваться и другие молекулы, в том числе костимулирующие молекулы, репортерные гены для визуализации (например, для позитронно-эмиссионной томографии), продукты генов, способных устранять Т-клетки при добавлении пролекарства, самонаводящиеся рецепторы, хемокины, рецепторы хемокинов, цитокины и рецепторы цитокинов. Кроме того, специалистам в данной области должно быть понятно, что костимулирующий домен не обязательно должен кодироваться только полноразмерной последовательностью нуклеотидов гена. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает, без ограничения, применение частичных последовательностей нуклеотидов более чем одного гена, а эти последовательности нуклеотидов располагаются в различных комбинациях для получения требуемого иммунного ответа.

Термин “противоопухолевый эффект” в настоящем изобретении относится к таким биологическим эффектам, которые могут проявляться уменьшением объема опухоли, снижением количества опухолевых клеток, снижением количества метастазов, увеличением продолжительности жизни или ослаблением различных физиологических симптомов, связанных с раковым заболеванием.

Термин “антиген” или “Ag” относится к молекулам, которые вызывают иммунные ответы. Такие иммунные ответы могут включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо то и другое. Специалистам должно быть понятно, что в качестве антигенов могут служить любые макромолекулы, включая практически все белки или пептиды.

Термины “связанный с раком антиген” или “опухолевый антиген” или “антиген пролиферативного заболевания” или “антиген, связанный с пролиферативным заболеванием” взаимозаменяемо относятся к молекулам (как правило, белкам, углеводам или липидам), которые экспрессируются на поверхности раковых клеток либо полностью, либо в виде фрагментов (например, МНС/пептидов), и применимы для наведения фармакологических средств на раковые клетки. В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой опухолеспецифичный антиген (TSA), встречающийся только в раковых клетках, но не в здоровых клетках, или это связанные с опухолями антигены (ТАА), уровень которых повышен в опухолевых клетках, но они экспрессируются на более низком уровне и в здоровых клетках. Представляют интерес TSA типа

неоантигенов, которые являются специфическими раковыми мутациями *de novo*. Другие представляющие интерес ТАА – это внутриклеточные мишени, которые экспонируются на поверхности клеток системой МНС (антигены типа МНС-пептидов); такими внутриклеточными ТАА, связанными с гематологическими видами рака, являются, например, WT1, MAGE-4, тирозиназа, PRAME и сурвивин.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген является маркером, который экспрессируется и в нормальных, и в раковых клетках, например, маркером линии происхождения, например, CD19 на В-клетках. В некоторых аспектах настоящего изобретения опухолевые антигены происходят из раковых образований, включая, без ограничения, лейкоз, лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, мантийноклеточную лимфому (MCL), первичную крупноклеточную В-клеточную лимфому средостения (PMBCL) или множественную миелому, предпочтительно из ALL, DLBCL, PMBCL и MCL.

В некоторых воплощениях опухолевый антиген представляет собой антиген, который является общим для определенного пролиферативного заболевания.

В некоторых воплощениях связанный с раком антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая гиперэкспрессируется в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками, к примеру, экспрессия повышается в 1 раз, в 2 раза, в 3 раза или больше по сравнению с нормальными клетками.

В некоторых воплощениях связанный с раком антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая синтезируется неправильно в раковых клетках, например, молекулу, которая содержит делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой в нормальных клетках. В некоторых воплощениях связанный с раком антиген должен экспрессироваться исключительно на поверхности раковых клеток, полностью или в виде фрагмента (например, МНС/пептида), и не должен синтезироваться или экспрессироваться на поверхности нормальных клеток. В некоторых воплощениях CAR по настоящему изобретению включают CAR типа TCR, содержащие антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который связывается с презентруемым МНС пептидом. В норме пептиды, полученные из эндогенных белков, входят в карманы молекул класса I главного комплекса гистосовместимости (МНС) и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) на Т-лимфоцитах CD8<sup>+</sup>. Комплексы МНС класса I экспрессируются конститутивно во всех содержащих ядра клетках. При раковых заболеваниях вирусоспецифичные и/или

опухолеспецифичные комплексы пептид/МНС представляют уникальный класс мишеней на клеточной поверхности для иммунотерапии.

Примеры предпочтительных связанных с раком антигенов или комбинаций связанных с раком антигенов, которые могут быть мишенью CAR, обычно посредством scFv или сконструированных Т-клеточных рецепторов, включают CD4, CD5, CD7, CD19, CD19/CD20, CD19/CD22; CD20, CD22, CD20/CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD39, CD70; CD123, CD44v6 (вариант изоформы 6), CD123/CLL1, BCMA CD38/BCMA, CD19/BCMA, CD56, CD138, LeY, ROR1, SLAMF7, nFLT3, LMP1, BCMA/TACI, CS1, GPRC5D, CS1/BCMA, NKG2D, CLL-1, GD2, MCSP, CD5, лиганды NKG2D, МНС-пептидные антигены. Более предпочтительно такие связанные с раком антигены или комбинации связанных с раком антигенов выбирают из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA, GD2, MCSP, CD5, NKG2D, МНС-пептидных антигенов либо их комбинаций, предпочтительно это CD19.

В настоящем изобретении “клетки с CAR” обозначают клетки, экспрессирующие CAR, а композиции клеток с CAR означают композиции, содержащие клетки с CAR или популяции клеток с CAR. В некоторых воплощениях клетки, экспрессирующие CAR, могут представлять собой Т-клетки, В-клетки, клетки макрофагов, дендритные клетки или НК-клетки. Терапия, которая включает введение терапевтически эффективного количества композиции клеток с CAR, именуется здесь терапией клетками с CAR. Термин “стимуляция” обозначает первичный ответ, индуцируемый при связывании стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3 или CAR) со своим лигандом (или опухолевым антигеном в случае CAR), тем самым опосредуя явления передачи сигналов, без ограничения, типа передачи сигналов через комплекс TCR/CD3 или передачи сигналов через соответствующий NK-рецептор или сигнальные домены CAR. Стимуляция может опосредовать изменение экспрессии определенных молекул.

В настоящем изобретении “активация клеток с CAR” обозначает активацию клеток с CAR, которая выявляется по значительному повышению клеточной или внутриклеточной экспрессии одного или нескольких маркеров активации в клетках с CAR, что обычно приводит к повышению уничтожающей активности клеток с CAR. Активация Т-клеток с CAR, к примеру, может выявляться по значительному повышению экспрессии одного или нескольких из следующих маркеров: поверхностного PD1, внутриклеточного гранзима В и поверхностного CD69.

Термин “Т-клетки” (или “иммунные Т-клетки”) относится к типу лимфоцитов, созревающих в тимусе. Т-клетки играют важную роль в клеточном иммунитете и отличаются от других лимфоцитов типа В-клеток наличием Т-клеточных рецепторов на

поверхности клеток. Т-клетки можно либо выделить, либо получить из коммерческих источников. “Т-клетки” охватывают все типы иммунных клеток, экспрессирующих CD3, включая Т-хелперы (клетки CD4<sup>+</sup>), цитотоксические Т-клетки (клетки CD8<sup>+</sup>), Т-клетки натуральных киллеров, регуляторные Т-клетки (T<sub>reg</sub>) и Т-клетки гамма-дельта. “Цитотоксические клетки” включают Т-клетки CD8<sup>+</sup>, клетки натуральных киллеров (NK) и нейтрофилы, которые способны опосредовать реакции цитотоксичности. Неограничительные примеры коммерчески доступных линий Т-клеток включают линии BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC<sup>®</sup> CRL-2902<sup>™</sup>), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC<sup>®</sup> CRL-2900<sup>™</sup>), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC<sup>®</sup> CRL-2901<sup>™</sup>), BCL2 Jurkat (ATCC<sup>®</sup> CRL-2899<sup>™</sup>), Neo Jurkat (ATCC<sup>®</sup> CRL-2898<sup>™</sup>), TALL-104 (ATCC # CRL-11386) цитотоксических Т-клеток человека. Другие примеры включают, без ограничения, такие линии зрелых Т-клеток, например, как Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, SKW-3, SMZ-1 и T34; и линии незрелых Т-клеток, например, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, КОПТ-K1, K-TI, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, от SUPT1 до T14, TALL-1, T ALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, T ALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3, -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063), RS4.11 (ATCC CRL-1873), CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119); и линии кожной Т-клеточной лимфомы, например, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ[G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162). Другим коммерчески доступным источником иммунных клеток являются “нулевые” линии клеток лейкемии, включая, без ограничения, REN, NALL-1, KM-3, L92-221, а также клеточные линии, полученные из других лейкозов и лимфом, таких как эритролейкемия K562, моноцитарный лейкоз ТНР-1, лимфома U937, эритролейкемия HEL, лейкоз HL60, лейкоз НМС-1, лейкоз KG-1, миелома U266. Неограничительные примеры источников для таких коммерчески доступных линий клеток включают Американские типовые культуры.

Термин “Т<sub>reg</sub>” или клетки “Т<sub>reg</sub>” относится к Т-клеткам, обладающим иммуносупрессивной функцией. При этом Т-клетки представляют собой лимфоциты, в том числе Т-клетки любого типа, как-то Т-клетки альфа-бета (например, CD8 или CD4<sup>+</sup>), Т-клетки гамма-дельта, Т-клетки памяти, клетки Т<sub>reg</sub> и т.д. Соответственно, иммуносупрессивная функция может означать способность клеток Т<sub>reg</sub> снижать или ингибировать один или несколько из ряда физиологических и клеточных эффектов, вызываемых иммунной системой в ответ на стимул типа патогена, аллоантигена или



аутоантигена. Примеры таких эффектов включают усиление пролиферации обычных Т-клеток ( $T_{conv}$ ) и секреции провоспалительных цитокинов. Такие эффекты можно использовать в качестве индикаторов силы иммунного ответа. Относительно более слабый иммунный ответ  $T_{conv}$  в присутствии клеток  $T_{reg}$  указывает на способность  $T_{reg}$  подавлять иммунные реакции. Например, относительное снижение секреции цитокинов может свидетельствовать об ослаблении иммунного ответа и тем самым о способности клеток  $T_{reg}$  подавлять иммунные реакции. Клетки  $T_{reg}$  также могут подавлять иммунные реакции, модулируя экспрессию костимулирующих молекул на антигенпрезентирующих клетках (АРС) типа В-клеток, дендритных клеток и макрофагов. Для оценки эффективности супрессии у активированных клеток  $T_{reg}$  *in vitro* после совместного культивирования можно использовать уровни экспрессии CD80 и CD86.

Термин “Т-клетки гамма-дельта” относится к подмножеству Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности особый Т-клеточный рецептор (TCR), а именно  $\gamma\delta$ TCR, состоящий из одной  $\gamma$ -цепи и одной  $\delta$ -цепи. В частности, термин “Т-клетки гамма-дельта” включает все подтипы Т-клеток гамма-дельта, включая, без ограничения, Т-клетки  $\gamma\delta V\delta 1$  и  $V\delta 2$ ,  $V\delta 3$ , а также наивные, эффекторные клетки памяти, центральные клетки памяти и терминально дифференцированные Т-клетки  $\gamma\delta$ . Композиции и способы получения и применения искусственных и не искусственных Т-клеток  $\gamma\delta$  и/или их подтипов включают, без ограничения, описанные в US 2016/0175358; WO 2017/197347; U.S. Pat. No. 9,499,788; US 2018/0169147; U.S. Pat. No. 9,907,820; US 2018/0125889 и US 2017/0196910, содержание каждого из которых включено путем ссылки для всех целей, включая указанные композиции и способы получения и применения искусственных и не искусственных Т-клеток  $\gamma\delta$  и/или их подтипов. В настоящей заявке также предусмотрены такие Т-клетки или другие искусственные лейкоциты или лимфоциты, которые экспрессируют одну  $\gamma$ -цепь либо одну  $\delta$ -цепь, необязательно в сочетании со вторым полипептидом, образуя функциональные TCR. Такие искусственные лейкоциты или лимфоциты, которые экспрессируют одну  $\gamma$ -цепь или одну  $\delta$ -цепь, могут применяться в способах или присутствовать в описанных здесь композициях.

В настоящем изобретении термин “NK-клетки”, также известные как естественные клетки-киллеры, относится к типу лимфоцитов, происходящих из костного мозга и играющих критическую роль во врожденной иммунной системе. NK-клетки обеспечивают быстрый иммунный ответ против инфицированных вирусами клеток, опухолевых клеток или других подвергающихся стрессу клеток, даже в отсутствие антител и главного комплекса гистосовместимости на поверхности клеток. NK-клетки можно выделить или получить из коммерчески доступного источника. Неограничительные примеры

коммерческих линий NK-клеток включают линии NK-92 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2407<sup>™</sup>), NK-92MI (ATCC<sup>®</sup> CRL-2408<sup>™</sup>). Другие примеры включают, без ограничения, NK-линии HANK1, KHYG-1, NK, NK-YS, NOI-90 и YT. Неограничительные примеры источников таких коммерчески доступных линий клеток включают Американскую коллекцию типовых культур или ATCC ([www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)) и Немецкую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур ([www.dsmz.de/](http://www.dsmz.de/)).

В настоящем изобретении термин “В-клетки” или “В-лимфоциты” или любые другие термины, обычно используемые в данной области, относится к типу лимфоцитов, которые созревают в костном мозге и превращаются в лимфоциты, которые функционируют в компонентах гуморального иммунитета адаптивной иммунной системы. В-клетки вырабатывают молекулы антител, связанных с мембраной, и не секретируют эти антитела. В-клетки, в отличие от двух других классов лимфоцитов, Т-клеток и естественных клеток-киллеров, экспрессируют В-клеточные рецепторы (BCR) на своей клеточной мембране. BCR позволяют В-клеткам связываться с тем антигеном, против которого они запускают реакцию антител. Наивные В-клетки или В-клетки памяти активируются антигеном, в зависимости от антигена – с помощью или без помощи Т-клеток, пролиферируют и дифференцируются в эффекторные клетки, секретирующие антитела, известные как плазмобласты или плазматические клетки. Кроме того, В-клетки презентруют антигены, поэтому их называют профессиональными антигенпрезентирующими клетками (APC), и секретируют цитокины, тем самым модулируя иммунные реакции. Установлено, что они в дренирующих опухолях лимфатических узлах, третичных лимфоидных структурах, связанных с опухолями, и микроокружении опухолей активно стимулируют противоопухолевые ответы, хотя определенные подгруппы настроены на проопухолевые эффекты. Их преобладающая природа обеспечивает ряд преимуществ, делающих В-клетки привлекательными в качестве терапевтической клеточной платформы, таких как антигенспецифическая активация, персистенция *in vivo*, формирование пула памяти и способность секретировать белки в больших количествах. Сообщалось о трансдуцированных CAR лейкозных В-клетках, например, для введения экспрессирующих CAR кассет в В-клетки с успехом применялась направляемая с помощью гомологии репарация, индуцированная кластерами коротких палиндромным повторов с регулярными промежутками (CRISPR) и ассоциированным с CRISPR белком 9 (Cas9). В первичных В-клетках мыши можно сконструировать CAR, снабженные сигнальным доменом CD79 $\beta$ , который является компонентом комплекса В-клеточных рецепторов (BCR) для активации, индуцируя устойчивую экспрессию на поверхности и распознавание антигена независимо от

эндогенных BCR. Таким образом, В-клетки являются возможными носителями для терапии на основе CAR за счет эндогенной передачи сигналов BCR. В-клетки с CAR можно использовать для локальной доставки моноклональных антител в очаг опухоли, нацеливаясь на определенный ТАА. Это открывает возможность применения В-клеток с CAR в качестве безопасных и контролируемых средств для высвобождения эффективных терапевтических антител, обеспечивающих сильную токсичность при системном введении. С другой стороны, В-клетки с CAR могут стать новой платформой для создания вакцин против аутоиммунных заболеваний и профилактических вакцин.

В настоящем изобретении термин “клетки-макрофаги” относится к врожденным миелоидным клеткам – профессиональным фагоцитам, способным регулировать гомеостаз адаптивной иммунной системы. Учитывая их большую распространенность во многих солидных опухолях, связанные с опухолями макрофаги (ТАМ) занимают особую нишу при ТМЕ, и многие медиаторы могут настраивать их фенотип. Иммуносупрессивные ТАМ (M2) могут ослаблять реакцию Т-клеток и способствовать прогрессированию опухолей. Напротив, поляризация в M1 включает провоспалительный фенотип и обладает противоопухолевой активностью, что вызывает большой интерес к разработке макрофагов при раке для содействия иммунному надзору. CAR наделяют макрофаги специфичностью ответа на связанные с опухолями антигены (ТАА) параллельно с усилением эффекторных функций против опухолей. Например, в макрофаги можно встроить CD19-CAR, включающий цитозольные домены Megf10 или FcR $\gamma$ , чтобы имитировать передачу сигналов фагоцитами. Следовательно, при этом запускается антигенспецифичный фагоцитоз и трогоцитоз клеток лимфомы. Макрофаги с CD3 $\zeta$ -CAR также проявляют активный фагоцитоз, эквивалентный FcR $\gamma$ -CAR. При этом перенацеленный антигенспецифичный фагоцитоз обеспечивает пространственный контроль и точность при устранении раковых клеток и в конечном счете способствует терапевтическому эффекту. Кроме того, макрофаги можно трансдуцировать стандартными CAR с помощью аденовирусных векторов, и они будут поляризоваться в сторону провоспалительного фенотипа M1 и стимулировать Т-клеточные реакции, что приведет к заметной регрессии опухолей и длительному выживанию.

В настоящем документе термин “дендритные клетки” (DC) относится к гетерогенному подмножеству профессиональных антигенпрезентирующих клеток, которые иницируют наивные Т-клетки и реактивируют реакции памяти. При раке DC воспринимают сигналы окружающей среды в лимфоидных органах или в микроокружении опухолей, а восприятие сигналов опасности вызывает созревание DC, что приводит либо к иммунной толерантности, либо к специфичному для опухоли ответу.

Важно то, что цитотоксические Т-клетки CD8<sup>+</sup> могут активироваться клетками DC посредством перекрестной презентации ТАА или неоантигенов, способствуя усилению противоопухолевых ответов. Это имеет ключевое значение для иммунотерапии рака, и CAR становится новой стратегией манипулирования DC для эффективного противодействия опухолям.

Термин “лейкаферез” в настоящем изобретении относится к известному в данной области экстракорпоральному процессу, при котором у донора или пациента забирают кровь и пропускают через устройство, которое выделяет выбранный конкретный компонент типа лейкоцитов и возвращает остаток в кровоток донора или пациента, например, путем ретрансфузии.

Термин “эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” означает такое количество композиции, которое должно вызывать биологический или медицинский ответ клеток, ткани, системы или субъекта, к которому стремится исследователь, ветеринар, врач или иной лечащий персонал. Например, композиция содержит эффективное количество клеток с CAR, предпочтительно Т-клеток с CAR против CD-19 и/или мокравимода, которые при введении субъекту либо в виде однократной дозы, либо в составе серии доз эффективно вызывают по меньшей мере один терапевтический эффект, например, достаточный для предотвращения возникновения или ослабления в некоторой степени одного или нескольких признаков или симптомов расстройства или заболевания (например, гематологического рака), подлежащего лечению. Эффективные количества варьируются, как это известно специалистам в данной области, в зависимости, к примеру, от способа введения, использования вспомогательных веществ и совместного применения с другими активными агентами. При лечении определенного заболевания или состояния требуемый терапевтический эффект заключается в подавлении прогрессирования заболевания. Это может включать только временное замедление прогрессирования заболевания, хотя более предпочтительно это означает перманентную остановку прогрессирования заболевания. Это можно отслеживать обычными методами или в соответствии с методами диагностики, приведенными здесь. Требуемой реакцией на лечение заболевания или состояния также может быть замедление возникновения или даже предотвращение возникновения заболевания или состояния. Точное количество композиции, содержащей клетки с CAR для введения, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, весе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния пациента (субъекта). В других воплощениях, когда речь идет о модуляторе рецепторов S1P, эффективное количество модулятора рецепторов S1P (типа мокравимода) может

означать количество, достаточное для активации *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* композиций клеток с CAR, как определено здесь, и/или для получения синергического терапевтического эффекта при введении в комбинации с эффективным количеством композиции клеток с CAR у нуждающегося в этом субъекта.

Термин “примерно” здесь означает то, что следующее значение может варьироваться в пределах  $\pm 20\%$ , предпочтительно  $\pm 10\%$ , более предпочтительно  $\pm 5\%$ , еще более предпочтительно  $\pm 2\%$ , еще более предпочтительно  $\pm 1\%$ .

Термины “пациент”, “субъект”, “индивид” и т.п. применяются здесь взаимозаменяемо и относятся к млекопитающим, предпочтительно человеку. В некоторых воплощениях пациент, субъект или индивид, нуждающийся в лечении, включает тех, кто уже страдает заболеванием, состоянием или расстройством, к примеру, онкогематологическим заболеванием.

В настоящем изобретении термин “в комбинации” или “при комбинированной терапии” означает то, что субъекту вводят два (или несколько) различных препаратов в то время, когда субъект страдает заболеванием, например, два или несколько препаратов вводят после того, как субъекту был поставлен диагноз заболевания и до того, как заболевание было излечено или устранено или лечение было прекращено по другим причинам. В некоторых воплощениях введение одного препарата продолжается, когда начинается введение второго, так что имеется перекрытие в плане введения. Иногда это упоминается здесь как “одновременное” или “параллельное введение”. В других воплощениях введение одного препарата заканчивается до начала введения другого. В некоторых воплощениях в обоих случаях лечение является более эффективным вследствие комбинированного введения. Например, второе лечение будет более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго препарата, или второй препарат уменьшает симптомы в большей степени, чем это было бы при введении второго препарата в отсутствие первого, или аналогичная ситуация наблюдается с первым препаратом. В некоторых воплощениях введение проводится таким образом, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с расстройством, превышает то, что наблюдалось бы при введении одного препарата в отсутствие другого. Эффект от двух препаратов может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Введение может проводиться таким образом, что эффект от введения одного препарата будет все еще ощутимым при введении второго. В одном воплощении клетки с CAR, экспрессирующие молекулы CAR, связывающие антиген, связанный с раком, вводят в дозе и/или в режиме дозирования, описанном здесь, и модулятор рецепторов S1P вводят в дозе и/или в режиме дозирования,

описанном здесь. В некоторых воплощениях “в комбинации с” не следует воспринимать так, что терапия клетками с CAR и введение модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода, KRP203) должны проводиться в одно и то же время и/или в одном составе для введения, хотя эти способы введения входят в рамки настоящего описания. Терапия клетками с CAR может проводиться одновременно с, до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель, 12 недель или 16 недель до), или, предпочтительно, после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель, 12 недель или 16 недель) дозы модулятора рецепторов S1P, например, мокравимода. В некоторых воплощениях каждое средство должно вводиться в дозе и/или по схеме, установленной для этого конкретного средства.

В настоящем изобретении, если не указано иначе, термин “лечение” или “терапия” означает регрессию, ослабление, подавление прогрессирувания или предотвращение того заболевания или состояния, к которому применяется данный термин, или регрессию, ослабление, подавление прогрессирувания или предотвращение одного или нескольких симптомов того заболевания или состояния, к которому применяется данный термин.

В настоящем документе термин “происходит из”, как этот термин применяется в настоящем документе, указывает на взаимосвязь между первой и второй молекулой. Обычно он относится к структурному сходству между первой молекулой и второй молекулой и не подразумевает и не включает в себя ограничение на процесс или источник для первой молекулы, которая происходит из второй молекулы. Например, в случае внутриклеточного сигнального домена, происходящего из молекулы CD3zeta, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет достаточную структуру CD3zeta с тем, чтобы он обладал требуемой функцией, а именно, способностью генерировать сигнал при соответствующих условиях. Это не означает и не включает в себя ограничение на конкретный способ получения внутриклеточного сигнального домена, например, это не означает, что для получения внутриклеточного сигнального домена следует начинать с последовательности CD3zeta и удалять нежелательную последовательность или вводить мутации, чтобы получить внутриклеточный сигнальный домен.

В настоящем изобретении термин “сигнальный домен” относится к функциональной части белка, которая действует путем передачи информации внутри клетки, регулируя клеточную активность посредством определенных сигнальных путей, генерируя вторичные посредники или функционируя в качестве эффекторов, реагируя на

такие посредники.

Термин “генно-инженерный” или “генетически модифицированный” относится к способу модификации генома клетки, включающему, без ограничения, удаление кодирующей или некодирующей области или её части или вставку кодирующей области или её части. В некоторых воплощениях подвергающиеся модификации клетки представляют собой иммунные эффекторные клетки, к примеру, лимфоциты, например, Т-клетки, В-клетки или НК-клетки, которые могут быть получены либо от пациента, либо от донора. Клетки могут подвергаться модификации для экспрессии экзогенной конструкции, такой, например, как химерный антигеновый рецептор (CAR), который встраивается в геном клетки.

В настоящем изобретении термин “CD19” относится к белку кластера дифференцировки 19, который является антигенной детерминантой, экспрессируется во всех линиях В-клеток и обнаруживается на клетках-предшественниках лейкемии. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD19 человека находится в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа P15391, а нуклеотидная последовательность, кодирующая CD19 человека, находится под номером доступа NM\_001178098. В настоящем изобретении “CD19” включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного CD19 дикого типа. CD19 экспрессируется при большинстве видов рака В-линии, включая, например, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и неходжкинскую лимфому. Другие заболевания, связанные с экспрессией CD19, – это, без ограничения, онкогематологические заболевания, например, лейкоз, лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, мантийноклеточная лимфома (MCL), первичная крупноклеточная В-клеточная лимфома средостения (PMBCL) или множественная миелома, предпочтительно ALL, DLBCL, PMBCL и MCL, более предпочтительно это DLBCL. Он также является ранним маркером предшественников В-клеток, например, см. Nicholson et al., Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997). В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка CD19. В одном аспекте белок CD19 экспрессируется в раковых клетках.

В настоящем изобретении термин “CD20” относится к антигенной детерминанте,

которая обнаруживается на В-клетках. CD20 человека также называют белком с 4 пронизывающими мембрану доменами, подсемейство А, представитель 1 (MS4A1). Аминокислотные и нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотные последовательности CD20 человека находятся под номерами доступа NP\_690605.1 и NP\_068769.2, а нуклеотидные последовательности, кодирующие варианты транскриптов 1 и 3 CD20 человека, находятся под номерами доступа NM\_152866.2 и NM\_021950.3, соответственно. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка CD20. В другом аспекте белок CD20 экспрессируется в раковых клетках.

В настоящем изобретении термин “CD22” относится к антигенной детерминанте, которая обнаруживается на клетках-предшественниках лейкемии. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотные последовательности изоформ 1-5 CD22 человека находятся под номерами доступа NP\_001762.2, NP\_001172028.1, NP\_001172029.1, NP\_001172030.1 и NP\_001265346.1, соответственно, а нуклеотидные последовательности, кодирующие варианты 1-5 CD20 человека, находятся под номерами доступа NM\_001771.3, NM\_001185099.1, NM\_001185100.1, NM\_001185101.1 и NM\_001278417.1, соответственно. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка CD22. В другом аспекте белок CD22 экспрессируется в раковых клетках.

В настоящем изобретении термины “альфа-субъединица рецептора IL-3”, “IL3Ra”, “CD123”, “цепь IL3Ra” и “субъединица IL3Ra” взаимозаменяемо относятся к антигенной детерминанте, которая обнаруживается на клетках-предшественниках лейкемии. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность IL3Ra человека находится под номером доступа NP\_002174, а нуклеотидная последовательность, кодирующая IL3Ra человека, находится под номером доступа NM\_005191. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка CD123. В другом аспекте белок CD123 экспрессируется в раковых клетках. В настоящем изобретении “CD123” включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного CD123 дикого типа.

В настоящем изобретении термин “ROR1” относится к антигенной детерминанте, которая обнаруживается на клетках-предшественниках лейкемии. Аминокислотные и



нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотные последовательности изоформ 1 и 2 предшественников ROR1 человека находятся под номерами доступа NP\_005003.2 и NP\_001077061.1, соответственно, а кодирующие их последовательности мРНК находятся под номерами доступа NM\_005012.3 и NM\_001083592.1, соответственно. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает антиген во внеклеточном домене белка ROR1. В другом аспекте белок ROR1 экспрессируется в раковых клетках.

В настоящем изобретении термин “CD33” относится к белку кластера дифференцировки 33, который является антигенной детерминантой и обнаруживается на клетках лейкемии, а также на нормальных клетках-предшественниках миелоидной линии. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD33 человека находится в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа P20138, а нуклеотидная последовательность, кодирующая CD33 человека, находится под номером доступа NM\_001772.3. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает эпитоп во внеклеточном домене белка CD33 или его фрагментов. В другом аспекте белок CD33 экспрессируется в раковых клетках. В настоящем изобретении “CD33” включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного CD33 дикого типа.

В настоящем изобретении термин “CD38” относится к белку кластера дифференцировки 38, который является антигенной детерминантой и обнаруживается на клетках лейкемии, а также на нормальных клетках-предшественниках миелоидной линии. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности человека и мыши можно найти в общедоступных базах данных, таких как GenBank, UniProt и Swiss-Prot. Например, аминокислотная последовательность CD38 человека находится в UniProt/Swiss-Prot под номером доступа P28907, а нуклеотидная последовательность, кодирующая CD38 человека, находится под номером доступа NM\_001775. В одном аспекте антигенсвязывающая часть CAR распознает и связывает эпитоп во внеклеточном домене белка CD38 или его фрагментов. В другом аспекте белок CD38 экспрессируется в раковых клетках. В настоящем изобретении “CD38” включает белки, содержащие мутации, например, точечные мутации, фрагменты, вставки, делеции и сплайс-варианты полноразмерного CD38 дикого типа.

В настоящем изобретении термин “CLL-1” относится к подобной лектину С-типа

молекуле-1 человека (CLL-1), которая представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа, а его экспрессия ограничена миелоидными клетками и большинством бластов AML. Более того, CLL-1 экспрессируется в лейкозных стволовых клетках (LSC), но отсутствует в гемопоэтических стволовых клетках (HSC), что может представлять потенциальную терапевтическую мишень для лечения AML (Wang J., Chen S., Xiao W. et al. CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 11, 7 (2018)).

В настоящем изобретении термин “BCMA” относится к антигену созревания В-клеток. BCMA (также известный как TNFRSF17, BSM или CD269) является представителем семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) и преимущественно экспрессируется в терминально дифференцированных В-клетках, например, В-клетках памяти и плазматических клетках. Его лиганд называется активатором В-клеток семейства TNF (BAFF) и является лигандом, индуцирующим пролиферацию (APRIL). BCMA участвует в обеспечении выживания плазматических клеток для поддержания долгосрочного гуморального иммунитета. Ген BCMA кодируется на хромосоме 16 и вырабатывает первичный транскрипт мРНК длиной в 994 нуклеотида (номер доступа NM\_001192.2 в NCBI), который кодирует белок из 184 аминокислот (NP\_001183.2). Описан второй бессмысловый транскрипт, полученный из локуса BCMA, который может играть роль в регуляции экспрессии BCMA (Laabi Y. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22: 1147-1154).

Термин “GD2” относится к дисиаialogанглиозиду – TAA, обнаруженному в NBLs, меланомах и саркомах.

Термин “MCSP” относится к связанному с меланомой протеогликану хондроитинсульфату, еще одному TAA, обнаруженному в меланомах.

Термин “CD5” относится к рецептору CD5, который экспрессируется на поверхности Т-клеток и в подмножестве мышинных В-клеток, известном как В-1а. CD5 служит для ослабления активирующих сигналов от BCR с тем, чтобы клетки В-1 могли активироваться только очень сильными раздражителями (типа бактериальных белков), а не нормальными тканевыми белками.

Термин “NKG2D” относится к рецептору группы 2D естественных киллеров (NKG 2D), который играет важную роль в защите организма от инфекций и рака. Распознавая лиганды, индуцируемые инфицированными или опухолевыми клетками, NKG2D модулирует активацию лимфоцитов и усиливает иммунитет для устранения экспрессирующих лиганды клеток.

Термин “scFv” относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один

фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, причем переменные области легкой и тяжелой цепи соединяются непосредственно при помощи короткого гибкого полипептидного линкера и способны экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он происходит. Если не указано иначе, в настоящем изобретении scFv может содержать переменные области  $V_L$  и  $V_H$  в любом порядке, например, в отношении N-концевого и C-концевого участков полипептида scFv может содержать  $V_L$ -линкер- $V_H$  или  $V_H$ -линкер- $V_L$ .

В настоящем изобретении термин “рецидив” или “рецидивировавший” имеет свое обычное значение в данной области и означает возвращение онкогематологического заболевания или признаков и симптомов онкогематологического заболевания после периода полной ремиссии (например, первоначальной полной ремиссии) вследствие лечения.

В настоящем изобретении термин “ремиссия” имеет свое обычное значение в данной области и означает ослабление или исчезновение признаков и симптомов рака. При частичной ремиссии исчезают некоторые, но не все признаки и симптомы рака. При полной ремиссии (CR) исчезают все признаки и симптомы рака, хотя рак все еще может быть в организме.

В настоящем изобретении термин “кондиционирование” означает приведение пациента, нуждающегося в терапии иммунными эффекторными клетками, в подходящее состояние. Кондиционирование в настоящем изобретении включает, без ограничения, снижение количества эндогенных лимфоцитов, удаление поглотителя цитокинов, повышение уровня одного или нескольких гомеостатических цитокинов или провоспалительных факторов в сыворотке, усиление эффекторной функции Т-клеток, вводимых после кондиционирования, усиление активации и/или доступности антигенпрезентирующих клеток или любые их комбинации перед терапией иммунными эффекторными клетками. В одном воплощении “кондиционирование” включает лимфоистощение пациента.

Термин “аутологичный” означает такой материал, полученный от одного и того же индивида, которому он впоследствии будет повторно введен. Например, метод клеточной терапии, описанный здесь, включает получение лимфоцитов от пациента, которые затем подвергаются инженерии для экспрессии, например, конструкции с CAR, а затем вводят обратно тому же пациенту.

Термин “сингенный” означает такой материал, полученный от индивида, который

генетически идентичен, например, от одного и того же индивида либо от монозиготных близнецов, которым он впоследствии должен повторно вводиться в организм.

Термин “аллогенный” означает любой материал, полученный от другого животного того же вида (например, человека), что и особь, которой вводят этот материал. Две или несколько особей считаются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или нескольких локусах не идентичны. В некоторых аспектах аллогенный материал от особей одного и того же вида может быть достаточно непохожим генетически, чтобы взаимодействовать антигенно.

### **Клетки с химерными антигеновыми рецепторами (CAR)**

В настоящем изобретении композиции клеток с CAR – это композиции, содержащие клетки или популяцию клеток, которые были генетически модифицированы для экспрессии молекул одного или нескольких химерных антигеновых рецепторов.

В определенных воплощениях клетки с CAR представляют собой иммунные эффекторные клетки человека или популяцию клеток (например, Т-клетки человека типа обычных Т-клеток или регуляторных Т-клеток, либо НК-клетки человека, например, Т-клетки человека, описанные здесь, или НК-клетки человека, описанные здесь). В одном воплощении Т-клетки человека являются Т-клетками CD8<sup>+</sup>. В одном воплощении клетки являются аутологичными или сингенными Т-клетками. В одном воплощении клетки являются аллогенными Т-клетками. Следует понимать, что композиции и способы, описанные здесь с помощью термина “клетки”, охватывают композиции и способы, содержащие одну или несколько разновидностей клеток, например, популяцию клеток.

Методы получения Т-клеток с CAR описаны, к примеру, в Feins et al., *Am J Hematol.* 2019, 94:S3-S9. Методы получения НК-клеток с CAR описаны, к примеру, в Xie et al., *EBiomedicine* 59 (2020) 102975. Методы получения клеток T<sub>reg</sub> с CAR описаны, к примеру, в Enrico Fritsche et al., *Therapeutic Biomanufacturing*, volume 38, issue 10, P1099-1112, October 2020.

Иммунные клетки для получения клеток с CAR для применения по настоящему изобретению могут дополнительно содержать и другие генетические модификации (наряду с той, которая требуется для экспрессии молекул CAR), в частности, для аллогенного применения, т.е. клетки с CAR получают из иммунных клеток субъекта-донора, который отличается от субъекта-реципиента.

В определенных воплощениях конструкции для CAR включают трансмембранный домен, выбранный из группы, состоящей из CD28, CD3, CD4, CD8a и CD16.

В определенных воплощениях конструкции для CAR содержат цитоплазматический сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из CD28, 4-

1BВ, ICOS и CD27.

В настоящем изобретении термин CAR также охватывает молекулы химерных антигеновых рецепторов или комбинации молекул химерных антигеновых рецепторов, которые распознают несколько антигенов, связанных с раком, обычно два различных антигена, связанных с раком (например, CD20/CD22), в частности, чтобы избежать спасения опухолей и/или уменьшить токсичность. Такие CAR, распознающие более одного антигена, связанного с раком, включают, без ограничения, двойные CAR, тандемные CAR, петлеобразные тандемные CAR, комбинаторные CAR, которые описаны, к примеру, в Guedan et al., 2019, *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* Vol. 12, pp. 145-156.

CARs были классифицированы в соответствии с модулями, которые соответствуют цитоплазматическому сигнальному домену. CARs первого поколения содержат цитоплазматический сигнальный домен с одним сигнальным модулем, происходящим из  $\zeta$ -цепи комплекса TCR/CD3. Второе и третье поколение разрабатывали так, чтобы они включали в себя одну или несколько костимулирующих областей, сопровождающих цепь CD3 $\zeta$ , соответственно. Хотя в доклинических исследованиях оценивались различные костимулирующие молекулы, включая OX40, CD27 и ICOS, чаще всего в клинических испытаниях используют CD28 и 4-1BВ.

Т-клетки с CAR первого поколения проявляли цитотоксическую активность *in vitro*, но они проявляли и субоптимальную стойкость *in vivo*, что ограничивало их терапевтический потенциал. Действительно, CARs второго поколения проявляли лучшую персистенцию Т-клеток после инфузии по сравнению с CARs первого поколения. Однако сообщалось, что CARs, содержащие 4-1BВ, проявляют большую персистенцию *in vivo*, как на моделях ксенотрансплантатов, так и у пациентов, по сравнению с таковыми, несущими домены CD28. Сообщалось, что Т-клетки с CAR на основе CD28 проявляют конститутивную пролиферацию, дифференцировку эффекторной памяти и склонность к истощению, тогда как Т-клетки с CAR на основе 4-1BВ проявляют признаки центральной памяти с повышенной выживаемостью и подавлением истощения. Поскольку костимулирующие домены улучшали функцию, выживаемость и персистенцию Т-клеток с CAR, было создано третье поколение CARs, сочетающее в себе два костимулирующих домена. Соединяя специфичность моноклонального антитела к эпитопам со способностью определенных Т-клеток к уничтожению, CARs обходят требование о презентации антигена молекулами МНС. Более того, Т-клетки с CAR также могут распознавать неклассические мишени TCR, такие как липиды и углеводы, что наделяет Т-клетки с CAR способностью распознавать более широкий спектр антигенов-мишеней. В отличие от

трансгенных по TCR Т-клеток, Т-клеткам с CAR не требуется процессинг антигена и они не подвергаются рестрикции по HLA, что позволяет проводить эту терапию большему числу пациентов. Кроме того, препараты для инфузии Т-клеток с CAR получают из периферической крови, поэтому CAR-терапия может быть полезна пациентам без резектабельных опухолей или с низкой инфильтрацией Т-клеток в опухоль (которые не подходят для терапии TIL).

Итак, в одном предпочтительном воплощении клетки с CAR по настоящему изобретению представляют собой Т-клетки, экспрессирующие CAR (т.е. Т-клетки с CAR), причем данный CAR содержит по меньшей мере:

(i) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, обычно одноцепочечный переменный фрагмент, обладающий специфичностью связывания с антигеном, связанным с раком (например, CD19),

(ii) трансмембранный домен и

(iii) цитоплазматический сигнальный домен, предпочтительно содержащий один сигнальный модуль, происходящий из  $\zeta$ -цепи комплекса TCR/CD3, и необязательно один или несколько костимулирующих доменов, обычно костимулирующих доменов CD28 или 4-1BB.

Адоптивный перенос Т-клеток с CAR показал впечатляющие результаты при лечении В-клеточных раковых заболеваний. В результате Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) в 2017 г. одобрило первые две генные терапии на основе Т-клеток с CAR для лечения В-клеточных раковых заболеваний. Kymriah (тисагенлеклейцель) – это CAR второго поколения, нацеленный на CD19, содержащий костимулирующий домен, происходящий из 4-1BB, одобренный для лечения острого В-клеточного лимфобластного лейкоза у детей. Yescarta (аксикабтаген цилолейцель), также нацеленный на антиген CD19, показан пациентам с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой. В отличие от Kymriah, Yescarta содержит костимулирующий модуль, происходящий из CD28. В июле 2020 г. FDA одобрило Tecartus (брексукабтаген аутолейцель), который также нацелен на антиген CD19, для пациентов с мантийноклеточной лимфомой, которая не поддается другим методам лечения или рецидивирует. В феврале 2021 г. FDA одобрило Breynzi (лизокабтаген маралейцель), который нацелен на антиген CD19, для пациентов с рецидивирующей или рефрактерной крупноклеточной В-клеточной лимфомой. В марте 2021 г. FDA одобрило Abesma (идекабтаген виклейцель) в качестве первых Т-клеток с CAR, нацеленным на BCMA, для лечения взрослых пациентов с множественной миеломой.

Клетки с CAR, которые применяются в настоящем изобретении, содержат

нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, содержащий внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с антигеном, связанным с раком.

В определенных воплощениях такой связанный с раком антиген выбирают из группы, состоящей из маркеров клеточной поверхности гемопоэтических клеток, предпочтительно иммунных клеток типа В- или Т-клеток.

В одном конкретном воплощении клетки с CAR для применения в настоящем изобретении содержат CAR с внеклеточным доменом, содержащим антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с антигеном, связанным с раком, выбранным из группы, состоящей из CD4, CD5, CD7, CD19, CD19/CD20, CD19/CD22, CD20, CD22, CD20/CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD39, CD70; CD123, CD44v6 (вариант изоформы 6), CD123/CLL1, BCMA, CD38/BCMA, CD19/BCMA, CD56, CD138, LeY, ROR1, SLAMF7, nFLT3, LMP1, BCMA/TACI, CS1, GPRC5D, CS1/BCMA, NKG2D, лигандов CLL-1. Более предпочтительно такие связанные с раком антигены или комбинации связанных с раком антигенов выбирают из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, GD2, MCSP, CD5, NKG2D, МНС-пептидных антигенов, BCMA и их комбинаций, предпочтительно это CD19. В других конкретных воплощениях такой связанный с раком антиген выбирают из связанных с раком антигенов, типичных для онкогематологических заболеваний, или связанных с раком антигенов метастазов в лимфоидные органы, предпочтительно метастазов в лимфатические узлы, которые могут исходить из солидных раковых опухолей, в частности, рака молочной железы, обычно HER2 или HER3. Такие связанные с раком антигены включает антигены, которые экспрессируются на поверхности метастатического рака или экспрессируются на поверхности метастатического рака в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости.

В предпочтительных воплощениях такие предпочтительные антигены, связанные с раком, выбирают из группы, состоящей из CD19, CD30, CD33, CD123, CD20, CD22, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, GD2, MCSP, CD5, NKG2D, МНС-пептидных антигенов, BCMA, предпочтительно это CD19.

В определенных воплощениях такие клетки с CAR для применения по настоящему изобретению экспрессируют CAR, который содержит, в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с маркером клеточной поверхности, выбранным из группы, состоящей из CD4, CD5, CD7, CD19, CD19/CD20, CD19/CD22, CD20, CD22, CD20/CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD39, CD70, CD123, CD44v6 (вариант изоформы 6),

CD123/CLL1, BCMA, CD38/BCMA, CD19/BCMA, CD56, CD138, LeY, ROR1, SLAMF7, nFLT3, LMP1, BCMA/TACI, CS1, GPRC5D, CS1/BCMA, лигандов NKG2D, более предпочтительно выбранным из группы, состоящей из CD19, CD30, CD33, CD123, CD20, CD22, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, GD2, MCSP, CD5, NKG2D, МНС-пептидных антигенов, BCMA, предпочтительно это CD19.

Примеры конструкций CAR, связывающих антигены, связанные с раком, как описано здесь, описаны в WO 2019227003 (включен сюда путем ссылки во всей полноте).

Другие примеры конструкций CAR – те, которые применяются в следующих коммерческих продуктах или разработках Т-клеток с CAR: Kymriah (тисагенлеклейцель), Yescarta (аксикабтаген цилолейцель), Tecartus (брексукабтаген аутолейцель), Breyanzi (лизокабтаген маралейцель), Abesma (идекабтаген виклейцель).

Композиции, содержащие клетки с CAR, как описано здесь, применяются в комбинации с модулятором рецепторов S1P.

### **Модуляторы рецепторов S1P**

Рецепторы S1P делятся на пять родственных подтипов G-сопряженных белковых рецепторов (т.е. S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> и S1P<sub>5</sub>), которые экспрессируются в самых разных тканях и проявляют различную клеточную специфичность.

В определенных воплощениях модулятор рецепторов S1P для применения в соответствии со способами настоящего изобретения представляет собой соединение, которое модулирует один или несколько из пяти типов рецепторов S1P с 1 по 5 (S1PR<sub>1-5</sub>) путем активации, интернализации или ингибирования рецептора для передачи сигналов. Такие соединения также именуется здесь как “агонисты S1P” и “ингибиторы S1P”, соответственно.

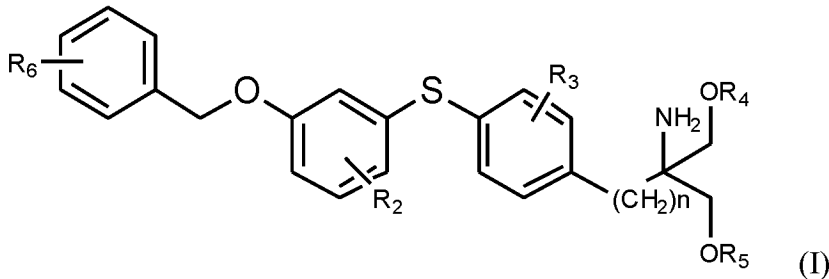
В определенных воплощениях такой модулятор рецепторов S1P для применения в способах лечения по настоящему изобретению выбирают из числа KRP203 (мокравимода), FTY720 (финголимода, Gilenya™), BAF312 (сипонимода, Mayzent®), озанимода (Zeposia®), понезимода, этразимода, АКР-11, ценеримода, амиселимода, СВР-307, OPL-307, OPL-002, BMS-986166, SCD-044, BOS-173717, CP-1050. Предпочтительно такой модулятор рецепторов S1P для применения в способах лечения по настоящему изобретению выбирают из числа KRP203 (мокравимода), FTY720 (финголимода) и Mayzent® (сипонимода), наиболее предпочтительно это мокравимод.

В одном воплощении такой модулятор рецепторов S1P для применения в способах лечения по настоящему изобретению является агонистом S1P. Примерами таких агонистов S1P являются KRP203 (мокравимод), селективный агонист S1PR<sub>1</sub>, или FTY720 (финголиמוד), мультиагонист S1PR<sub>1,3-5</sub>, или сипонимод, агонист S1PR<sub>3</sub>, или любые их



фармацевтически приемлемые соли либо фосфатные производные. Предпочтительно, в определенных воплощениях, такой агонист S1P выбирают из числа тех агонистов S1P, которые избирательно активируют S1PR<sub>1</sub>.

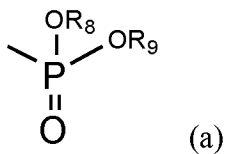
В предпочтительном воплощении модулятором рецепторов S1P для применения по настоящему изобретению является соединение по формуле (I):



где: R<sub>2</sub> означает H, галоген, тригалометил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, C<sub>1-7</sub>-алкил, фенэтил или бензилокси;

R<sub>3</sub> означает H, галоген, CF<sub>3</sub>, OH, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, бензилокси, фенил или C<sub>1-4</sub>-алкоксиметил;

каждый из R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> независимо означает H или остаток по формуле (a):



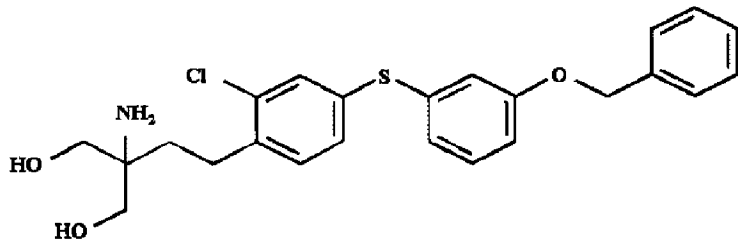
где каждый из R<sub>8</sub> и R<sub>9</sub> независимо означает H или C<sub>1-4</sub>-алкил, необязательно замещенный галогеном;

и n – целое число от 1 до 4; и

R<sub>6</sub> означает водород, галоген, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси или трифторметил.

В определенных воплощениях такие соединения по формуле (I) являются агонистами S1P, предпочтительно избирательными агонистами S1P<sub>1</sub>. Как правило, в предпочтительных воплощениях R<sub>3</sub> означает хлор. Более предпочтительно R<sub>2</sub> означает H, R<sub>3</sub> – хлор и R<sub>6</sub> – водород. Например, R<sub>2</sub> – это H, R<sub>3</sub> – хлор, R<sub>6</sub> – водород, а каждый из R<sub>3</sub> и R<sub>5</sub> независимо означает H.

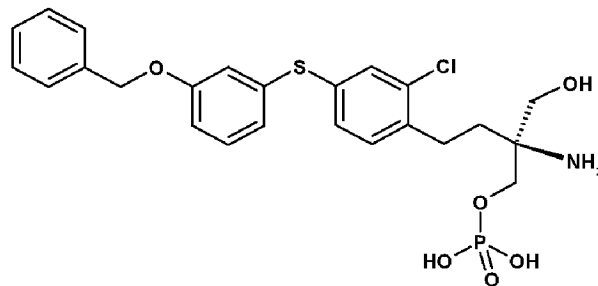
В более предпочтительном воплощении модулятором рецепторов S1P для применения по настоящему изобретению, предпочтительно агонистом S1P, предпочтительно избирательным агонистом S1PR<sub>1</sub>, является 2-амино-2-[4-(3-бензилоксифенилтио)-2-хлорфенил]этилпропан-1,3-диол по формуле (II) (также известный как мокравимод или KRP 203):



(II)

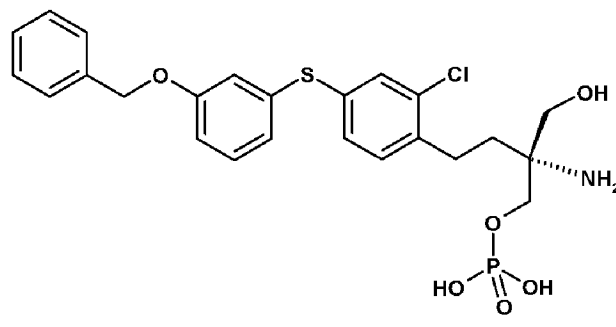
или его фармацевтически приемлемая соль.

Другие модуляторы рецепторов S1P для применения по настоящему изобретению, предпочтительно избирательные агонисты S1P<sub>1</sub>, включают фосфатные производные по следующим формулам:



(IIa)

or



(IIb)

Такие соединения и методы их синтеза также описаны в WO 03/029205, WO 2004/074297, WO 2006/009092, WO 2006/041019 и WO 2014128611A1 (которые включены сюда путем ссылки).

Мокравимод или его фармацевтически приемлемые соли или его фосфатные производные особенно предпочтительны. Так, сравнение фармакодинамических эффектов различных модуляторов S1P, таких как мокравимод, FTY720 и BAF312, установленных на здоровых добровольцах, выявляет различия в эффективности секвестрации лимфоцитов. Измеримым параметром, определяющим поддержание способа действия, то есть секвестрации лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах и костном мозге, является снижение числа периферических лимфоцитов. Восстановление абсолютного числа лимфоцитов до 80% от нормы после однократной дозы FTY720 в 1 мг, многократного применения BAF312 в течение 28 дней или однократной дозы KRP203 в 3 мг достигалось

через 8, 7 и более 10 дней, соответственно. Таким образом, время восстановления лимфоцитов значительно больше для KRP203, чем для VAF312 и FTU720.

#### Размер частиц модулятора рецепторов S1P

В фармацевтической промышленности определение характеристик частиц порошкообразных материалов стало одним из важнейших аспектов при разработке лекарственных средств и контроле качества твердых пероральных дозовых форм. Распределение частиц лекарственного вещества по размерам может оказывать существенное влияние на характеристики конечного лекарственного средства (например, на растворение, биодоступность, однородность содержимого, стабильность и т.д.). Кроме того, распределение частиц лекарственного вещества по размерам может влиять на технологичность изготовления лекарственного средства, как-то на сыпучесть, однородность смеси, способность к прессованию, и оказывать существенное влияние почти на каждую стадию процесса производства твердых пероральных дозовых форм, включая предварительное смешивание/смешивание, гранулирование, сушку, измельчение, перемешивание, нанесение покрытия, инкапсуляцию и прессование. Таким образом, размер частиц лекарственного вещества может в конечном счете влиять на безопасность, эффективность и качество лекарственного препарата.

В одном воплощении модулятор рецепторов S1P по настоящему изобретению имеет средний размер частиц ( $D_{50}$ ), меньший или равный 8 мкм, предпочтительно 6 мкм, более предпочтительно 5 мкм. В другом воплощении модулятор рецепторов S1P по настоящему изобретению имеет значение  $D_{90}$ , меньшее или равное 25 мкм, предпочтительно 22 мкм, более предпочтительно 19 мкм. Действительно, авторами изобретения было обнаружено, что средний размер частиц ( $D_{50}$ ) более 8 мкм, предпочтительно более 6 мкм, более предпочтительно более 5 мкм и/или  $D_{90}$  более 25 мкм, предпочтительно более 22 мкм, более предпочтительно более 19 мкм ухудшает растворение лекарственного средства за счет уменьшения контакта поверхности с растворителем, что приводит к снижению биодоступности и эффективности *in vivo*.

#### Фармацевтические композиции, содержащие модуляторы рецепторов S1P

Настоящим изобретением также предусмотрены фармацевтические композиции таких модуляторов рецепторов S1P, предпочтительно мокравимода или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного, как описано выше, в частности, для их применения в описанных способах лечения.

В одном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат модулятор рецепторов S1P, предпочтительно мокравимод или его фармацевтически приемлемую соль или его фосфатное производное, а также одно или

несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

В описанных здесь композициях можно использовать любые подходящие вспомогательные вещества, известные рядовым специалистам в данной области для применения в фармацевтических композициях.

Фармацевтические композиции можно вводить любым способом, соответствующим заболеванию или расстройству, подлежащему лечению, как это определяют рядовые специалисты в области медицины. Надлежащие дозы и подходящая продолжительность и частота введения должны определяться такими факторами, которые изложены здесь, включая состояние пациента, тип и тяжесть заболевания пациента, конкретную форму активного ингредиента и способ введения. В общем, надлежащая доза (или эффективная доза) и схема лечения обеспечивают количество фармацевтической композиции, достаточное для получения терапевтического эффекта, к примеру, улучшения клинического результата типа более частой полной или частичной ремиссии или более продолжительной безрецидивной и/или общей выживаемости или уменьшения тяжести симптомов или других преимуществ, подробно описанных здесь.

Фармацевтические композиции, описанные здесь, можно вводить нуждающимся в них субъектам любым из нескольких способов, которые могут эффективно доставлять эффективное количество соединения. Фармацевтические композиции можно вводить перорально, ректально, парентерально, интрацистернально, интравагинально, внутривентрикулярно, местно, буккально или в виде перорального или назального спрея. В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции подходят для перорального введения.

В другом воплощении фармацевтические композиции могут представлять собой твердые дозовые формы, пригодные для перорального введения. Твердые дозовые формы для перорального введения включают капсулы, пилюли, драже, порошки и гранулы. В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции представляют собой капсулы или таблетки. Капсулы могут быть мягкими или твердыми желатиновыми капсулами, предпочтительно твердыми желатиновыми капсулами. Например, капсулы представляют собой измельченные капсулы HGS или HPMС.

В одном воплощении высвобождение содержимого капсул или таблеток может быть немедленным или модифицированным типа замедленного, прицельного или пролонгированного. В предпочтительном воплощении твердая дозовая форма представляет собой дозовую форму с немедленным высвобождением.

В одном воплощении фармацевтические композиции содержат модулятор рецепторов S1P, предпочтительно мокравимод, и одно или несколько фармацевтически

приемлемых вспомогательных веществ, в частности, по меньшей мере один наполнитель и их смеси, разрыхлитель, смазывающее и скользящее вещество.

#### *Наполнители*

Наполнители (также именуемые разбавителями или разжижителями) – это вещества, которые добавляются к лекарственной субстанции для того, чтобы сделать её пригодной для перорального введения (например, капсулы, таблетки). Сами наполнители не должны оказывать никакого фармакологического воздействия на человека. Примеры наполнителей включают маннит, микрокристаллическую целлюлозу, моногидрат лактозы, безводную лактозу, кукурузный крахмал, ксилит, сорбит, сахарозу, дикальцийфосфат, мальтодекстрин и желатин. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один наполнитель, выбранный из маннита, микрокристаллической целлюлозы и их смесей. В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат смесь маннита и микрокристаллической целлюлозы.

#### *Разрыхлители*

Разрыхлители добавляют в пероральные твердые дозовые формы, способствуя их дезагрегации. Разрыхлители включают в состав, чтобы они вызывали быстрое распадение твердых дозовых форм при контакте с влагой. Разрыхление обычно рассматривается как первая стадия процесса растворения. Примеры разрыхлителей включают модифицированный крахмал типа натриевого гликолята крахмала, натриевого карбоксиметилкрахмала и прежелатинизированного крахмала, сшитые полимеры типа сшитого поливинилпирролидона (кросповидона) или сшитой натриевой карбоксиметилцеллюлозы (натриевой кроскармеллозы), и силикат кальция. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению в качестве разрыхлителя содержат натриевый гликолят крахмала.

#### *Смазывающие вещества*

Смазывающие вещества – это вещества, которые применяются в рецептурах таблеток и капсул для уменьшения трения. Смазывающие вещества облегчают выдавливание таблеток из матрицы, тем самым предотвращая образование царапин на их поверхности. По своей природе смазывающие вещества можно разделить на две группы: а) жиры и жироподобные вещества; б) порошкообразные вещества. Порошкообразные вещества более применимы, чем жироподобные, так как последние влияют на растворимость и химическую стабильность таблеток. Порошкообразные смазывающие вещества вводят путем измельчения гранулята в порошок. Они обеспечивают постоянную скорость перетекания массы для таблетирования из бункера в матрицу, что

гарантирует точность и постоянство дозировки лекарственного вещества.

Примеры смазывающих веществ включают стеарат магния, гидрогенизированное касторовое масло, глицерилбегенат, стеарат кальция, стеарат цинка, минеральное масло, силиконовую жидкость, лаурилсульфат натрия, L-лейцин и стеарилфумарат натрия. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению в качестве смазывающего вещества содержат стеарат магния.

#### *Скользящие вещества*

Скользящие вещества вносят в рецептуру для улучшения текучести материала, содержащегося в ядре таблеток. На ранней стадии прессования скользящие вещества смешивают с частицами порошковой смеси для улучшения сыпучести и однородности в полости матрицы таблеточных прессов. Скользящие вещества улучшают процесс гранулирования таблеток, уменьшая трение между частицами. Влияние скользящих веществ на процесс гранулирования зависит от размера и формы частиц гранул и скользящих добавок. При превышении определенной концентрации скользящее вещество будет даже снижать текучесть. Примеры скользящих веществ включают коллоидный диоксид кремния, крахмал, стеарат магния и тальк. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению в качестве скользящего вещества содержат коллоидный диоксид кремния.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат модулятор рецепторов S1P и по меньшей мере один наполнитель, выбранный из маннита, микрокристаллической целлюлозы и их смесей, натриевый гликолят крахмала в качестве разрыхлителя, стеарат магния в качестве смазывающего вещества и коллоидный диоксид кремния в качестве скользящего вещества.

В описанных здесь композициях также можно использовать любые подходящие вспомогательные вещества, известные рядовым специалистам в области фармацевтических композиций.

В одном воплощении дозировка модулятора рецепторов S1P, предпочтительно гидрохлоридной соли по формуле (I) или фосфатных производных по формуле IIa или IIb, в твердой дозовой форме составляет от 0,05 мг до 15 мг/ед., предпочтительно от 0,1 мг до 10 мг/ед., например, 0,1 мг/ед. или 0,4 мг/ед. или 1 мг/ед. или 10 мг/ед., более предпочтительно около 1 мг/ед.

В частности, фармацевтические композиции по настоящему изобретению, особенно содержащие мокравимод или его фармацевтически приемлемую соль либо его фосфатное производное по 1 мг/ед. дополнительно содержат следующие ингредиенты:

- маннит, предпочтительно в количестве от 48 до 88 мг/ед., более

предпочтительно от 58 до 78 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 68 мг/ед.;

- микрокристаллическую целлюлозу, предпочтительно в количестве от 5 до 45 мг/ед., более предпочтительно от 15 до 35 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 25 мг/ед.;

- натриевый гликолят крахмала, предпочтительно в количестве от 1 до 8 мг/ед., более предпочтительно от 2 до 6 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 4 мг/ед.;

- стеарат магния, предпочтительно в количестве от 0,025 до 4 мг/ед., более предпочтительно от 0,5 до 2 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 1 мг/ед.; и

- коллоидный диоксид кремния, предпочтительно в количестве от 0,125 до 2 мг/ед., более предпочтительно от 0,25 до 1 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 0,5 мг/ед.

В другом воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат следующие ингредиенты:

- модулятор рецепторов S1P, предпочтительно мокравимод или его фармацевтически приемлемую соль или его фосфатное производное, предпочтительно в количестве от 0,05% до 15%, более предпочтительно от 0,1% до 10% мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 0,1% или 0,4% или 1% или 10%;

- маннит, предпочтительно в количестве от 48% до 88%, более предпочтительно от 58% до 78%, еще более предпочтительно в количестве около 68%;

- микрокристаллическую целлюлозу, предпочтительно в количестве от 5% до 45%, более предпочтительно от 15% до 35%, еще более предпочтительно в количестве около 25%;

- натриевый гликолят крахмала, предпочтительно в количестве от 1% до 8%, более предпочтительно от 2% до 6%, еще более предпочтительно в количестве около 4%;

- стеарат магния, предпочтительно в количестве от 0,025% до 4%, более предпочтительно от 0,5% до 2%, еще более предпочтительно в количестве около 1%;

- коллоидный диоксид кремния, предпочтительно в количестве от 0,125 до 2 мг/ед., более предпочтительно от 0,25 до 1 мг/ед., еще более предпочтительно в количестве около 0,5 мг/ед.;

причем содержание выражено в мг/мг сухого веса общей массы композиции.

В одном воплощении фармацевтические композиции по изобретению стабильны по меньшей мере 1 месяц при температуре 50°C, предпочтительно 2 месяца при 50°C.

В другом воплощении фармацевтические композиции по изобретению стабильны по меньшей мере 24 месяца при 5°C.

В другом воплощении фармацевтические композиции по изобретению стабильны по меньшей мере 24 месяца при 25°C/относительной влажности 60%.

В настоящем изобретении стабильность композиций измеряют следующим методом: жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC), который широко известен в данной области. Композиция считается стабильной, если сумма примесей меньше или равна 0,7% с доверительным интервалом [98-102]%

#### Способ получения фармацевтических композиций

Другой аспект настоящего изобретения касается способа получения вышеприведенных фармацевтических композиций, который включает стадии:

a. перемешивание модулятора рецепторов S1P или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного с микрокристаллической целлюлозой и коллоидным диоксидом кремния, предпочтительно при 22 об/мин в течение 18 мин,

b. добавление маннита и перемешивание полученной смеси, предпочтительно при 22 об/мин в течение 9 мин,

c. добавление натриевого гликолята крахмала и перемешивание полученной смеси, предпочтительно при 22 об/мин в течение 5 мин,

d. добавление стеарата магния и перемешивание полученной фармацевтической композиции, предпочтительно при 22 об/мин в течение 5 мин,

e. извлечение фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В предпочтительном воплощении способ дополнительно включает стадии:

f. заполнение полученной фармацевтической композиции в капсулы,

g. извлечение полученных капсул, заполненных фармацевтической композицией.

#### **Популяция пациентов, на которую предпочтительно нацелена комбинированная терапия**

Способы лечения, изложенные здесь, подходят для пациентов с онкогематологическими заболеваниями или метастазами в лимфоидные органы, предпочтительно метастазами в лимфатические узлы. Онкогематологические заболевания – это такие виды рака, как лейкоз, лимфома и злокачественные лимфопролиферативные заболевания, которые поражают кровь, костный мозг и лимфатическую систему. Метастазы в лимфоидные органы, предпочтительно в лимфатические узлы, могут исходить из солидных раковых опухолей, в частности, рака молочной железы.

В одном воплощении онкогематологическим заболеванием является лейкоз. Лейкоз можно классифицировать как острый лейкоз и хронический лейкоз. Острый лейкоз можно



далее классифицировать как острый миелоидный лейкоз (AML) и острый лимфоцитарный лейкоз (ALL). Хронический лейкоз включает хронический миелоидный лейкоз (CML) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). Другие родственные заболевания включают миелодиспластические синдромы (MDS, ранее известные как “предлейкемия”), которые представляют собой разнородную совокупность гематологических заболеваний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и риском трансформации в AML.

В другом воплощении онкогематологическим заболеванием является лимфома. Лимфома представляет собой группу опухолей клеток крови, которые возникают из лимфоцитов. Примеры лимфомы включают неходжкинскую лимфому и лимфому Ходжкина.

Неходжкинская лимфома (NHL) – это группа раковых заболеваний лимфоцитов, возникающих из В- или Т-клеток. NHL встречается в любом возрасте и часто характеризуется увеличением лимфатических узлов, потерей веса и лихорадкой. Различные типы NHL подразделяются на агрессивные (быстрорастущие) и ленивые (медленно растущие). В-клеточная неходжкинская лимфома включает лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз/мелкоячеистая лимфома (CLL/SLL), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), фолликулярная лимфома, иммунобластная крупноклеточная лимфома, предшественники В-лимфобластной лимфомы и мантийноклеточная лимфома. Примеры Т-клеточной неходжкинской лимфомы включают грибовидный микоз, анапластическую крупноклеточную лимфому и предшественники Т-лимфобластной лимфомы. Лимфома, возникающая после трансплантации костного мозга или стволовых клеток, обычно является В-клеточной неходжкинской лимфомой. Например, см. Maloney, NEJM, 2012, 366(21):2008-16. Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL) – это форма NHL, которая возникает из В-клеток.

#### *Острый лимфоцитарный лейкоз (ALL)*

Острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) – это В-клеточное раковое заболевание, характеризующееся пролиферацией и накоплением неопластических клеток в костном мозге, крови, лимфатических узлах и селезенке. ALL может возникать как у взрослых, так и у детей, быстро прогрессировать и при отсутствии лечения приводить к летальному исходу. ALL включает рецидивирующий и/или рефрактерный ALL (r/r ALL). При рецидивирующем и/или рефрактерном ALL варианты лечения включают высокодозовую химиотерапию с последующей трансплантацией аллогенных стволовых клеток (SCT), стандартную химио-иммунотерапию, прицельное лечение низкомолекулярными

ингибиторами метаболических путей или поддерживающую терапию с нелечебными паллиативными целями. Аллогенная SCT является единственным потенциально эффективным вариантом лечения r/r ALL у детей, но результаты бывают субоптимальными. Среди больных детей с рецидивирующим и/или рефрактерным ALL, получавших аллогенную SCT при третьей или более поздней ремиссии, получавших аллогенную SCT при активном заболевании или получавших аллогенную SCT после рецидива при предыдущей аллогенной SCT, показатели общей выживаемости (OS) в течение 1 года составляют от 25 до 55%, а показатели OS в течение 5 лет обычно составляют от 20 до 45%.

Для пациентов с ALL, положительных по хромосоме Philadelphia (Ph<sup>+</sup>), в 2006 г. был одобрен дасатиниб (Sprycel) для лечения взрослых пациентов с резистентностью или непереносимостью предшествующей терапии. В 2013 г. был одобрен понатиниб (Iclusig) для лечения взрослых пациентов с ALL Ph<sup>+</sup>, устойчивых к дасатинибу или не переносящих его. Биспецифичное моноклональное антитело против CD3/CD19 Blincyto (блинатумомаб) было одобрено для лечения взрослых с рецидивирующим или рефрактерным ALL Ph<sup>-</sup> В-предшественников. Несмотря на современные методы лечения, поддержание ремиссии у пациентов с рецидивирующим ALL затруднено, и пациенты находятся в стационаре длительное время с низким качеством жизни. Прогноз у пациентов с рецидивирующим и/или рефрактерным заболеванием по-прежнему остается плохим.

#### *Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL)*

DLBCL – это агрессивная лимфома, которая может возникать в лимфатических узлах или за пределами лимфатической системы, например, в желудочно-кишечном тракте, яичках, щитовидной железе, коже, молочной железе, костях или головном мозге. При DLBCL обычно наблюдаются три варианта клеточной морфологии: центробластическая, иммунобластическая и анапластическая. Наиболее распространена центробластическая морфология, которая проявляется в виде лимфоцитов среднего и крупного размера с минимальной цитоплазмой. Существует несколько подтипов DLBCL. Хотя большинство пациентов с DLBCL – взрослые, иногда это заболевание встречается и у детей. Лечение DLBCL включает химиотерапию (например, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон, этопозид), антитела (например, Rituxan), облучение или трансплантацию аутологичных стволовых клеток (ASCT). Однако примерно половина пациентов с рецидивом и/или рефрактерностью к терапии первой линии не подлежат ASCT из-за преклонного возраста и/или сопутствующих заболеваний. Кроме того, среди пациентов, подходящих для высокодозовой терапии и трансплантации

аутологичных стволовых клеток (HD-ASCT), только примерно половина проявляет реакцию на спасательную терапию, достаточную для перехода к HD-ASCT. Кроме того, из тех, кто доходит до HD-ASCT, у 60% пациентов после трансплантации возникает рецидив. Клинические исследования, паллиативная химиотерапия и, в редких случаях, повторная HD-ASCT или аллогенная трансплантация стволовых клеток (AlloSCT) – вот некоторые из вариантов, доступных этим пациентам.

*Первичная крупноклеточная В-клеточная лимфома средостения (PMBCL)*

Первичная крупноклеточная В-клеточная лимфома средостения (PMBCL) имеет особые клинические, патологические и молекулярные характеристики по сравнению с DLBCL. Считается, что PMBCL возникает из В-клеток тимуса (медуллярного) и составляет примерно 3% от общего числа пациентов с диагнозом DLBCL. Обычно PMBCL выявляется у молодого взрослого населения на четвертом десятилетии жизни с небольшим преобладанием среди женщин. Профилирование экспрессии генов свидетельствует, что deregулированные пути при PMBCL совпадают с лимфомой Ходжкина. Начальная терапия PMBCL обычно включает содержащие антрациклин схемы с ритуксимабом, такие как инфузионное с подбором дозы введение этопозида, доксорубина и циклофосфида с винкристином, преднизолоном и ритуксимабом (DA-EPOCH-R), с лучевой терапией пораженных участков или без неё. Варианты лечения рецидивирующей/рефрактерной PMBCL аналогичны таковым при DLBCL. Пациенты с рефрактерным к химиотерапии заболеванием имеют аналогичный или худший прогноз, чем пациенты с рефрактерной DLBCL.

*Мантйноклеточная лимфома (MCL)*

MCL – это агрессивный рак, который плохо поддается современным методам лечения, то есть практически неизлечим. Мантйноклеточная лимфома возникает из В-клеток, разновидности лейкоцитов. В общем, у этих пациентов плохой прогноз, у них повторяются циклы ремиссии и рецидива, пока заболевание в конечном счете не становится смертельным. Исторически мантйноклеточная лимфома имела один из худших прогнозов из всех В-клеточных лимфом, так как заболевание может быть очень агрессивным, а химиотерапия не приводит к излечению.

В одном воплощении описанные здесь способы лечения подходят для пациентов с метастатическими опухолями от солидных раковых опухолей. Сольдные опухоли – это может быть рак молочной железы, тройные отрицательные клетки рака молочной железы, ER-положительный рак молочной железы, ER<sup>+</sup>- и ER<sup>-</sup>-рак молочной железы, ER<sup>+</sup>-рак молочной железы, рак простаты, рак поджелудочной железы, уротелиальный рак, немышечные клетки инвазивной уротелиальной карциномы, рак яичников, гипоксический

рак яичников, рак мочевого пузыря, меланома, раковые заболевания легких типа немелкоклеточного рака легких (NSCL), колоректальный рак, нефробластома типа опухоли Вильмса, карцинома щитовидной железы, рак щитовидной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, холангиокарцинома, нейробластома или мультиформная глиобластома. Действительно, эти разновидности солидных опухолей могут дренироваться в лимфоидные органы, предпочтительно в лимфатические узлы, при этом в таких лимфоидных органах могут встречаться метастазы, предпочтительно в лимфатических узлах. Как правило, описанные способы лечения способствуют устранению метастазов, встречающихся в лимфоидных органах, особенно в лимфатических узлах. В некоторых воплощениях онкогематологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), хронического миелоидного лейкоза (CML), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина (HL), неходжкинской лимфомы (NHL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), первичной крупноклеточной В-клеточной лимфомы средостения (PMBCL) или множественной миеломы.

Соответственно, способы по настоящему изобретению особенно подходят для пациентов с ALL, DLBCL, PMBCL и MCL.

В предпочтительном воплощении онкогематологическое заболевание представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL).

В определенных воплощениях такие субъекты являются подходящими для терапии клетками с CAR для лечения гематологического заболевания. Как правило, субъекту проводилась, проводится или будет проводиться терапия клетками с CAR, например, описанная здесь терапия клетками с CAR. В некоторых воплощениях субъекту проводилась, проводится или будет проводиться терапия клетками с CAR против CD19.

В определенных воплощениях такие субъекты подвержены риску возникновения синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), после терапии клетками с CAR, например, терапии Т-клетками с CAR, например, терапии Т-клетками с CAR против CD19.

В определенных воплощениях такие субъекты страдают CRS и/или MAS и/или ICANS либо им поставлен диагноз CRS и/или MAS и/или ICANS после терапии клетками с CAR, например, терапии Т-клетками с CAR, например, терапии Т-клетками с CAR против CD19.

В определенных воплощениях такие субъекты подвержены риску GVHD после

терапии аллогенными клетками с CAR.

### **Комбинированная терапия**

Композиции, содержащие клетки с CAR для применения в комбинированной терапии с модулятором рецепторов S1P, как описано здесь, применимы в качестве лекарственного средства в способах лечения онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, в частности, в популяции пациентов и при показаниях от заболеваний, как определено выше.

В одном воплощении такие клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против антигена CD19, вводят в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных клеток/кг массы тела. В другом воплощении такие клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против антигена CD19, вводят через 2-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

В одном воплощении количество клеток с CAR в периферической крови субъекта снижается на 1-40%, предпочтительно на 10-30% при измерении методом проточной цитометрии после 7, предпочтительно 14 дней применения модулятора рецепторов S1P по сравнению с количеством, измеренным без применения модулятора рецепторов S1P.

В другом воплощении количество модулятора рецепторов S1P, которое может вводиться в день, является фиксированным. Предпочтительно такая фиксированная суточная доза составляет от 0,05 мг до 40 мг в день, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг в день, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг в день или около 1 мг в день.

Например, модулятором рецепторов S1P может быть мокравимод, причем этот мокравимод можно вводить в суточной дозе 1 мг в день. С другой стороны, мокравимод можно вводить в дозе 3 мг в день, предпочтительно в виде трех твердых дозовых форм по 1 мг или в виде одной твердой дозовой формы в 3 мг. С другой стороны, мокравимод можно вводить в дозе 2 мг в день, предпочтительно в виде двух твердых дозовых форм по 1 мг или в виде одной твердой дозовой формы в 2 мг.

В некоторых воплощениях модулятор рецепторов S1P вводят ежедневно в течение по меньшей мере 1, 2 или 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная за 1-20 дней до композиции, содержащей клетки с CAR, более предпочтительно за 11 дней до Т-клеточной терапии.

Композиции, содержащие клетки с CAR, экспрессирующие молекулы химерного антигенового рецептора, который связывает антиген, связанный с раком, предпочтительно

Т-клетки с CAR, более предпочтительно Т-клетки с CAR против антигена CD19 (Т-клетки с CAR к CD19) для применения в комбинированной терапии с модулятором рецепторов S1P, более предпочтительно мокравимодом, как описано здесь, применимы, в частности, для предотвращения выхода клеток с CAR из костного мозга и/или для усиления приживления и персистенции клеток с CAR, тем самым улучшая терапию клетками с CAR.

Подробные воплощения таких способов описаны ниже.

В определенных воплощениях способ по настоящему изобретению включает следующие стадии:

1) получение иммунных клеток, к примеру, иммунных Т-клеток, от нуждающегося в этом субъекта-донора путем проведения лейкофереза,

2) генетическая модификация иммунных клеток субъекта-донора *ex vivo* с тем, чтобы они экспрессировали молекулы химерного антигенового рецептора (CAR), который связывает антиген, связанный с раком, тем самым получая композицию клеток с CAR,

3) кондиционирование субъекта-реципиента, к примеру, путем обработки данного субъекта-реципиента эффективным количеством лимфоистощающего химиотерапевтического средства или облучения его тела,

4) введение данному субъекту-реципиенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество клеток с CAR, полученных на стадии 2), и

5) введение субъекту-реципиенту эффективного количества модулятора рецепторов S1P, предпочтительно мокравимода или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного,

6) необязательно введение субъекту-реципиенту эффективного количества одного или нескольких иммунодепрессантов.

Подробные воплощения каждой стадии описаны ниже.

*Стадия (1): получение иммунных клеток от субъекта-донора путем лейкофереза*

Для осуществления способов лечения, описанных здесь, получают иммунные клетки от субъекта-донора методом лейкофереза, при котором собирают, обогащают или истощают лейкоциты *ex vivo* для отбора и/или выделения представляющих интерес клеток, например, Т-клеток. Врач берет кровь у субъекта с помощью катетера, введенного в его вену. Часть лейкоцитов пациента отделяется от крови пациента, а остальная часть крови пациента возвращается в его вену. Эта процедура может занять от 3 до 6 часов, и её может потребоваться повторить, чтобы получить достаточное количество лейкоцитов для выполнения стадии 2). Затем лейкоциты замораживают и отправляют для проведения генетических модификаций.

В предпочтительных воплощениях субъект-донор тот же, что и субъект-реципиент, нуждающийся в лечении, т.е. композиция, содержащая клетки с CAR, вводимые на стадии 4), содержит аутологичные или сингенные клетки с CAR.

В других воплощениях субъект-донор не тот же, что субъект-реципиент, нуждающийся в лечении, т.е. композиция, содержащая клетки с CAR, вводимые на стадии 4), содержит аллогенные клетки с CAR.

В предпочтительных воплощениях иммунные клетки – это иммунные эффекторские клетки, выбранные из группы, состоящей из Т-клеток лимфоцитов или естественных клеток-киллеров, более предпочтительно это Т-клетки лимфоцитов.

В определенных аспектах иммунные клетки, к примеру, Т-клетки, могут быть получены из образцов крови объемом от 10 до 400 куб. см. В определенных аспектах иммунные клетки, к примеру, Т-клетки, получают из образцов крови объемом 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 куб. см.

#### *Стадия (2): генетическая модификация*

В определенных воплощениях замороженные лейкоциты можно оттаять, а клетки отсортировать так, чтобы предпочтительно отобрать представляющие интерес иммунные клетки, например, Т-лимфоциты или НК-клетки. Эти иммунные клетки, однажды выделенные, можно размножить известными в данной области способами и обработать таким образом, чтобы можно было ввести одну или несколько конструкций CAR.

Иммунные клетки подвергают генетической модификации с тем, чтобы они экспрессировали молекулы CAR, который связывает антиген, связанный с раком, как описано выше. В предпочтительном воплощении такой связанный с раком антиген выбирают из группы, состоящей из CD19, CD30, CD33, CD123, CD20, CD22, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA, GD2, MCSP, CD5, NKG2D, MHC-пептидных антигенов, более предпочтительно это CD19.

Эта процедура может занять примерно не менее 2 недель.

#### *Стадия (3): лимфоистощение*

Для того, чтобы подготовить организм пациента к терапии клетками с CAR, проводится кондиционирование пациента или режим кондиционирования, если только число лейкоцитов в крови пациента в пределах одной недели до инфузии не будет меньше или равно 1000 клеток/мкл. Кондиционирование включает обработку пациента эффективным количеством лимфоистощающего химиотерапевтического средства до, после или одновременно с проведением описанной здесь терапии.

Лимфоистощающая химиотерапия в настоящем изобретении также именуется как лимфоистощение, лимфоистощающая терапия или режим лимфоистощения.

В некоторых воплощениях лимфоистошающая химиотерапия проводится у субъекта перед проведением терапии клетками с CAR, описанной здесь, например, терапии Т-клетками с CAR, например, в комбинации с модулятором рецепторов S1P. В некоторых воплощениях лимфоистощение включает введение одного или нескольких (например, всех) из мелфалана, цитарабина, этопозиды, бусульфана, бендамустина, циклофосфамида, флударабина, дексаметазона и алемтузумаба, предпочтительно циклофосфамида, флударабина, дексаметазона и алемтузумаба.

В некоторых воплощениях субъекту назначается лимфоистошающая химиотерапия после проведения терапии клетками с CAR, описанной здесь, например, терапии Т-клетками с CAR, например, в комбинации с модулятором рецепторов S1P. Например, это особенно актуально в тех случаях, когда терапию клетками с CAR приходится проводить еще один или еще несколько раз.

В одном конкретном воплощении, когда задержка между стадией 3) и стадией 4) составляет более 4 недель и число лейкоцитов в крови пациента превышает 1000 клеток/мкл, стадия 3) может проводиться еще один раз перед выполнением стадии 4).

В одном воплощении лимфоистошающее средство выбирают из группы, состоящей из циклофосфамида, цитарабина, этопозиды, бендамустина, бусульфана, мелфалана, флударабина и их комбинаций типа комбинированного введения флударабина/циклофосфамида, цитарабина/этопозиды.

В другом аспекте режим кондиционирования на стадии 3) состоит из:

- введения флударабина и циклофосфамида или
- введения цитарабина и этопозиды или
- введения бендамустина.

В одном воплощении флударабин вводят ежедневно внутривенно в дозе от 25 до 30 мг/м<sup>2</sup> в течение 3 или 4 дней, а циклофосфамид вводят ежедневно внутривенно в дозе от 250 до 500 мг/м<sup>2</sup> в течение 2 или 3 дней, начиная с первой дозы флударабина.

В другом воплощении цитарабин вводят ежедневно внутривенно в дозе 500 мг/м<sup>2</sup> в течение 2 дней, а этопозид вводят ежедневно внутривенно в дозе 150 мг/м<sup>2</sup> в течение 3 дней, начиная с первой дозы цитарабина.

В другом воплощении бендамустин вводят ежедневно внутривенно в дозе 90 мг/м<sup>2</sup> в течение 2 дней.

*Стадия (4): введение композиции, содержащей клетки с CAR*

Для осуществления способов лечения, описанных здесь, нуждающемуся в таком лечении субъекту, как описано здесь, вводят эффективное количество композиции, содержащей клетки с CAR, полученные на стадии (2).



В определенных воплощениях клетки с CAR, полученные на стадии (2), предпочтительно Т-клетки с CAR, можно активировать *in vitro* или *ex vivo* эффективным количеством модулятора рецепторов S1P. Поэтому один аспект изобретения также относится к способам активации или предварительной обработки клеток с CAR, предпочтительно Т-клеток с CAR, в частности, для применения в способе лечения, описанном здесь. В одном конкретном способе он включает (i) предварительную обработку клеток с CAR *ex vivo* или *in vitro* эффективным количеством модулятора рецепторов S1P для активации таких клеток с CAR (предпочтительно Т-клеток с CAR), получая тем самым активированные клетки с CAR (предпочтительно активированные Т-клетки с CAR), а затем (ii) введение терапевтически эффективного количества полученных активированных клеток с CAR нуждающемуся в таком лечении субъекту, как описано здесь. В одном конкретном воплощении последнего способа субъекту не вводят непосредственно модулятор рецепторов S1P в комбинации с композицией активированных клеток с CAR (за исключением, возможно, следового количества модулятора рецепторов S1P, которое использовалось для активации (*in vitro* или *ex vivo*) композиции клеток с CAR).

Фармацевтические композиции, содержащие клетки с CAR, можно вводить способом, соответствующим заболеванию, подлежащему лечению (или профилактике). Количество и частота введения должны определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и тяжесть его заболевания, хотя надлежащие дозы могут быть определены при клинических испытаниях.

В предпочтительном воплощении клетки с CAR, которые вводят на стадии 3), представляют собой Т-клетки с CAR, например, Т-клетки с CAR против CD19.

Композиции, содержащие клетки с CAR, могут дополнительно содержать один или несколько фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Такие композиции могут содержать буферы типа физраствора с нейтральным буфером, физраствора с фосфатным буфером и т.п.; такие углеводы, как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннитол; белки; полипептиды или аминокислоты типа глицина; антиоксиданты; хелатообразующие агенты типа ЭДТА или глутатиона; адьюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения, предпочтительно для инфузии. Клетки можно вводить методами инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (например, см. Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988).

В одном воплощении фармацевтические композиции практически не содержат,

например, на детектируемых уровнях, примесей, например, выбранных из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, способного к репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, HIV-gag, остаточных гранул, покрытых антителами против CD3/против CD28, мышинных антител, сборной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов питательных сред, упаковочных клеток для векторов или компонентов плазмид, бактерий и грибов. В одном воплощении по меньшей мере одни бактерии выбирают из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы A.

В одном воплощении клетки с CAR из стадии 3), к примеру, Т-клетки с CAR, в частности, Т-клетки с CAR против CD19, вводят в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$ , от  $0,5 \times 10^6$  до  $5,0 \times 10^8$ , от  $1,0 \times 10^6$  до  $4,0 \times 10^8$ , от  $2,0 \times 10^6$  до  $3,0 \times 10^8$ , от  $3,0 \times 10^6$  до  $2,0 \times 10^8$ , от  $3,0 \times 10^6$  до  $1,0 \times 10^8$ , от  $4,0 \times 10^6$  до  $9,0 \times 10^7$ , от  $5,0 \times 10^6$  до  $8,0 \times 10^7$ , от  $6,0 \times 10^6$  до  $7,0 \times 10^7$ , от  $7,0 \times 10^6$  до  $6,0 \times 10^7$ , от  $8,0 \times 10^6$  до  $5,0 \times 10^7$ , от  $9,0 \times 10^6$  до  $4,0 \times 10^7$ , от  $1,0 \times 10^7$  до  $3,0 \times 10^7$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток на кг массы тела. В предпочтительном воплощении доза клеток с CAR из стадии 3) (к примеру, Т-клеток с CAR, в частности, Т-клеток с CAR против CD19) составляет от  $1,2 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на кг массы тела. В другом воплощении доза клеток с CAR из стадии 3) составляет от  $0,4 \times 10^8$  до  $2 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на кг массы тела.

В другом воплощении клетки с CAR из стадии 3), например, Т-клетки с CAR, в частности, Т-клетки с CAR против CD19, вводят через 2-14 дней или через 3-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

Введение композиций, содержащих клетки с CAR, может проводиться любым удобным способом, в том числе путем аэрозольной ингаляции, инъекции, проглатывания, переливания, имплантации или трансплантации. Описанные здесь композиции можно вводить пациентам трансартериально, подкожно, внутривенно, внутрь опухоли, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции, содержащие клетки с CAR, вводят пациентам путем внутривенной или подкожной инъекции. В предпочтительном аспекте композиции Т-клеток по настоящему изобретению вводят путем в/в инъекции. Композиции по изобретению можно вводить непосредственно в лимфатический узел или очаг инфекции.

В одном воплощении CAR вводят в иммунные клетки в соответствии со стадией 2),

и субъект получает первое введение клеток с CAR, а впоследствии одно или несколько последующих введений клеток с CAR, причем одно или несколько последующих введений проводят менее чем через 15 дней, например, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

В одном воплощении проводится более чем одно введение клеток с CAR субъекту в неделю, например, проводится 2, 3 или 4 введения клеток с CAR по изобретению в неделю. В одном воплощении субъект получает более чем одно введение клеток с CAR в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (которые также именуется здесь циклом), за которыми следует неделя без введения клеток с CAR, а затем проводится одно или несколько дополнительных введений клеток с CAR (например, более чем одно введение клеток с CAR в неделю) субъекту.

В другом воплощении субъект получает более одного цикла клеток с CAR, а время между каждым циклом составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дней. В одном воплощении клетки с CAR вводят через день по 3 введения в неделю. В одном воплощении клетки с CAR по изобретению вводят по меньшей мере в течение двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или больше недель.

Возможной проблемой, которая может возникнуть у пациентов при лечении с помощью клеток с CAR (особенно с CARs, несущими мышиные scFv), является анафилаксия после многократной обработки. Не придерживаясь какой-либо теории, полагаем, что такая анафилактическая реакция у пациентов может быть вызвана развитием гуморальной реакции против CAR, то есть антителами против CAR с изотипом IgE. Считается, что клетки пациента, вырабатывающие антитела, подвергаются переключению класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксии) на изотип IgE, если в воздействии антигена наступает перерыв в 10-14 дней. Если пациент подвержен сильному риску возникновения реакции антител против CAR во время курса кратковременной терапии CAR (типа возникающей при трансдукции РНК), то перерывы в инфузии Т-клеток с CAR могут длиться не более 10-14 дней.

В некоторых аспектах может потребоваться ввести субъекту клетки с CAR, а затем повторно взять кровь (или провести аферез), генетически модифицировать иммунные клетки, полученные в соответствии со стадией (1), и снова ввести пациенту эти клетки с CAR. Этот процесс можно проводить по несколько раз через каждые несколько недель.

#### *Стадия (5): введение модулятора рецепторов S1P*

Для осуществления способов лечения, описанных здесь, нуждающимся в таком лечении субъектам вводят эффективное количество модулятора рецепторов S1P, описанного здесь, предпочтительно мокравимода.

В некоторых воплощениях количество модулятора рецепторов S1P, предпочтительно мокравимода или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного, которое вводят в день, является фиксированным. В некоторых воплощениях фиксированная суточная доза составляет от 0,05 мг до 40 мг в день, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг в день, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг в день или около 1 мг в день.

Например, модулятором рецепторов S1P может быть мокравимод, причем этот мокравимод можно вводить в суточной дозе 1 мг в день. С другой стороны, мокравимод можно вводить в дозе 3 мг в день, предпочтительно в виде трех твердых дозовых форм по 1 мг или в виде одной твердой дозовой формы в 3 мг. С другой стороны, мокравимод можно вводить в дозе 2 мг в день, предпочтительно в виде двух твердых дозовых форм по 1 мг или в виде одной твердой дозовой формы в 2 мг.

В настоящем изобретении количество фармацевтически приемлемых солей или фосфатных производных мокравимода относится к количеству основания мокравимода.

Композиции, содержащие клетки с CAR, как описано здесь, и/или модулятор рецепторов S1P, можно вводить одновременно, в одной и той же либо в отдельных композициях, или последовательно.

При последовательном введении, в одном воплощении, композицию, содержащую клетки с CAR, описанные здесь, можно вводить первой, а модулятор рецепторов S1P можно вводить вторым. В другом конкретном воплощении последовательного введения введение модулятора рецепторов S1P (обычно в виде суточной дозы) начинается перед первым введением композиции клеток с CAR.

В одном воплощении модулятор рецепторов S1P вводят перед введением композиции, содержащей клетки с CAR. В различных воплощениях модулятор рецепторов S1P вводят по меньшей мере за 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 20 дней до начала введения композиции клеток с CAR, предпочтительно за 11 дней до начала введения композиции клеток с CAR.

В некоторых воплощениях модулятором рецепторов S1P является мокравимод, и этот мокравимод вводят ежедневно в течение 1, 2, 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная за 1-20 дней до первого введения композиции, содержащей клетки с CAR (терапии клетками с CAR), более предпочтительно за 11 дней до начала терапии клетками с CAR.

Суточная доза модулятора рецепторов S1P может вводиться в виде одной дозы в день или несколькими дозами за один день. В предпочтительном воплощении суточную дозу вводят один раз в день. В некоторых воплощениях дозы вводят несколько раз в день, предпочтительно 3 раза в день. В некоторых воплощениях можно использовать минимальную дозу, достаточную для обеспечения эффективной терапии.

В другом воплощении модулятором рецепторов S1P является мокравимод, и этот мокравимод вводят в суточной дозе 3 мг, например, три твердые дозовые формы по 1 мг в день. Действительно, 3 твердые дозовые формы типа капсул или таблеток по 1 мг при введении с промежутками легче проглотить, чем одну твердую дозовую форму в 3 мг.

В некоторых воплощениях терапия клетками с CAR назначается субъекту с онкогематологическими заболеваниями, как описано здесь. Терапия клетками с CAR может быть продолжена (например, когда у субъекта все еще выявляются некоторые раковые клетки, экспрессирующие связанный с раком антиген) или может быть прекращена (например, когда анализ соотношения риска и пользы свидетельствует в пользу прекращения терапии).

При терапии клетками с CAR, когда требуется более чем одно введение композиции, содержащей клетки с CAR, режим введения модулятора рецепторов S1P начинают или завершают перед введением композиции, содержащей клетки с CAR.

В некоторых воплощениях пациенту дополнительно вводят один или несколько иммунодепрессантов. Один или несколько иммунодепрессантов включают, без ограничения, любые из следующих средств: циклоспорин А, сиролимус, такролимус, метотрексат и микофенолат, предпочтительно это циклоспорин А или комбинация циклоспорина А и метотрексата.

В предпочтительном воплощении способа по настоящему изобретению модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для предотвращения выхода клеток с CAR (обычно Т-клеток с CAR) из костного мозга и/или лимфатических узлов и/или для стимулирования приживания и персистенции клеток с CAR (обычно Т-клеток с CAR) и/или повышения эффективности терапии клетками с CAR (обычно Т-клетками с CAR). Действительно, повышение эффективности терапии клетками с CAR (обычно Т-клетками с CAR) означает активацию таких клеток с CAR, что позволяет улучшить способность клеток с CAR уничтожать опухолевые клетки и таким образом улучшить лечение онкогематологических заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, т.е. усилить противоопухолевый эффект.

В другом воплощении модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для снижения риска синдрома высвобождения цитокинов (CRS), в частности

синдрома системного высвобождения цитокинов, и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), у субъектов, получающих клетки с CAR. Действительно, снижение риска синдрома высвобождения цитокинов и/или синдрома активации макрофагов и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками, позволяет улучшить реакцию пациента на лечение клетками с CAR. CRS – это результат введения клеток с CAR, особенно Т-клеток с CAR, которые сильно активируются, что приводит к высвобождению огромного количества цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 и IL-17A, а предотвращение высвобождения цитокинов могло бы способствовать предотвращению CRS и тем самым улучшить реакцию пациентов на лечение клетками с CAR. MAS – это тяжелый гипервоспалительный синдром, характеризующийся CRS и сочетанием повышенного ферритина в сыворотке и гемофагоцитоза, почечной недостаточностью, печеночными ферментами, спленомегалией, отеком легких и/или отсутствием активности NK-клеток, а предотвращение высвобождения цитокинов, ферритина в сыворотке, печеночных ферментов могло бы способствовать предотвращению MAS и тем самым улучшить реакцию пациентов на лечение клетками с CAR.

ICANS характеризуется повышенным уровнем цитокинов в спинномозговой жидкости и нарушением гематоэнцефалического барьера, а предотвращение высвобождения цитокинов в спинномозговую жидкость могло бы способствовать предотвращению ICANS и тем самым улучшить реакцию пациентов на лечение клетками с CAR.

Следовательно, должно улучшиться лечение онкогематологических заболеваний, особенно диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) у нуждающихся в этом субъектов.

В одном воплощении модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для снижения риска синдрома высвобождения цитокинов, в частности синдрома системного высвобождения цитокинов, у субъектов, получающих аллогенные клетки с CAR.

В предпочтительных воплощениях модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для снижения риска синдрома высвобождения цитокинов, в частности синдрома системного высвобождения цитокинов, у субъектов, получающих аутологичные или сингенные клетки с CAR.

Итак, настоящее изобретение также касается модулятора рецепторов S1P для применения в предотвращении или снижении риска синдрома высвобождения цитокинов

(CRS), в частности синдрома системного высвобождения цитокинов, и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), у нуждающихся в этом субъектов, получающих терапию клетками с CAR, как правило, проходящих терапию клетками с CAR, как описано выше.

В определенных воплощениях способов, когда реципиент не является донором клеток с CAR, к примеру, клетки с CAR являются аллогенными или универсальными клетками с CAR, модулятор рецепторов SIP вводят в количестве, достаточном для снижения риска GVHD.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

**Фиг. 1.** Схема эксперимента из примера 1. Сублетальное облучение (4Gy) и введение  $0,5 \times 10^6$  клеток лейкемии внутривенно мышам C57Bl/6 в день -7. Инъекция KRP203 3 мг/кг или инъекция PBS представлена черными стрелками в зависимости от дня инъекции. Знаками + и - отмечено введение или не введение Т-клеток с CAR в день 0.

**Фиг. 2.** Сводные графики, показывающие процент опухолевых клеток, выделенных из лимфатических узлов, селезенки, костного мозга и крови. Каждая точка представляет одну мышь. Слева направо: светло-серым цветом обозначена группа CAR8+PBS, средне-серым – группа CAR8+KRP203 D-1, а темно-серым – группа CAR8+KRP203 D+2.

**Фиг. 3.** Количественное представление экспрессии CD69 на поверхности, внутриклеточного гранзима В и PD-1 на поверхности в Т-клетках с CAR в лимфатических узлах, селезенке, костном мозге и крови. Каждая точка представляет одну мышь.

**Фиг. 4.** Схема эксперимента из примера 2.

**Фиг. 5.** Мокравимод (темно-серым) и финголимод (средне-серым) снижают уровень IFN- $\gamma$ , индуцированный введением Т-клеток с CAR. Уровень (А) INF- $\gamma$  измеряли в плазме через 5 дней после введения Т-клеток с CAR. Представлены индивидуальные значения и средние значения  $\pm$  SEM; n = 6-8 мышей в группе. А. Для сравнения всех опытных групп между собой использовали односторонний метод ANOVA с последующим посттестированием по Даннетту. \*\*\* p < 0,001.

**Фиг. 6.** Мокравимод (черным) снижает уровень IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2, индуцированный введением Т-клеток с CAR. Уровень IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 измеряли в плазме через 5 дней после введения Т-клеток с CAR. Представлены средние значения  $\pm$  SD; n = 5 мышей в группе. Для сравнения групп носителя и мокравимода в каждой точке времени использовали непарный t-критерий. \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

**Фиг. 7.** Мокравимод снижает абсолютное количество Т-клеток с CAR в крови. Абсолютное количество Т-клеток с CAR измеряли в плазме с 1 по 5 день после введения Т-

клеток с CAR. Представлены средние значения  $\pm$  SD; n = 5 мышей в группе. Для сравнения групп мокравимода и носителя на 5 день использовали непарный t-критерий. \*p<0,05.

**Фиг. 8.** Мокравимод повышает содержание Т-клеток с CAR в костном мозге по сравнению с группой без обработки. Содержание Т-клеток с CAR в костном мозге измеряли через 4 дня после введения Т-клеток с CAR. Представлены индивидуальные значения и средние значения  $\pm$  SEM; n = 3 мыши в группе. Для сравнения мокравимода с контролем использовали непарный t-критерий. \*p < 0,05.

**Фиг. 9.** Мокравимод уничтожает опухолевые клетки in vitro. При сравнении отсутствия мокравимода с 7,5 мкМ мокравимода использовали непарный t-критерий. \*\*p<0,005, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

**Фиг. 10.** Мокравимод повышает выживаемость в комбинации с Т-клетками с CAR по сравнению с одними лишь Т-клетками с CAR и без обработки. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p < 0,001.

**Фиг. 11.** Мокравимод в комбинации с Т-клетками с CAR увеличивает устранение опухолей.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1. Модуляторы S1P усиливают активацию Т-клеток с CAR

#### Материалы и методы

##### Мыши и клеточные линии

6-8-недельных самцов мышей C57BL/6J получали от фирмы Envigo. Мышей Ubi-GFP RAG1-/- OT-I TCR разводили и скрещивали в нашем виварии в условиях, свободных от определенных патогенов. Все эксперименты были одобрены Комитетом по безопасности Института Пастера в соответствии с французскими и европейскими директивами (СЕТЕА 2017-0038). Иммутизированные про-В-клетки получали путем инфицирования клеток костного мозга ретровирусом, кодирующим вирусную киназу Абельсона (v-abl). Затем эту линию опухолевых клеток подвергали трансдукции ретровирусом для экспрессии основанного на резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET) репортера активности каспазы 3. Мышей осматривали каждый день и забивали в случае протрации, взъерошенных волос, слабости или массы опухоли узла > 1 см. Клетки культивировали в среде RPMI 1640-GlutaMAX™ с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ HEPES и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола и содержали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки регулярно проверяли на отсутствие загрязнения микоплазмой (набор для обнаружения микоплазмы (Venor-GeM Advance, Minerva



Biolabs).

#### Получение Т-клеток с CAR и адоптивный перенос

Ретровирусный вектор tCD34.2A.amCD19.CD28IEV $\zeta$ , кодирующий CAR против CD19, состоит из вариабельного домена одноцепочечного фрагмента против CD19 мыши, полученного из крысиной гибридомы 1D3, трансмембранного и внутриклеточного доменов CD28 и внутриклеточного домена CD3z. Ретровирусный вектор также кодирует усеченную молекулу CD34 человека, используемую для идентификации и очистки Т-клеток с CAR. Т-клетки CD8<sup>+</sup> выделяли из лимфатических узлов мышей Ubi-GFP RAG1<sup>-/-</sup> OT-I TCR. Т-клетки активировали в планшетах, покрытых 2,5 мкг/мл mAb против CD3 (клон 17.A2; BioLegend), в присутствии 2,5 мкг/мл растворимого mAb против CD28 (клон 37.51; BioLegend) и 10 нг/мл IL-12 мыши (I8523; Sigma-Aldrich). Через 24 и 48 часов после активации Т-клеток проводили два раунда спин-инфицирования с помощью ретровирусных частиц с добавлением 8 мкг/мл полибрена (Merck). Т-клетки культивировали еще 4 дня в присутствии 10 нг/мл hIL-2 (202-IL; R&D Systems). Эффективность трансдукции CAR обычно составляла >80%; если она была ниже, то проводили очистку трансдуцированных клеток с помощью набора для отбора положительных по hCD34 клеток (Miltenyi Biotec). В-клеточные опухоли получали путем введения мышам  $0,5 \times 10^6$  трансформированных про-В-клеток после сублетального облучения (4 Гр), которое использовалось в качестве режима кондиционирования для приживания Т-клеток с CAR. Опухоли развиваются главным образом в костном мозге и становятся заметными в крови к 7-му дню, когда Т-клетки с CAR ( $5 \times 10^6$  клеток) вводят внутривенно (в/в).

#### Обработка мышей KRP203

Мыши непрерывно получали KRP203 (3 мг/кг массы тела) внутрибрюшинно каждый второй день. Обработка KRP203 начиналась либо за день до, либо через 2 дня после введения Т-клеток с CAR. Контрольные животные получали ФСБ внутрибрюшинно. Схема эксперимента представлена на фиг. 1.

#### Проточная цитометрия и антитела

Для анализа ex vivo выделяли клетки костного мозга путем промывания бедренной и большеберцовой костей от мышей с опухолями и последующего фильтрования через клеточные фильтры на 70 мкм. Одноклеточные суспензии из селезенки и лимфатических узлов получали путем фильтрования клеток через клеточные фильтры на 70 мкм. Брали кровь путем пункции сердца после забоя мыши и удаляли эритроциты с помощью буфера для лизиса эритроцитов (eBiosciences). Одноклеточные суспензии подвергали Fc-блокировке с помощью mAb против CD16/32 (клон 93; BioLegend) и 1% нормальной

мышинной сыворотки. Проводили окрашивание с помощью следующих mAb: hCD34-Alexa Fluor 647 (клон 561; BioLegend), CD69-BUV737 (клон H1.2F3; BD Biosciences), CD8a-BUV395 (клон 53-6.7; BD Biosciences), CD19-APC-fire750 (клон 6D5; BioLegend) и PD-1-PE/Cy7 (клон 29F.1A12; BioLegend). Проводили внутриклеточное окрашивание с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) согласно рекомендациям производителя и конъюгированного с PE mAb против гранзима В (клон QA18A28; BioLegend). Проводили анализы на проточном цитометре Cytoflex LX (Beckman Coulter) и анализировали их с помощью FlowJo v.10.8.0 (BD).

#### Статистический анализ

Все статистические тесты выполняли с помощью Prism v.9.2.0 (GraphPad). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная погрешность среднего (SEM). Для множественных сравнений с коррекцией использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и двухфакторный ANOVA. Все статистические тесты были двусторонними с уровнем значимости 0,05; ns, незначимо; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### **Результаты**

Проводили определение опухолевых клеток лейкемии в различных лимфоидных органах. Результаты представлены на фиг. 2. Опухолевая нагрузка, выраженная в абсолютном количестве опухолевых клеток, снижалась в лимфатических узлах у мышей, получавших CAR8 + ФСБ, по сравнению с мышами, получавшими только опухолевые клетки (группа без обработки). Показано, что при введении Т-клеток с CAR и KRP203 в день -1 или d+2 абсолютное количество опухолей в лимфатических узлах значительно снижается по сравнению с контролем (CAR8+ФСБ) и группами без обработки. Это означает, что при введении KRP203 в комбинации с Т-клетками с CAR мышам с лейкемией можно достичь снижения абсолютного количества опухолей в лимфатических узлах. Абсолютное количество опухолей в лимфатических узлах еще больше снижается при введении KRP203 в день -1, 1-й и 3-й день по сравнению с введением KRP203 только на 2-й день.

Проводили оценку активации и элиминации Т-клеток с CAR. Результаты представлены на фиг. 3. Результаты согласуются с фиг. 2 по уменьшению опухолевой нагрузки в лимфатических узлах. Действительно, показано, что большая доля Т-клеток с CAR экспрессирует маркеры активации (CD69, GrB, PD-1) при комбинации с обработкой KRP203. В лимфатических узлах при введении KRP203 со дня -1 значительно повышается степень активации Т-клеток с CAR в 2-3 раза по сравнению с контролем. При введении в день +2 также наблюдается тенденция к повышению активации Т-клеток с CAR по сравнению с контролем, но в меньшей степени по сравнению с введением в день -1.

Повышение маркеров активации (CD69, PD-1) указывает на то, что Т-клетки с CAR более чувствительны к опухолевым клеткам, а повышение содержания гранзима В (GrB) указывает на то, что Т-клетки с CAR обладают повышенной способностью к уничтожению раковых клеток. Кроме того, удаление Т-клеток с CAR вместе с модуляторами S1P в лимфатические узлы может привести к тому, что такие Т-клетки с CAR проживут дольше.

Кроме того, исследовали выживание мышей и как на него влияет введение KRP203 в комбинации с Т-клетками с CAR. Мыши, получавшие комбинацию Т-клеток с CAR и KRP203, проявляли статистически значимое улучшение выживаемости по сравнению с мышами, не получавшими обработки или получавшими только Т-клетки с CAR (фиг. 10).

## **Пример 2. Комбинация модуляторов S1P с Т-клетками с CAR предотвращает CRS**

### **Материалы и методы**

#### Животные

Исследование проводилось на самках мышей линии NOD/SCID/IL-2R<sup>ynull</sup> с иммунодефицитом (NCG). Все процедуры, описанные в этом исследовании, были рассмотрены и одобрены местным комитетом по этике (CELEAG). Мышей содержали группами по 2/6 особей в виварии TCS BSL-2. Каждую мышь идентифицировали уникальным образом.

#### Прививка опухолевых клеток

Опухолевые клетки JEKO-1-luc-GFP размножали *in vitro* согласно рекомендациям ATCC.  $5 \times 10^6$  опухолевых клеток культивировали в RPMI-1640 с 10% СВФ и 1% пенициллина/стрептомицина при 37°C в насыщенной водой стерильной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После проверки жизнеспособности опухолевые клетки в фазе логарифмического роста вводили отобранным животным.

Опухолевые клетки JEKO-1-luc-GFP суспендировали в концентрации  $50 \times 10^6$  клеток/мл в ФСБ.

Опухолевые клетки вводили внутривенно 24 мышам с иммунодефицитом по 100 мкл клеточной суспензии ( $5 \times 10^6$  JEKO-1 на мышь). День прививки опухолей определяли как D0.

#### Рандомизация, группы и обработка

Мышей распределяли по 4 группам в соответствии с их массой тела и обрабатывали следующим образом: #1 носитель – носитель, #2 Т с CAR – носитель, #3 Т с CAR – мокравимод и #4 Т с CAR – финголимод.

Мокравимод и финголимод (FTY720) вводили в дозе 3 мг/кг путем

внутрибрюшинной инъекции. Группы мокравимода и носителя (группы #1, #2 и #3) обрабатывали каждые 2 дня, тогда как группу финголимода (#4) обрабатывали ежедневно, начиная с D6. Т-клетки с CAR вводили один раз в D7 в дозе  $0,75 \times 10^6$  клеток на мышь (см. нижеследующую таблицу).

Группа	Количество мышей	Обработка
1	6	*носитель (стерильная вода + ДМСО) в D6 + каждые 2 дня внутрибрюшинно + носитель (ФСБ) один раз в D7 внутривенно
2	6	*носитель (стерильная вода + ДМСО) в D6 + каждые 2 дня внутрибрюшинно + $0,75 \times 10^6$ Т-клеток с CAR один раз в D7 внутривенно
3	6	**мокравимод 3 мг/кг в D6 + каждые 2 дня внутрибрюшинно + $0,75 \times 10^6$ Т-клеток с CAR один раз в D7 внутривенно.
4	6	***финголиמוד 3 мг/кг в D6 + каждые 2 дня внутрибрюшинно + $0,75 \times 10^6$ Т-клеток с CAR один раз в D7 внутривенно

\*Раствор носителя, вводимый группам #1 и #2, имитировал концентрацию ДМСО, которая использовалась для мышей, получавших мокравимод (#3).

\*\* Мокравимод: готовили исходный раствор в концентрации 100 мг/мл со 100% ДМСО и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Каждый день инъекций (каждые 2 дня) оттаивали одну пробирку и перемешивали, добавляя воду, получая рабочий раствор в 0,75 мг/мл. Мышам внутрибрюшинно вводили 100 мкл рабочего раствора.

\*\*\* Один флакон финголимода, содержащий 25 мг, ресуспендировали в 2,5 мл воды. Это исходный раствор из расчета 10 мг/мл. Исходный раствор разделяли на аликвоты и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Каждый день оттаивали одну пробирку и перемешивали, добавляя стерильную воду, получая рабочий раствор в 0,75 мг/мл. Мышам внутрибрюшинно вводили 100 мкл рабочего раствора.

Схема эксперимента представлена на фиг. 4.

#### Отбор крови и получение органов

Брали кровь ретроорбитально в D12 для выделения плазмы и анализа СВА и в D25, день эвтаназии, для анализа методом проточной цитометрии.

Также извлекали селезенку и костный мозг и диссоциировали их механически в соответствии со стандартными рабочими процедурами (SOP) TransCure bioServices, а перед анализом методом проточной цитометрии проводили лизис эритроцитов с помощью буфера для лизиса эритроцитов при комнатной температуре в течение 1 мин в соответствии с внутренними протоколами TransCure bioServices. Перед диссоциацией небольшую часть селезенки фиксировали в 4% ПФА и заливали в парафин для дальнейшего анализа методом ИГХ.

Полученные выделенные клетки подвергали окрашиванию для

иммунофенотипирования методом проточной цитометрии в соответствии с внутренними протоколами TransCure bioServices.

#### Анализ цитокинов

Проводили анализ цитокинов (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 и IL-17a) в образцах плазмы (25 мкл) с помощью специального набора Cytometric Bead Array (CBA) в соответствии с инструкциями производителя (BD Biosciences) и стандартными процедурами TransCure.

Измеряли уровни нескольких цитокинов человека (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 и IL-17A) в D12 (через 5 дней после введения Т-клеток с CAR) при помощи цитометрического набора шариков (CBA) (фиг. 5). В крови мышей не было выявлено совсем или очень низкие уровни IL-2, IL4, IL-6, IL-10, IL-17A или TNF- $\alpha$ , независимо от опытных групп.

Анализ профиля цитокинов в крови через 5 дней после введения Т-клеток с CAR показал, что INF- $\gamma$  выявляется только у мышей, получавших Т-клетки с CAR. Промежуточные уровни INF- $\gamma$  обнаруживались в группах, получавших Т с CAR – мокравимод и Т с CAR – финголимод (менее 10 пг/мл), и значительно более высокий уровень выявлялся в группе Т с CAR – носитель по сравнению с группой носитель – носитель (фиг. 5). Кроме того, уровень INF- $\gamma$  был значительно ниже в группах Т с CAR – мокравимод и Т с CAR – финголимод по сравнению с группой, получавшей Т с CAR – носитель.

#### **Вывод**

Т-клетки с CAR индуцируют высвобождение провоспалительного INF- $\gamma$ , которое значительно снижалось при обработке мокравимодом или финголимодом. Эти результаты свидетельствуют, что обработка модуляторами S1P была бы полезной для предотвращения синдрома высвобождения цитокинов (CRS), вызванного терапией Т-клетками с CAR.

### **Пример 3. Комбинация модуляторов S1P с Т-клетками с CAR предотвращает CRS**

#### **Материалы и методы**

##### Анализ цитокинов

Для определения кинетики секреции цитокинов и оценки эффективности мокравимода в снижении уровня циркулирующих цитокинов при введении в комбинации с Т-клетками с CAR мышам NOD CRISPR Prkdc Il2r Gamma (NCG) внутривенно вводили  $5 \times 10^6$  опухолевых клеток JEKO-1-luc-GFP. Обработка мокравимодом либо носителем начиналась на 6-й день после прививки опухолевых клеток. Мокравимод (3 мг/кг) вводили

каждый второй день. На 7-й день после прививки опухолевых клеток внутривенно вводили  $0,75 \times 10^6$  Т-клеток с CAR. У мышей брали кровь через 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч и 120 ч после введения Т-клеток с CAR и выделяли плазму. В образцах плазмы определяли интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), фактор некроза опухолей- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерлейкин-2 (IL-2) с помощью набора для анализа цитокинов BD CBA Human Th1/Th2/Th17. В крови проводили фенотипирование и подсчет Т-клеток с CAR.

Анализ профиля цитокинов в крови через 5 дней после введения Т-клеток с CAR показал, что уровень IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2 был значительно ниже в группе, получавшей Т с CAR – мокравимод (около 100 пг/мл, около 0 пг/мл и около 2 пг/мл, соответственно) по сравнению с группой, получавшей Т с CAR – носитель (около 250 пг/мл, около 6 пг/мл, около 3 пг/мл, соответственно) (фиг 6).

#### Приживление клеток CAR-T

Такой же протокол, что и в примере 1, выполняли в методе анализа Т-клеток с CAR в костном мозге, и такой же протокол, что и для анализа цитокинов, выполняли в методе анализа Т-клеток с CAR в крови.

Показано, что, когда введение мокравимода начинается в день -1 перед инъекцией Т-клеток с CAR, абсолютное количество Т-клеток с CAR в крови значительно снижается по сравнению с контролем (носителем) на 5-й день (фиг. 7). При сравнении с контролем комбинации мокравимода с Т-клетками с CAR абсолютное количество Т-клеток с CAR в крови в 1-й день было одинаковым (около 500). Однако абсолютное количество Т-клеток с CAR в крови имеет тенденцию к возрастанию с 3-го по 5-й день по сравнению с контролем (примерно с 500 до 1500), тогда как при комбинации мокравимода с Т-клетками с CAR абсолютное количество Т-клеток с CAR в крови имеет тенденцию к уменьшению (с примерно 500 до примерно 100).

Эти результаты согласуются с содержанием Т-клеток с CAR в костном мозге на 4-й день. При введении мокравимода вместе с Т-клетками с CAR содержание Т-клеток с CAR в костном мозге значительно повышалось по сравнению с контролем (Т с CAR + ФСБ) (фиг. 8). Результаты показывают, что при комбинации мокравимода с Т-клетками с CAR количество Т-клеток с CAR в крови снижается, а количество Т-клеток с CAR в костном мозге повышается, что указывает на удаление Т-клеток с CAR в лимфоидные органы. Таким образом, комбинация мокравимода с Т-клетками с CAR предотвращает выход клеток из костного мозга, способствует приживлению Т-клеток с CAR и повышает эффективность терапии Т-клетками с CAR.

#### Выводы

Т-клетки с CAR секретируют провоспалительные цитокины IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2,

уровень которых значительно снижается при обработке мокравимодом. Эти результаты подтверждают, что обработка модуляторами S1P, более предпочтительно мокравимодом, была бы полезной для предотвращения синдрома высвобождения цитокинов (CRS), вызванного терапией Т-клетками с CAR.

Т-клетки с CAR имеют тенденцию к выходу из костного мозга и обнаруживаются в крови. Эти результаты подтверждают, что обработка модуляторами S1P была бы полезной для предотвращения выхода Т-клеток с CAR из костного мозга, стимулирования приживления и персистенции клеток с CAR и тем самым повышения эффективности терапии Т-клетками с CAR.

#### **Пример 4. Модуляторы S1P вызывают апоптоз**

##### **Материалы и методы**

Для исследования клеточной цитотоксичности (индукции гибели клеток) мокравимода на различных линиях клеток рака крови размножали клетки и инкубировали в течение 2 и 24 часов в присутствии 7,5 мкМ мокравимода. Использовали следующие линии клеток: MOLM-13, THP-1, Kasumi-1, Jurkat, Raji, JEKO-1 и MV-4-11. В 96-луночный планшет высевали по  $10^5$  опухолевых клеток на лунку. Через 2 и 24 часа после инкубации при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> клетки окрашивали аннексином V и DAPI для оценки гибели клеток.

##### **Результаты**

Содержание погибших клеток по каждой линии опухолевых клеток MOLM-13 (AML), THP-1 (AML), Kasumi-1 (AML), Jurkat (ALL), Raji (В-клеточная лимфома), JEKO-1 (мантийноклеточная лимфома) и MV-4-11 (AML) было выше при введении мокравимода в опытных группах по сравнению с контрольными группами без обработки (фиг. 9). Таким образом, мокравимод индуцирует апоптоз опухолевых клеток во всех клеточных линиях MOLM-13, THP-1, Kasumi-1, Jurkat, Raji, JEKO-1 и MV-4-11. Следовательно, применение мокравимода в комбинации с Т-клетками с CAR позволяет повысить эффективность уничтожения онкогематологических образований.

#### **Пример 5. Комбинация мокравимода с Т-клетками с CAR усиливает элиминацию опухолей**

##### **Материалы и методы**

Мышам Scid-beige вводили  $0,5 \times 10^6$  опухолевых клеток Nalm6-GFP<sup>+</sup> через хвостовую вену (день 0). Опухолевые клетки предварительно размножали *in vitro*. Через две недели после введения опухолей (14-й день) некоторые мыши оставались без обработки, а другие мыши получали  $1 \times 10^7$  Т-клеток с CAR и  $1 \times 10^6$  мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Половину мышей, получавших Т-клетки с CAR,

обрабатывали мокравимодом, тогда как другая половина получала носитель (ДМСО). Обработка мокравимодом в дозе 3 мг/кг начиналась за 3 дня до введения Т-клеток с CAR и продолжалась каждый второй день до окончания эксперимента. Через 4 дня после введения Т-клеток с CAR (18-й день) проводили анализ опухолевых клеток в костном мозге (КМ).

### **Результаты**

Проводили определение опухолевых клеток Nalm6-GFP<sup>+</sup> в КМ во всех группах. У мышей, не получавших Т-клеток с CAR, наблюдалась самая высокая опухолевая нагрузка (фиг. 11). Количество опухолевых клеток эффективно уменьшалось при введении Т-клеток с CAR. Более того, при введении KRP203 в комбинации с Т-клетками с CAR количество опухолевых клеток уменьшалось еще больше. Таким образом, введение мокравимода в комбинации с Т-клетками с CAR позволяет усилить элиминацию опухолей.



### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

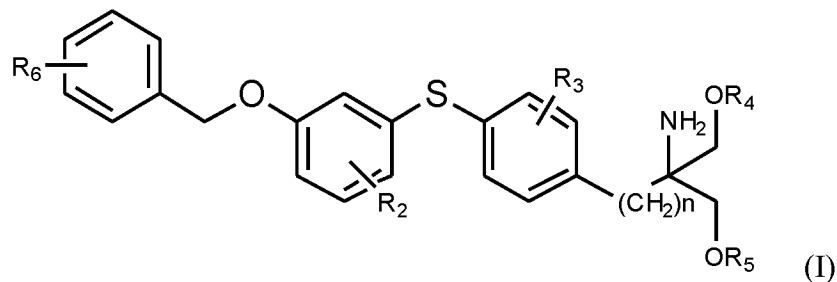
1. Композиция клеток с CAR для применения при лечении онкогематологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем такие клетки с CAR представляют собой иммунные клетки, предпочтительно иммунные Т-клетки, экспрессирующие молекулы химерных антигеновых рецепторов, которые связывают антиген, связанный с раком, и при этом вводят терапевтически эффективное количество такой композиции клеток с CAR в комбинации с терапевтически эффективным количеством модулятора рецепторов S1P.

2. Композиция клеток с CAR для применения по п. 1, при этом такой связанный с раком антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD123, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, LeY, ROR1, CLL-1, BCMA и их комбинаций, причем предпочтительно указанный антиген - это CD19.

3. Композиция клеток с CAR для применения по п. 1 или 2, при этом данный модулятор рецепторов S1P выбран из числа мокравимода, сипонимода, финголимода, озанимода, понесимода, этрасимода, АКР-11, ценеримода, амиселимода, СВР-307, OPL-307, OPL-002, BMS-986166, SCD-044, BOS-173717, CP-1050, причем предпочтительно указанный модулятор - это мокравимод.

4. Композиция клеток с CAR для применения по п. 3, при этом данный модулятор рецепторов S1P является агонистом рецепторов S1P.

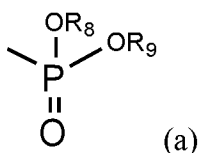
5. Композиция клеток с CAR для применения по п. 3 или 4, при этом агонист рецепторов S1P имеет следующую формулу (I) или (II) или (IIa) или (IIb):



где: R<sub>2</sub> означает H, галоген, тригалометил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, C<sub>1-7</sub>-алкил, фенэтил или бензилокси;

R<sub>3</sub> означает H, галоген, CF<sub>3</sub>, OH, C<sub>1-7</sub>-алкил, C<sub>1-4</sub>-алкокси, бензилокси, фенил или C<sub>1-4</sub>-алкоксиметил;

каждый из R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> независимо означает H или остаток по формуле (a):

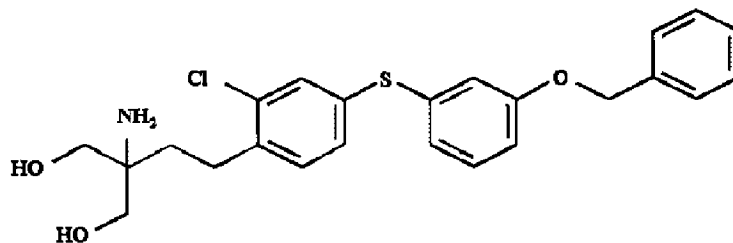


где каждый из  $R_8$  и  $R_9$  независимо означает H или  $C_{1-4}$ -алкил, необязательно замещенный галогеном;

$n$  – целое число от 1 до 4; и

$R_6$  означает водород, галоген,  $C_{1-7}$ -алкил,  $C_{1-4}$ -алкокси или трифторметил;

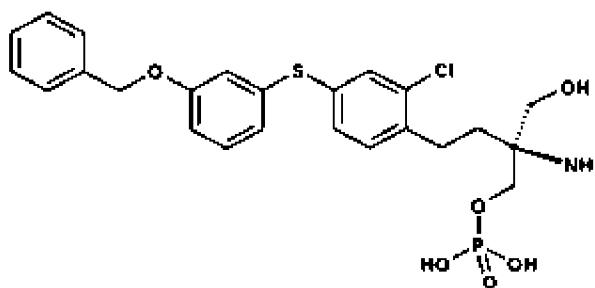
или :



(II),

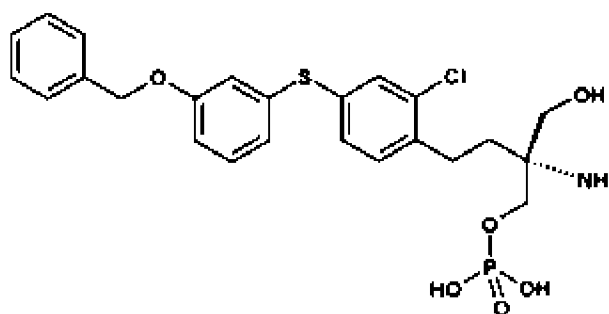
либо их фармацевтически приемлемые соли;

или :



(IIa)

или



(IIb)

6. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-5, при этом агонистом рецепторов S1P является мокравимод или его фармацевтически приемлемая соль или его фосфатное производное.

7. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-6, при этом онкогематологическое заболевание представляет собой лейкоз и/или лимфому, предпочтительно оно выбрано из группы, состоящей из диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), хронического миелоидного лейкоза (CML), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого

лимфоцитарного лейкоза (ALL), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, мантийноклеточной лимфомы (MCL), первичной крупноклеточной В-клеточной лимфомы средостения (PMBCL) или множественной миеломы, более предпочтительно из ALL, DLBCL, PMBCL и MCL, еще более предпочтительно это DLBCL.

8. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-7, при этом вводят эффективное количество клеток с CAR, предпочтительно Т-клеток с CAR, в дозе от  $0,1 \times 10^6$  до  $6 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных иммунных клеток на 1 кг массы тела.

9. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-8, при этом такие клетки с CAR, предпочтительно Т-клетки с CAR, вводят через 2-14 дней после завершения лимфоистощающей химиотерапии.

10. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-9, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в суточной дозе от 0,05 мг до 40 мг, предпочтительно от 0,1 мг до 35 мг, более предпочтительно от 0,5 мг до 30 мг, еще более предпочтительно от 1 мг до 15 мг, еще более предпочтительно от 1,5 мг до 7 мг, еще более предпочтительно от 2 мг до 5 мг, еще более предпочтительно около 3 мг или 1 мг.

11. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-10, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят ежедневно в течение по меньшей мере 1, 2 или 3 месяцев или больше, предпочтительно начиная с первого дня между 1-м и 20-м днем перед введением композиции, содержащей клетки с CAR, более предпочтительно за 11 дней перед введением клеток с CAR.

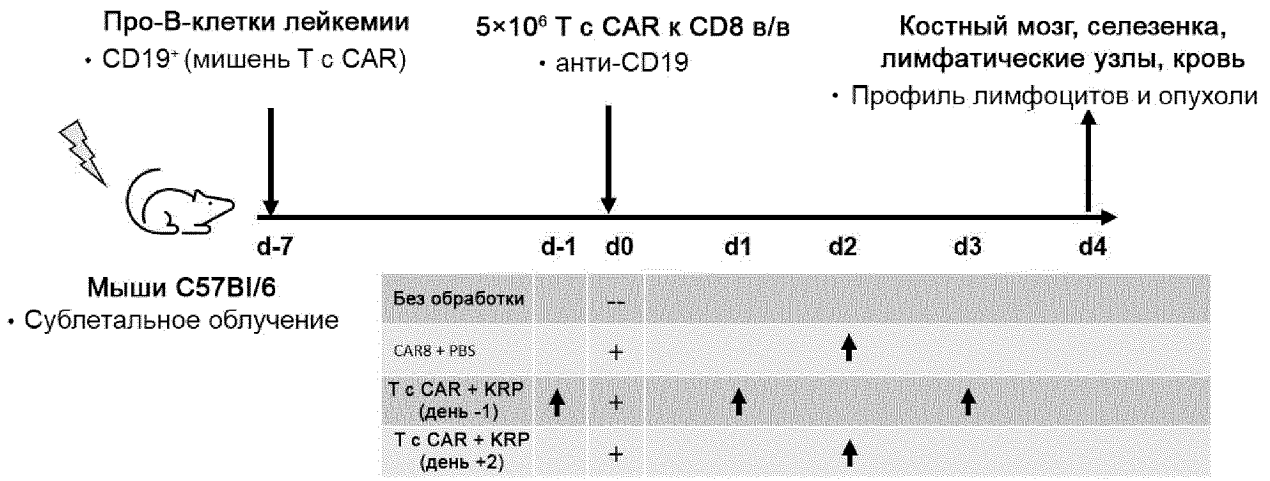
12. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-11, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для предотвращения выхода клеток с CAR из костного мозга и/или стимулирования приживления и персистенции клеток с CAR и/или повышения эффективности терапии клетками с CAR.

13. Композиция клеток с CAR для применения по любому из пп. 1-12, при этом данный модулятор рецепторов S1P вводят в количестве, достаточном для уменьшения риска синдрома высвобождения цитокинов, в частности синдрома системного высвобождения цитокинов у субъекта, получающего предпочтительно аутологичные или сингенные клетки с CAR.

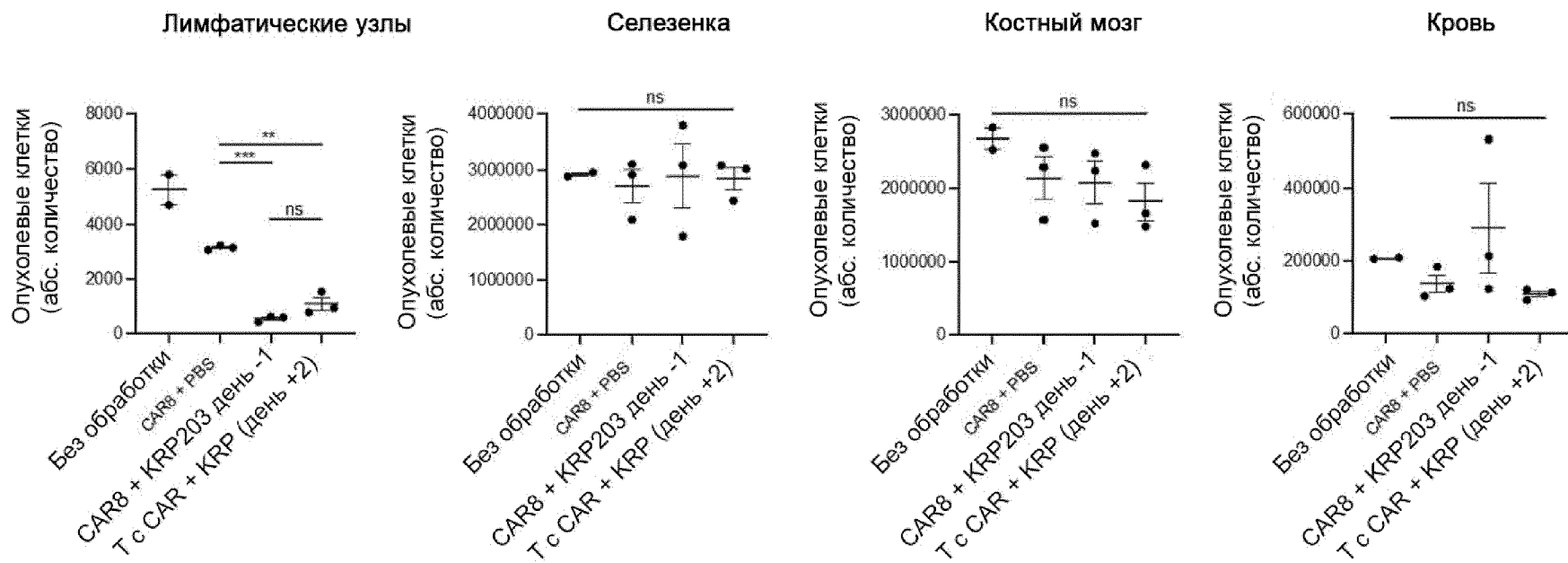
14. Модулятор рецепторов S1P для применения в профилактике синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и/или синдрома активации макрофагов (MAS) и/или синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS), при терапии клетками с CAR (например, терапии против CD19) у нуждающегося в этом

субъекта, включающей введение ему модулятора рецепторов S1P (например, мокравимода) или его фармацевтически приемлемой соли или его фосфатного производного в комбинации с терапией клетками с CAR, тем самым предотвращая CRS и/или MAS и/или ICANS у субъекта.

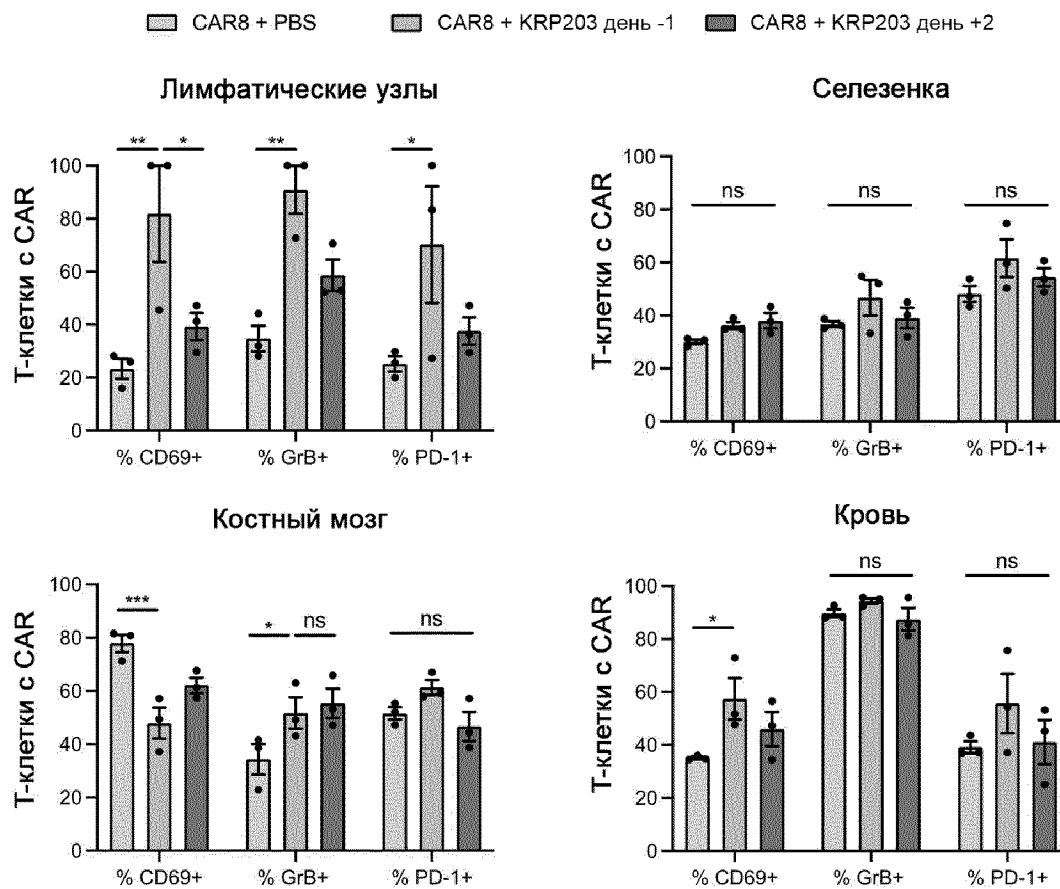
15. Модулятор рецепторов S1P по п. 14, при этом данная терапия клетками с CAR представляет собой терапию Т-клетками с CAR, предпочтительно терапию Т-клетками с CAR против CD19.



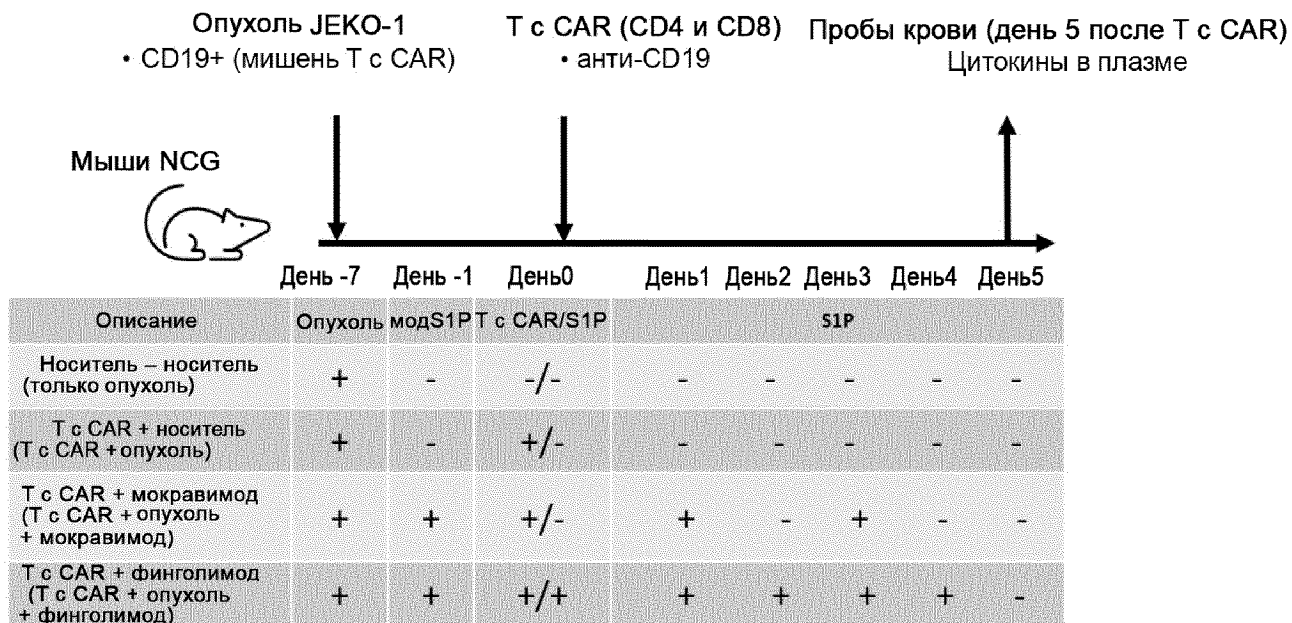
Фиг. 1



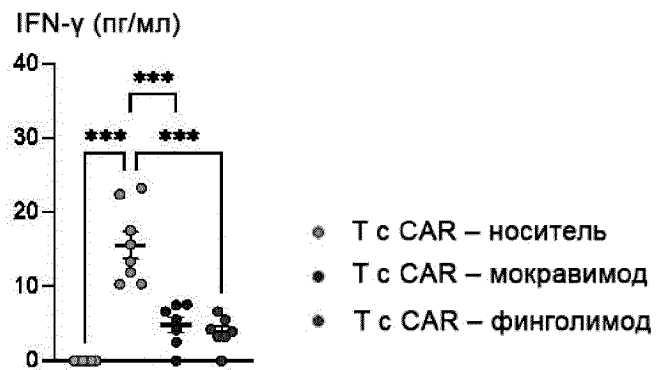
Фиг. 2



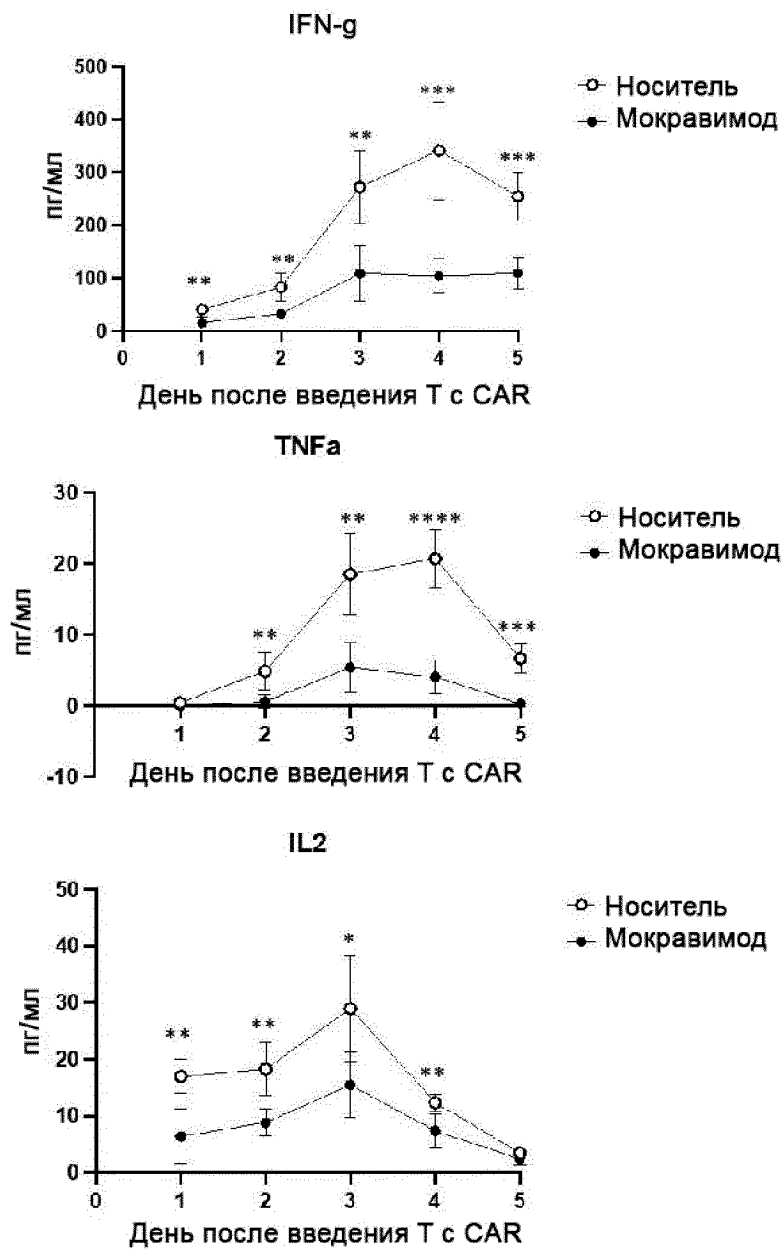
Фиг. 3



Фиг. 4

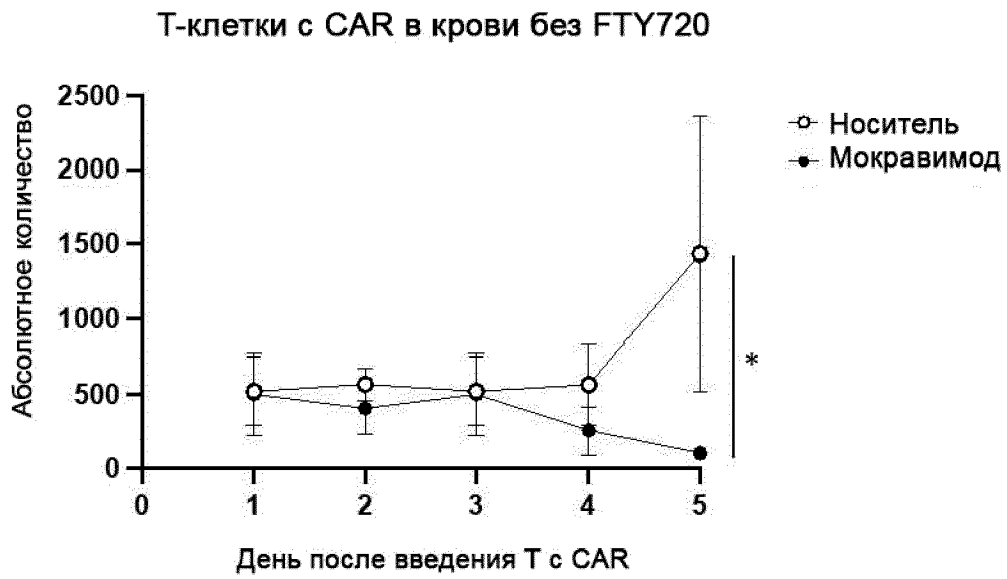


Фиг. 5

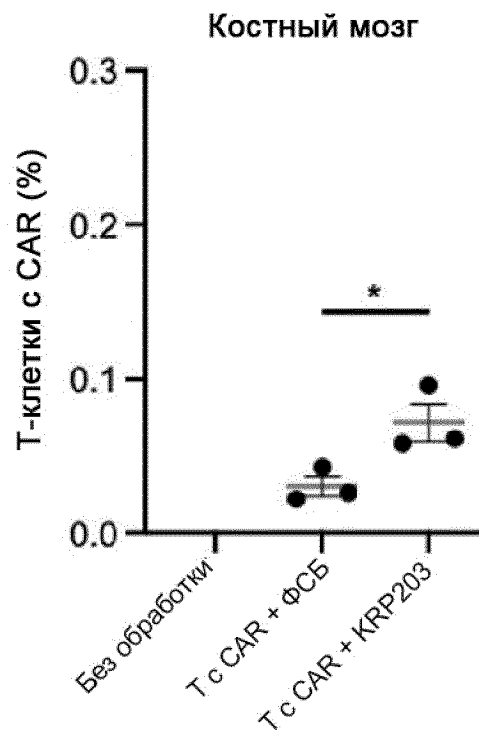


Фиг. 6

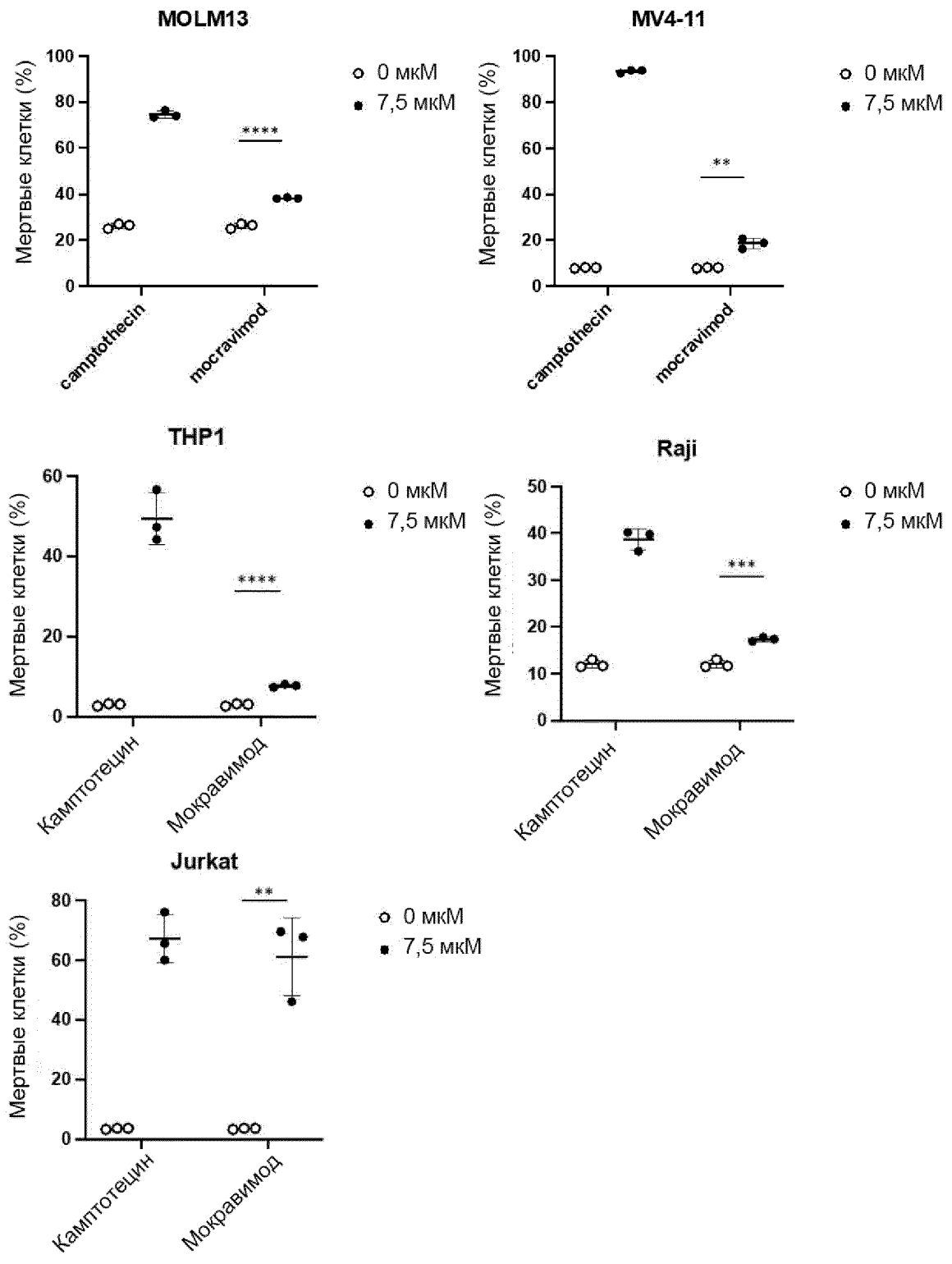




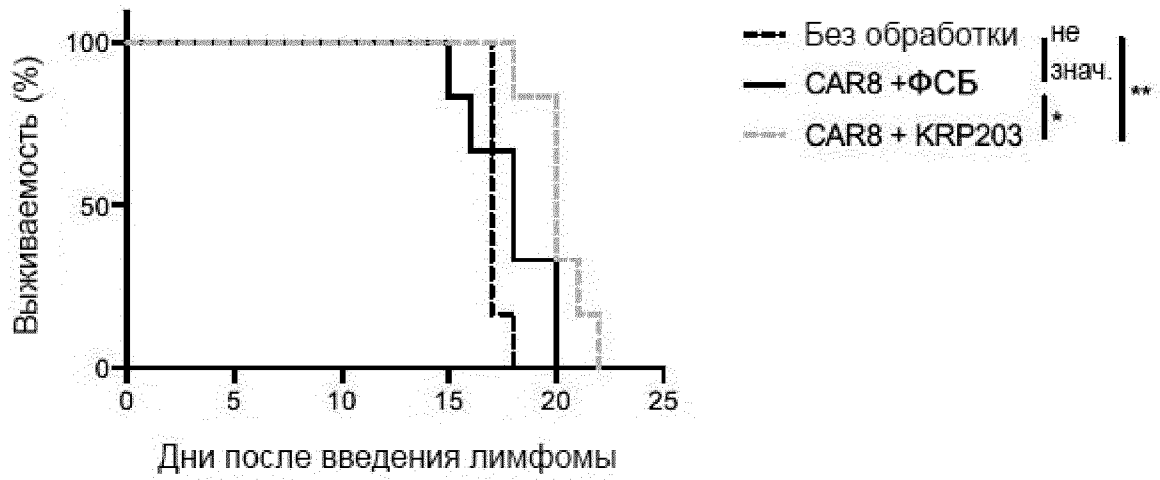
Фиг. 7



Фиг. 8

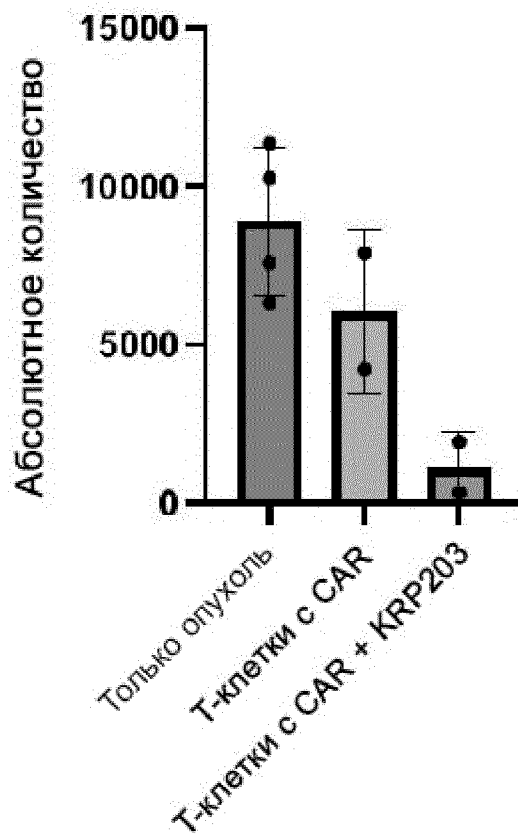


Фиг. 9



Фиг. 10

Опухоль Nalm6



Фиг. 11